

УДК 576.3

СОСТАВ И КИНЕТИКА КЛЕТОЧНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ГЕМОЦИТОВ У ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *CRENOMYTILUS GRAYANUS* (DUNKER, 1853)

© 2022 г. А. А. Анисимова¹, *, М. Н. Дягилева¹, О. А. Карушева¹,
А. В. Синенко¹, И. А. Дмитриева¹

¹Кафедра клеточной биологии и генетики, Институт Мирового океана,
Дальневосточный федеральный университет, Владивосток 690922, Россия

*e-mail: anisan77@mail.ru

Поступила в редакцию 14.09.2021 г.

После доработки 24.02.2022 г.

Принята к публикации 24.03.2022 г.

По данным световой микроскопии гемоциты *Crenomytilus grayanus* представлены пятью морфотипами, типичными для двустворчатых моллюсков. В период половой инертности (конец октября) соотношение клеток было следующим: (1) гемобласты ($0.2 \pm 0.1\%$), (2) гиалиноциты ($1.9 \pm 0.3\%$), а также (3) базофильные ($10.9 \pm 1.4\%$), (4) нейтрофильные ($13.3 \pm 3.0\%$) и (5) эозинофильные ($74.1 \pm 2.9\%$) гранулоциты. Методом проточной цитометрии гемоциты в соответствии с их размером (FSC) и внутренней структурой (SSC) дифференцировались на четыре группы (R). Корреляционный анализ показал соответствие группы R1 гемобластам, R2 – гиалиноцитам, R4 – гранулоцитам и их эозинофильным формам; однако в летний сезон корреляции не выполнялись. Морфология гемоцитов и количественные отношения между их структурными типами свидетельствуют в пользу гистогенетической преемственности гиалиноцитов и гранулоцитов в соответствии с моделью гемопоэза Микса. Расположение клеток на гистограмме светорассеяния (FSC vs. SSC) отражает степень их зрелости, зависит от функционального статуса и может изменяться при нарушениях митотического цикла. Популяция гемоцитов *C. grayanus* характеризуется низкой скоростью обновления и доминированием эозинофильных гранулоцитов (до 99% от всех клеток в период половой инертности), что предполагает стратегию, направленную на длительное сохранение высокодифференцированных форм клеток, и согласуется с высокой продолжительностью жизни вида.

Ключевые слова: гемоциты, гемопоэз, гистогенез, *Crenomytilus grayanus*, Mytilidae, Bivalvia

DOI: 10.31857/S0134347522040027

В настоящее время во всем мире двустворчатых моллюсков добывают, культивируют, а также широко используют в качестве биоиндикаторов. Это определяет важность понимания их нормальной организации, адаптивных возможностей и особенностей реагирования на стресс. Одной из систем *Bivalvia*, подходящих для биоиндикации, является гемолимфа. Ее показатели весьма чувствительны к внешнему воздействию и рассматриваются как перспективные биомаркеры состояния морской среды (см. обзоры: Анисимова, 2013; Renault, 2015). Применяя гемолимфу в биомониторинге, следует учитывать биологию используемых организмов, в первую очередь видовые особенности гемограммы и саму гистогенетическую стратегию вида. Соотношение гранулярных и агранулярных форм клеток в гемолимфе значительно варьирует у разных представителей класса. Так, у митилид чаще отмечают преобладание гранулоцитов над гиалиноцитами (Carballal et al., 1998;

Wootton et al., 2003; Galimany et al., 2008; Le Foll et al., 2010; Анисимова, 2012), а у устриц (Allam et al., 2002; Rebelo et al., 2013) и морских гребешков (Дзюба, Романова, 1992; Estrada et al., 2013), как правило, наблюдают обратное соотношение. Противоположные сведения опубликованы и для мидий (Andreyeva et al., 2019; Parrino et al., 2019), и для устриц (Sun et al., 2018), однако эти противоречия можно объяснить различием в физиологическом статусе или условиях обитания моллюсков (см. обзор: Анисимова, 2013). Причины видовых различий нечасто обсуждаются в литературе; более того, до сих пор отсутствует единое мнение о классификации и гистогенетических отношениях гемоцитов *Bivalvia*. Одна из схем предполагает, что гранулоциты и гиалиноциты – это отдельные линии, происходящие из разных камбиальных источников (Cheng, 1981), согласно другой схеме все клетки в популяции гемоцитов представляют единый морфофункциональный

тип на разных стадиях дифференцировки (Mix, 1976; Ottaviani et al., 1998; Rebelo et al., 2013). Не исключено, что различия в клеточном составе гемолимфы могут отражать особенности видовой стратегии поддержания тканевого гомеостаза. Последний обеспечивается быстрым обновлением клеточных популяций за счет стремительной пролиферации и апоптоза, как, например, в тканях короткоживущего морского гребешка *Aequipecten opercularis*, или длительной сохранностью уже имеющихся клеток за счет эффективной антиоксидантной защиты при низких темпах репродукции, как у двустворчатого моллюска *Arctica islandica* с продолжительностью жизни до 350 лет (Strahl, Abele, 2010). Разный подход к поддержанию целостности тканевых систем подразумевает и разный ответ на стрессовые воздействия, что необходимо принимать во внимание при использовании гемолимфы в качестве биомаркера.

Представители рода *Mytilus* признаны эталоном в биоиндикации состояния прибрежных вод и включены в глобальную программу мониторинга стойких загрязнений “Mussel Watch Program” (см. обзор: Farrington et al., 2016). На Дальнем Востоке России в качестве объекта морской токсикологии нередко используют мидию Грея *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853). Такие реакции *C. grayanus* на загрязнение, как изменение микроэлементного (Кавун, Шулькин, 2005) и жирнокислотного (Ковалев и др., 2019) состава тканей или структурные перестройки нефроцитов, ответственных за выведение металлов (Kavun et al., 2020), уже исследованы, в то же время работы, выполненные на клетках гемолимфы этого моллюска, нам неизвестны. Мидия Грея — долгожитель, возраст отдельных особей может достигать 150 лет (Явнов, 2000), что делает данный объект удобной моделью для изучения гистогенезов у видов с разной продолжительностью жизни.

Настоящая работа посвящена анализу клеточного состава гемолимфы *C. grayanus* и оценке параметров митотического цикла у этого вида с целью поиска гистогенетических закономерностей в структуре и кинетике клеточной популяции гемоцитов. Данный подход позволяет охарактеризовать гемолимфу мидии Грея как тканевую систему и служит отправной точкой для оценки перспектив ее использования в биомониторинге.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Сбор моллюсков

Материалом для исследования послужила гемолимфа 80 особей двустворчатого моллюска *Crenomytilus grayanus*. Для выявления границ нормальной вариабельности параметров в исследование случайно взяты три выборки, для которых общим фактором являлось отсутствие значимой

антропогенной нагрузки на среду обитания моллюсков. Материал собирали трижды в разные годы и сезоны в трех фоновых акваториях Приморья (рис. 1). В 2018 г. в середине июля 10 моллюсков с длиной раковины от 30 до 110 мм были собраны в б. Киевка вблизи Морской биостанции “Заповедное”, в 2019 г. в начале сентября 40 особей (26–121 мм) — в прол. Старка зал. Петра Великого и в 2020 г. в конце октября 30 особей (81–160 мм) — в прибрежной зоне о-ва Рейнеке зал. Петра Великого. Половая зрелость у мидии Грея наступает при длине раковины 60–70 мм (Явнов, 2000). Для характеристики клеточного состава гемолимфы выборки не были стандартизованы по размеру особей, чтобы охватить весь диапазон вариантов гемограммы. Стандартизацию применяли для расчета средних показателей и их сравнения в разные сезоны. Возрастную динамику клеточной популяции гемоцитов *C. grayanus* планируется рассмотреть в следующем сообщении. Нерест у мидии Грея происходит в июне–августе (Явнов, 2000), поэтому в летних выборках некоторые особи находились в состоянии выброса гамет. В октябрьской выборке признаков половой активности не наблюдали, а размер всех особей соответствовал возрасту половой зрелости. Эту выборку рассматривали как эталонную для определения видовой специфики гемограммы; результаты летних сборов использовали для оценки влияния нереста на параметры гемограммы.

Сбор и фиксация гемолимфы

У каждой особи отбирали 900 мкл гемолимфы из заднего мускула-аддуктора с помощью иглы 0.7 мм в диаметре и шприца объемом 1 мл, заранее содержащего 100 мкл 0.3 М раствора натриевой соли ЭДТА на фильтрованной морской воде для предотвращения агглютинации гемоцитов. Каждый образец делили на две части — 750 и 250 мкл. К первой части добавляли 750 мкл 8% забуференного раствора параформальдегида (ПФА) и перемешивали для получения клеточной суспензии с конечной концентрацией ПФА 4%. Ко второй части образца добавляли 700 мкл 96% этилового спирта и перемешивали для получения клеточной суспензии с конечной концентрацией этанола 70%.

Анализ клеточного состава гемолимфы

Небольшую каплю фиксированной в ПФА суспензии гемоцитов наносили на предметное стекло и выдерживали до высыхания. Затем препараты дважды отмывали от фиксатора 0.02 М фосфатно-буферным солевым раствором (ФБС), окрашивали 10% раствором красителя Романовского–Гимзы в течение 10 мин, просветляли в ксилоле, заключали в бальзам и фотографировали на камеру AxioCam 105 color в световой микро-



Рис. 1. Карта-схема районов сбора двустворчатого моллюска *Crenomytilus grayanus*. 1 – б. Киевка, 2 – прол. Старка, 3 – о-в Рейнеке.

скоп Axioscope (Carl Zeiss, Германия) с использованием объектива $\times 100$. На микрофотографиях идентифицировали гемоциты разных морфотипов, определяли их процентное соотношение и измеряли диаметр клетки с помощью программы ZEN Blue. В анализ брали по 300 клеток от каждой особи, всего от 80 особей обработано 24 тыс. гемоцитов. Оставшийся объем фиксированных в ПФА клеточных суспензий исследовали методом проточной цитометрии. Анализ проводили на проточном цитометре Accuri C6 (Becton Dickinson, США) с использованием двухпараметрических гистограмм распределения событий по параметрам прямого (forward lights scattering – FSC) и бокового (side light scattering – SSC) светорассеяния, отражающих соответственно размер и внутреннюю структуру клеток. Агрегаты гемоцитов исключали из зоны анализа на двухпараметрических гистограммах распределения событий по FSC-A и FSC-H, где A – площадь под сигналом, а H – высота сигнала. Для каждой из 80 особей анализировали по 10 тыс. событий в области, соответствующей синглетам. Оценивали общее количество клеток, характер их распределения по размеру и структуре, количество клеток в отдельных размерно-структурных группах (регионах), а также определяли средние значения FSC и SSC для всей совокупности гемоцитов и для отдельных регионов.

Анализ митотического цикла гемоцитов

Для оценки содержания ДНК в ядрах гемоцитов использовали проточную цитометрию с внутренним гаплоидным стандартом. В анализ взяли по 20 мидий из двух выборок – осенней из района о-ва Рейнеке и летней из прол. Старка. Фиксиро-

ванные этанолом суспензии гемоцитов смешивали с суспензией фиксированных сперматозоидов *C. grayanus*, дважды отмывали от фиксатора в 0.02 М ФБС путем центрифугирования в течение 10 мин при 1000 g, окрашивали 0.0001% раствором DAPI в течение 15 мин и анализировали на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter). Анализ проводили для всей совокупности гемоцитов (10 тыс. событий в области синглетов) и для отдельных групп клеток (регионов), выделяемых по соотношению FSC и SSC.

Статистический анализ

Соответствие выборок нормальному распределению оценивали с помощью теста Колмогорова–Смирнова, достоверность различий – с помощью *U*-критерия Манна–Уитни. Для анализа взаимосвязей использовали ранговые корреляции Спирмена при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На основании световой микроскопии в гемолимфе мидии Грея выделены пять морфотипов клеток. К первому морфотипу отнесены гемобласты (малые агранулоциты) диаметром около 5 мкм с узким ободком цитоплазмы (рис. 2а); второй морфотип определен как гиалиноциты (большие агранулоциты) диаметром от 5 до 10 мкм с относительно однородной базофильной цитоплазмой (рис. 2б). Остальные три формы были представлены базофильными (рис. 2в), эозинофильными (рис. 2г, 2ж) и промежуточными нейтрофильными (рис. 2д, 2е) гранулоцитами диаметром от 7 до 14 мкм; в последних двух формах эозинофильные зоны часто располагались поляр-

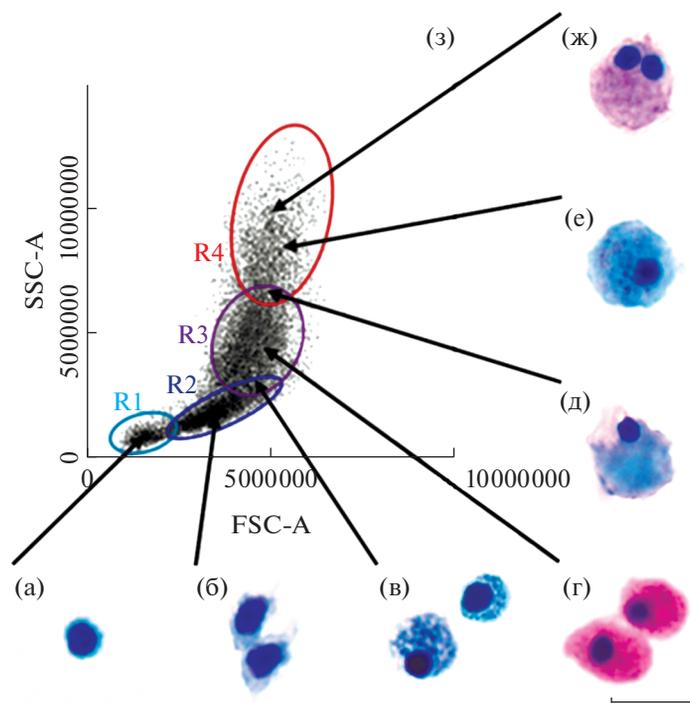


Рис. 2. Структурная характеристика гемоцитов *Crenomytilus grayanus*. а–е – морфотипы гемоцитов (световая микроскопия, окраска по Романовскому–Гимзе, масштабная линейка – 10 мкм): а – гемобласт; б – гиалиноциты; в – базофильные гранулоциты; г, ж – эозинофильные гранулоциты; д, е – нейтрофильные гранулоциты; з – распределение гемоцитов на размерно-морфологические группы (регионы, R) по значениям прямого (FSC-A) и бокового (SSC-A) светорассеяния (проточная цитометрия): R1 – мелкие агранулярные клетки, R2 – клетки среднего размера с умеренной гранулярностью, R3 – крупные гранулярные клетки, R4 – крупные гранулярные клетки с повышенным уровнем структурной сложности. А – площадь под сигналом.

но или со смещением на периферию (рис. 2д). Осенью размер клеток прогрессивно увеличивался в ряду гемобласт–гиалиноцит–гранулоцит без значимых различий между разными формами гранулоцитов. Летом по размеру различались только гемобласты, остальные клетки по этому признаку не различались из-за укрупнения гиалиноцитов и уменьшения эозинофильных гранулоцитов (табл. 1).

Самой малочисленной формой в гемолимфе были гемобласты; осенью их доля не превышала 2%, летом – 8% при медиане 0% в обоих случаях. Доля гранулоцитов варьировала от 90 до 100% осенью и от 40 до 100% летом (медианы 98 и 97% соответственно, $p = 0.03$); доля эозинофильных гранулоцитов изменялась от 46 до 99% осенью и от 27 до 97% летом (медианы 88 и 82 соответственно, $p = 0.008$) (табл. 1).

Анализ параметров прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния методом проточной цитометрии подтвердил размерно-морфологическую неоднородность клеточного состава гемолимфы *C. grayanus*. Чаще всего на гистограммах FSC vs SSC дифференцировались четыре группы событий: регионы R1, R2, R3 и R4 (рис. 2з). Между FSC и SSC установлена высокая прямая корреляция ($r =$

$= 0.97$). Оба параметра коррелировали с количеством событий в регионах: прямо – с R4 ($r = 0.81$ для FSC и $r = 0.80$ для SSC) и обратно – с R1, R2, R3 ($r = -0.54, -0.57, -0.50$ для FSC и $r = -0.44, -0.73, -0.48$ для SSC). Средний показатель SSC прямо зависел от числа гранулоцитов ($r = 0.42$) и обратно – от числа агранулоцитов ($r = -0.43$), как гемобластов ($r = -0.46$), так и гиалиноцитов ($r = -0.41$). В осенней выборке у о-ва Рейнеке обнаружены прямые корреляции между количеством событий в R1 и числом гемобластов ($r = 0.76$), R2 и гиалиноцитов ($r = 0.46$), R4 и эозинофильных гранулоцитов ($r = 0.62$). Количество событий в R2 также показало прямую корреляцию с общим числом агранулоцитов ($r = 0.45$) и обратную – с общим числом гранулоцитов ($r = -0.65$). Последнее прямо коррелировало с количеством событий в R4 ($r = 0.47$), которое, в свою очередь, показало обратную корреляцию с содержанием агранулоцитов ($r = -0.46$), как гемобластов ($r = -0.41$), так и гиалиноцитов ($r = -0.46$). Количество событий в R3 не коррелировало ни с одним из морфотипов; количество базофильных и нейтрофильных гранулоцитов также не обнаружило связи ни с одним из регионов. В этой же выборке обнаружена прямая корреляция между R1 и R2 ($r = 0.37$) и обратная – между ними и R4 ($r = -0.47$ и $r = -0.63$

Таблица 1. Характеристика клеточного состава гемолимфы двустворчатого моллюска *Crenomytilus grayanus*

Место и время сбора моллюсков	Морфотипы гемоцитов									
	гемобласты		гиалиноциты		базофильные гранулоциты		нейтрофильные гранулоциты		эозинофильные гранулоциты	
	мкм	%	мкм	%	мкм	%	мкм	%	мкм	%
О-в Рейнеке, осень	4.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1	6.5 ± 0.3	1.9 ± 0.3	8.3 ± 0.4	10.9 ± 1.4	8.6 ± 0.2	13.3 ± 3.0	9.4 ± 0.3	74.1 ± 2.9
Прол. Старка, лето	5.3 ± 0.5	0.6 ± 0.3	8.3 ± 0.1	2.7 ± 0.7	8.5 ± 0.3	19.4 ± 2.7	8.2 ± 0.3	8.6 ± 2.9	8.4 ± 0.2	68.7 ± 3.1

Примечание. Для расчета средних значений использовали по 20 особей половозрелых мидий с длиной раковины 80–120 мм из двух наиболее репрезентативных выборок.

соответственно). Обратную связь с R4 показал и R3 ($r = -0.65$).

Корреляции выявлены и при сравнении числа клеток разных морфотипов. Количество гемобластов прямо соотносилось с таковым гиалиноцитов ($r = 0.45$), повторяя положительную связь между R1 и R2. При этом количество гиалиноцитов показало прямую корреляцию с таковым базофильных гранулоцитов ($r = 0.56$); последнее, в свою очередь, прямо коррелировало с общим числом клеток в гемолимфе ($r = 0.42$). Доля эозинофильных гранулоцитов, которая имела четкую положительную связь с общим количеством гранулоцитов ($r = 0.73$), находилась в обратной корреляции с содержанием гемобластов ($r = -0.44$), гиалиноцитов ($r = -0.72$) и базофильных гранулоцитов ($r = -0.97$), что соответствует отрицательной связи между числом событий в R4 и во всех остальных регионах. Обратная корреляция между числом агранулоцитов и гранулоцитов была абсолютной ($r = -1.00$).

Таким образом, согласно результатам корреляционного анализа, регион R1 соответствует гемобластам, R2 – гиалиноцитам, R4 – гранулоцитам и их доминирующей эозинофильной форме. Регион R3 является смешанным и сочетает в себе гранулоциты разной аффинности (рис. 2). По мере изменения соотношения клеток в пользу эозинофильных гранулоцитов (рис. 3а1, 3а2) плотность событий действительно смещалась из R3 в R4 (рис. 3б1, 3б2), однако реальное число эозинофильных гранулоцитов иногда существенно превышало количество событий в R4 (рис. 3а3, 3б3), а высокая плотность событий в регионах R1 и R2 не соотносилась с низким содержанием гемобластов и гиалиноцитов (рис. 3а, 3б). В некоторых случаях регион R4 выглядел более протяженным за счет возрастания SSC (рис. 3б3). При этом часто прослеживалась зависимость расположения гемоцитов на гистограммах FSC vs SSC от состояния их ядерного аппарата и содержания ДНК (рис. 3в, 4). В гемолимфе таких мидий в массовом количестве встречались клетки с удвоенными ядрами обычно разного размера, чаще всего это бы-

ли эозинофильные гранулоциты (рис. 2ж). Проточная ДНК-цитометрия гемоцитов не выявила картин, соответствующих нормальному митотическому циклу, в том числе в регионе R1 (рис. 4а1). Однако у особей с повышенным содержанием двуядерных гемоцитов (9 случаев из 20 у особей из прибрежья о-ва Рейнеке и 4 случая из 20 у моллюсков из прол. Старка) наблюдались мультимодальные распределения клеток по содержанию ДНК (как всех, так и в регионе R1), когда диплоидному пику сопутствовали дополнительные моды с содержанием ДНК менее и более $2c$ (рис. 4а2), вплоть до триплоидных значений (рис. 3в3, рис. 4а3). Выделение клеток с определенным содержанием ДНК из общей совокупности гемоцитов позволило определить их расположение на гистограммах FSC vs SSC (рис. 4б, 4в, 4г). Расположение диплоидных клеток соответствовало типичной позиции регионов R1, R2, R3 и R4 при относительно невысоких для региона R4 значениях SSC (рис. 4б). Клетки с содержанием ДНК менее $2c$ имели заниженные показатели светорассеяния, основная масса клеток располагалась в зоне R2 (рис. 4в). Гипердиплоидные и полиплоидные гемоциты имели завышенные показатели FSC и SSC и располагались в области R3 и R4 (рис. 4г). В этом случае регион R4 часто характеризовался более высокими значениями SSC (рис. 3б3), что согласуется с наличием двуядерных клеток в этой категории гемоцитов.

В летних выборках, как и в осенней, общие показатели FSC и SSC прямо коррелировали друг с другом ($r = 0.92$) и с количеством событий в регионе R4 ($r = 0.80$ и $r = 0.84$ соответственно), обратно – с количеством событий в R1 ($r = -0.71$ и $r = -0.78$ соответственно); регионы R1 и R2 также находились в обратных отношениях с R4 ($r = -0.61$ и $r = -0.50$ соответственно). Однако значимых корреляций между количеством событий в регионах и числом клеток ожидаемых морфотипов выявить не удалось. В частности, из-за резкого несовпадения данных световой микроскопии и проточной цитометрии в образцах, засоренных спермой, не обнаружена связь между количе-

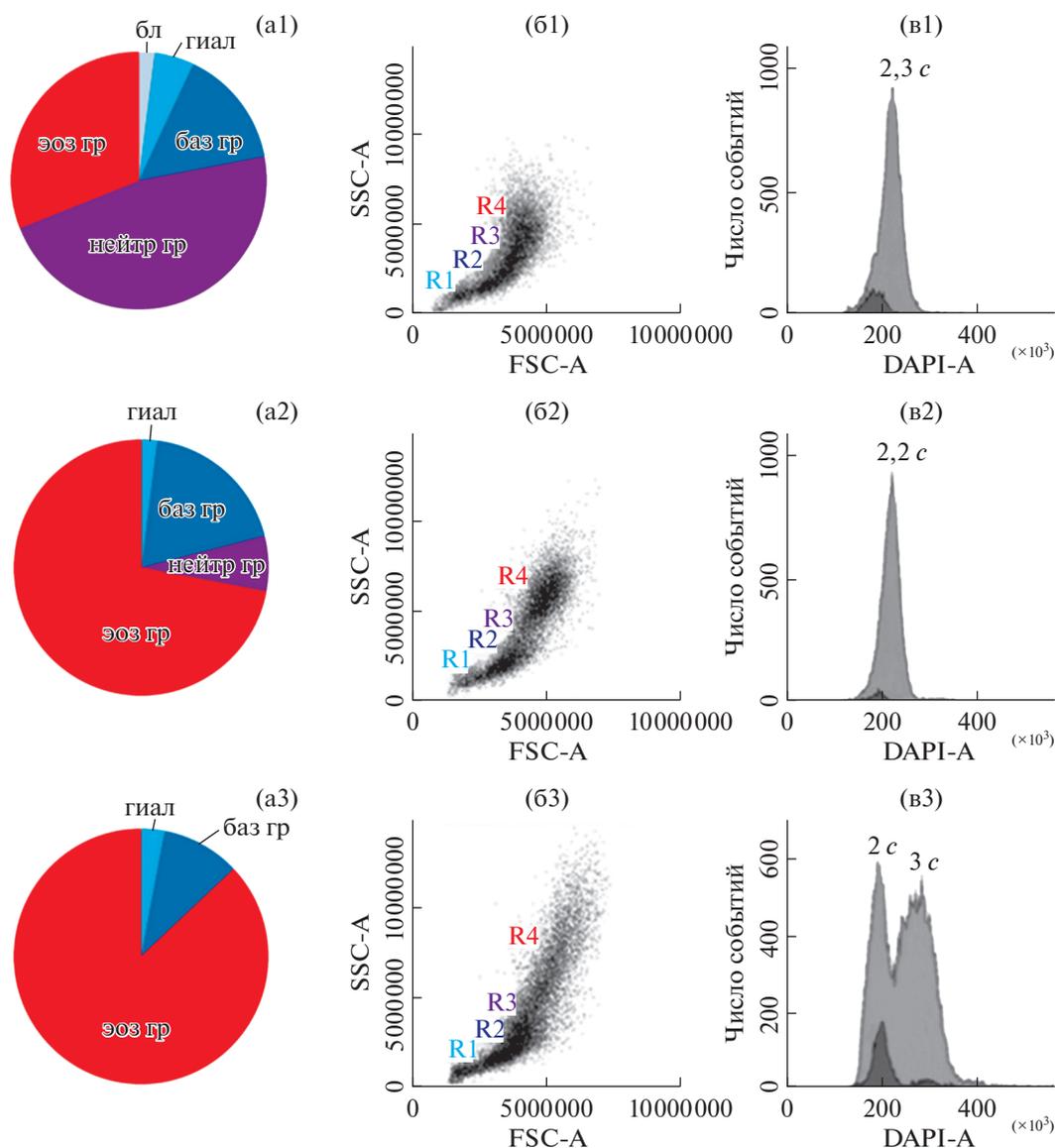


Рис. 3. Сопоставление параметров гемограммы *Crenomytilus grayanus*, определенных методами световой микроскопии (а) и проточной цитометрии (б), с учетом содержания ДНК в ядрах гемоцитов (в). 1–3 – примеры индивидуальных распределений гемоцитов по исследованным параметрам; приведены данные по трем особям: 1 – половозрелая особь из летней выборки, прол. Старка; 2, 3 – половозрелые особи из осенней выборки, о-в Рейнеке; а – распределение клеток по морфотипам: бл – гемобласты, гиал – гиалиноциты, баз гр – базофильные гранулоциты, нейтр гр – нейтрофильные гранулоциты, эоз гр – эозинофильные гранулоциты; б – распределение клеток по регионам (R1, R2, R3, R4) в соответствии со значениями прямого (FSC-A) и бокового (SSC-A) светорассеяния; в – распределение клеток по содержанию ДНК, с (DAPI-A). А – площадь под сигналом.

ством событий в R1 и содержанием гемобластов, а у мидий из прол. Старка количество событий в R2 прямо коррелировало с содержанием гранулоцитов ($r = 0.40$) и обратно – с содержанием агранулоцитов ($r = -0.38$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В полном соответствии с общепринятой морфологической классификацией гемоцитов *Bivalvia* (см. обзоры: Mix, 1976; Cheng, 1981; Sminia, van

der Knaap, 1987; Анисимова, 2013) и, в частности, митилид (Carballal et al., 1997, 1998; Ottaviani et al., 1998; Wootton et al., 2003; Galimany et al., 2008; Le Foll et al., 2010; Анисимова, 2012; Andreyeva et al., 2019; Parrino et al., 2019), клеточный состав гемолимфы мидии Грея *Crenomytilus grayanus* по данным световой микроскопии представлен гемобластами, гиалиноцитами, базофильными, нейтрофильными и эозинофильными гранулоцитами. Согласно предложенной Миксом (Mix, 1976) модели гемопо-

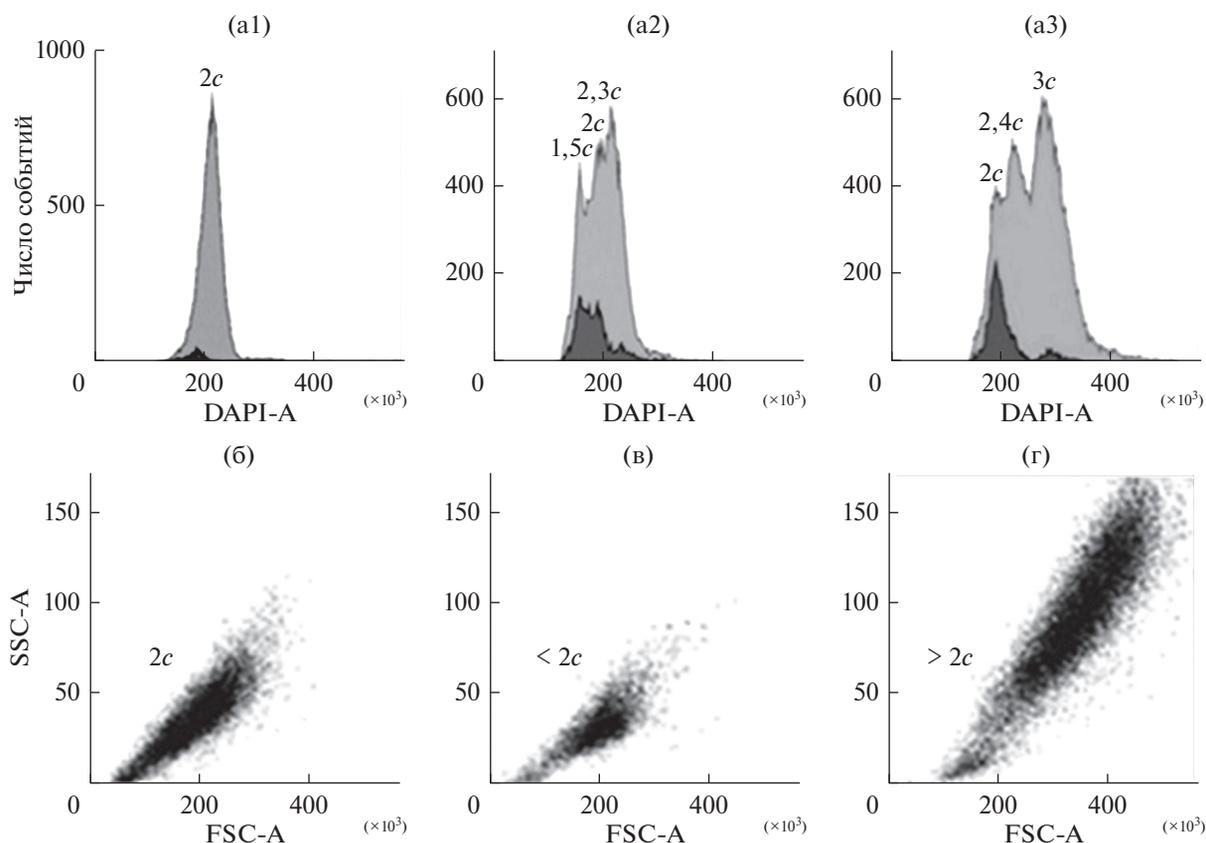


Рис. 4. Оценка влияния содержания ДНК на характер распределения гемоцитов *Crenomytilus grayanus* по значениям прямого и бокового светорассеяния. a1–a3 – примеры индивидуальных распределений гемоцитов по содержанию ДНК, *c* (DAPI-A) (приведены данные по трем особям из осенней выборки, о-в Рейнеке, светло-серым цветом показаны все гемоциты, темно-серым цветом – только клетки региона R1); б–г – закономерности распределения гемоцитов с разным содержанием ДНК, *c* (DAPI-A) по значениям прямого (FSC-A) и бокового (SSC-A) светорассеяния (приведены данные по особи № 2). А – площадь под сигналом.

эза, перечисленные в этом порядке структурные типы гемоцитов формируют единый гистогенетический ряд, а их морфология отражает последовательность событий в ходе созревания клеток фагоцитарного типа. Гиалиноциты *Bivalvia* имеют признаки молодой клеточной формы – крупное ядро и хорошо развитый аппарат белкового синтеза (ШЭР и комплекс Гольджи), в то время как у гранулоцитов выражены черты терминальной дифференцировки – компактное ядро, обилие лизосом и секреторных гранул (Sminia, van de Кнаар, 1987; Rebelo et al., 2013). В функциональном смысле гранулоциты также проявляют себя как зрелые клетки, демонстрируя максимально высокий уровень иммунологической активности (Carballal et al., 1997; Wootton et al., 2003; García-García et al., 2008; Le Foll et al., 2010; Andreyeva et al., 2019; Sendra et al., 2020). Часто в гемолимфе митилид выделяют еще один промежуточный структурный тип клеток, так называемые полу-гранулоциты (Ottaviani et al., 1998; García-García et al., 2008; Le Foll et al., 2010; Анисимова, 2012; Sendra et al., 2020). Такие же клетки обнаружены

и у других *Bivalvia*, например, у *Mercenaria mercenaria* и *Ruditapes philippinarum*, где эти клетки упоминаются как слабогранулярные гранулоциты (Allam et al., 2002). Мы не выделяли полугранулоциты мидии Грея в отдельный морфотип, хотя и использовали данный подход ранее для классификации гемоцитов *Modiolus kurilensis* (см.: Анисимова, 2012). Исходя из концепции одного клеточного типа, которая подразумевает наличие переходных форм (Mix, 1976; Ottaviani et al., 1998; Rebelo et al., 2013), мы относили такие клетки к гиалиноцитам либо к базофильным гранулоцитам. Альтернативная точка зрения о независимом происхождении гранулоцитов и гиалиноцитов предлагает рассматривать слабогранулированные клетки как опустевшие в результате дегрануляции зрелые гранулоциты (Cheng, 1981). Независимо от взглядов на гистогенетическую преемственность гиалиноцитов и гранулоцитов обе гипотезы сходятся в том, что созревание гранулярных клеток сопровождается замещением незрелых базофильных гранул зрелыми эозинофильными.

В исследованных нами выборках мидии Грея гранулоцитов, как правило, было значительно больше, чем агранулоцитов; доля гранулоцитов в циркуляции составляла от 40 до 100% летом и от 90 до 100% осенью при медианах более 95% в обоих случаях. Судя по литературным данным, преобладание гранулоцитов типично для митилид (Carballal et al., 1998; Wootton et al., 2003; Galimany et al., 2008; Le Foll et al., 2010; Анисимова, 2012), хотя имеются и противоположные данные (Andreyeva et al., 2019; Parrino et al., 2019), что можно объяснить различием условий, при которых были изучены моллюски. Пропорция гранулярных и агранулярных клеток может радикально изменяться в зависимости от свойств воды — температуры, солености, рН, уровня растворенного кислорода и наличия ксенобиотиков, при этом увеличение доли гиалиноцитов наблюдали в менее благоприятных условиях (Parrino et al., 2019). У отдельных особей мидии Грея, особенно в летних выборках, было снижено содержание эозинофильных гранулоцитов, хотя, как правило, именно они составляли большинство (медианы 82% летом и 88% осенью), иногда абсолютное (до 99%). В известных нам примерах эозинофильные гранулоциты не преобладали над остальными формами клеток. Так, в отношении *Mytilus galloprovincialis* сообщалось о $47.90 \pm 0.72\%$ эозинофилов при общем содержании гранулоцитов $84.48 \pm 0.43\%$ (Carballal et al., 1998); по другим данным у этого же вида большинство гранулоцитов имели базофильные гранулы (Andreyeva et al., 2019). В гемолимфе *Mytilus edulis* базофильные и эозинофильные гранулоциты были распределены в пропорции 47.57 ± 4.32 и $43.01 \pm 4.65\%$ соответственно (Wootton et al., 2003), по другим данным — 20–25 и 35–65% (Le Foll et al., 2010) или до 60% эозинофильных клеток в норме (Galimany et al., 2008). Для сравнения, у мидии Грея доля базофильных, нейтрофильных и эозинофильных гранулоцитов в осенней выборке составляла 10.93 ± 1.37 , 13.27 ± 2.98 и $74.10 \pm 2.89\%$ соответственно. Таким образом, на фоне других митилид *C. grayanus* демонстрирует рекордное преобладание высоко дифференцированных форм клеток. Отмеченное у некоторых особей уменьшение доли гранулоцитов, в том числе эозинофильных, может быть связано с миграцией зрелых фагоцитов в очаги поражения (Galimany et al., 2008) или в нерестовые гонады (Анисимова и др., 2017).

Методом проточной цитометрии гемоциты мидии Грея дифференцировались на четыре группы, обозначенные нами как регионы R1, R2, R3 и R4, которые различались размером (FSC) и гранулярностью (SSC) составляющих их клеток. Факт сильной прямой корреляции между FSC и SSC еще раз свидетельствует в пользу гипотезы Микса о последовательном созревании гиалиноцитов в гранулоциты, отражая структурные

преобразования клеток в ходе гемопоэза. Скоррелировав результаты световой микроскопии и проточной цитометрии, мы предлагаем следующую схему позиционирования клеток на гистограммах FSC vs SSC: гемобласты располагаются в регионе R1, гиалиноциты — R2, эозинофильные гранулоциты — R4 либо R3, в зависимости от их размера и функционального состояния. Сопоставление данных в каждом отдельном случае заставляет предполагать, что регионы R2 и R3 являются смешанными, регион R3, по-видимому, представлен гранулоцитами всех сортов, а регион R2 помимо гиалиноцитов содержит переходные формы клеток, в которых гранулы немногочисленны либо не визуализируются. С большой вероятностью, в регион R2 попадают упомянутые выше полугранулоциты, которые при микроскопическом анализе могли быть учтены как базофильные гранулоциты. При аналогичном распределении гемоцитов *M. galloprovincialis* на четыре “субпопуляции” авторы определили составляющие их клетки как: R1 — большие гранулярные клетки, R2 — большие полугранулярные клетки, R3 — малые полугранулярные клетки, R4 — малые агранулярные (или гиалиновые) клетки (García-García et al., 2008). В других работах в гемолимфе этого же вида удавалось выделить три структурных типа клеток: R1 — эозинофильные гранулоциты, R2 — базофильные полугранулоциты и R3 — гиалиноциты (Le Foll et al., 2010; Sendra et al., 2020) или только два типа — гранулоциты и гиалиноциты (Andreyeva et al., 2019; Parrino et al., 2019). Гемоциты *M. kurilensis* также разделялись преимущественно на три группы при следующем соответствии: R1 — гиалиноциты (малые и большие), R2 — полугранулоциты и R3 — гранулоциты (Анисимова, 2012). Похожие результаты получены для *M. mercenaria* и *R. philippinarum*: к группе А преимущественно были отнесены гранулоциты (с примесью больших вакуолизированных агранулоцитов), к группе В — агранулоциты (с примесью слабогранулярных гранулоцитов), а промежуточная группа С содержала микс из слабогранулярных гранулоцитов и наиболее крупных вакуолизированных агранулоцитов (Allam et al., 2002). Очевидно, что во всех этих работах разными терминами обозначены одни и те же клетки. С одной стороны, поскольку гранулы развиваются постепенно, молодые гранулоциты на гистограммах FSC vs SSC ожидаемо заполняют пространство между агранулярными и гранулярными клетками. С другой стороны, эту область могут занимать и вполне зрелые гранулоциты, находящиеся в состоянии дегрануляции (Allam et al., 2002; Mateo et al., 2009; Rebelo et al., 2013). Так, перемещение гранулоцитов в облако гиалиноцитов наблюдали у *Mya arenaria* в ответ на воздействие патогенных микроорганизмов, вызывавших дегрануляцию и уменьшение количества лизосом (Mateo et al., 2009).

Высвобождение гранул сопровождалось их смещением в периферическую область цитоплазмы (Foley, Cheng, 1977), что было отмечено нами в некоторых нейтрофильных и эозинофильных гранулоцитах мидии Грея. Перед экзоцитозом гранулы могут сливаться (Rebelo et al., 2013), что также меняет физические свойства цитоплазмы гранулоцитов. Следовательно, положение гранулоцитов на графиках светорассеяния является динамичным и определяется индивидуальным иммунным статусом моллюска. Следует отметить, что наибольшее число корреляций между содержанием клеток определенных морфотипов и количеством событий в определенных регионах было получено в осенней выборке мидий. Летние выборки показали высокую степень смешанности регионов и перемещение части гранулоцитов в область R2, что приходится объяснять более высокой иммунологической активностью гемоцитов в этот период, а также увеличением числа молодых клеточных форм. Кроме того, сперматозоиды, присутствующие в летних пробах гемолимфы, оккупируют регион R1, смешиваясь в его составе с гемобластами. Впрочем, и в осенних образцах при крайне низком содержании гемобластов регион R1 был выражен отчетливо, что, скорее всего, можно объяснить наличием в пробах клеточных фрагментов и/или недоучетом малых клеток на микроскопических препаратах в условиях небольшой выборки.

Оценка содержания ДНК в ядрах гемоцитов мидии Грея не выявила признаков значимой пролиферации, в том числе и среди гемобластов, которые, как было показано для *R. philippinarum* (Matozzo et al., 2008; Cima, Matozzo, 2018), способны к размножению в гемолимфе даже в отсутствие иммунной стимуляции. Роль “пролиферативного компартмента” клеточной популяции гемоцитов *Bivalvia* традиционно отводится агранулоцитам со времен классических работ Микса (Mix, 1976) с применением тимицидиновой автордиографии; на этом была основана его модель гемопоэза с одним клеточным типом. В то же время, у *M. edulis* наблюдали включение меченых предшественников синтеза ДНК исключительно в базофильные гранулоциты (Renwrantz et al., 2013). В любом случае отсутствие митозов при малом количестве бластных форм в гемолимфе мидии Грея может говорить либо о низких темпах обновления клеточной популяции гемоцитов, либо о нарушении процесса пролиферации в связи с какими-то неблагоприятными факторами. В настоящей работе были исследованы мидии из фоновых акваторий, однако во многих образцах клетки всех размеров и всех уровней гранулярности формировали распределения, соответствующие патологиям митотического цикла — анеуплоидии и полиплоидии, что подтверждалось картинами двуядерности, в том числе в терминально дифференцированных

эозинофильных гранулоцитах. Теоретически такие картины могли быть отражением протекающей телофазы, однако других митотических фигур не было обнаружено. Клетки сохраняли черты дифференцировки и не имели признаков атипии, поэтому мы склонны расценивать двуядерность как следствие давнего незавершенного митоза. Гемоциты с увеличенным содержанием ДНК имели более высокие показатели бокового светорассеяния, что можно объяснить повышением уровня структурной сложности клеток в связи с удвоением ядра. Гемоциты с содержанием ДНК менее $2c$, напротив, теряли в показателях светорассеяния. Таким образом, появление в популяции гемоцитов с измененным состоянием генетического аппарата может влиять на плотность и позицию отдельных регионов. Эти эффекты было бы полезно рассмотреть с точки зрения поиска биомаркеров для массового скрининга на анеуплоидию, которая часто ассоциирована с генотоксическим действием среды (Piló et al., 2017).

Интересными оказались некоторые корреляции, полученные при сопоставлении количества клеток разных структурных типов. На отрезках “гемобласт (R1) — гиалиноцит (R2)” и “гиалиноцит (R2) — базофильный гранулоцит (R3)” выявлены прямые корреляции, что демонстрирует кинетику обратной положительной связи на этапе ранней дифференцировки клеток. Обратные же корреляции содержания эозинофильных гранулоцитов и остальных (базофильных) форм клеток по отдельности, всех гранулоцитов и гемобластов, а также клеток в регионе R4 и во всех остальных регионах, судя по всему, объясняются обратной отрицательной связью, по принципу которой регулируется тканевой гомеостаз. Описанные корреляции могут отражать соотношение процессов репродукции и дифференцировки клеток в популяции гемоцитов мидии Грея и подтверждают схему гемопоэза с одним клеточным типом (Mix, 1976; Ottaviani et al., 1998; Rebelo et al., 2013). Чем больше терминально дифференцированных клеток в популяции, тем меньше в ней молодых клеточных форм и, вероятно, тем ниже скорость ее обновления. Повышение количества базофилов, напротив, должно указывать на активное обновление популяции, что подтверждается прямой корреляцией между содержанием базофильных гранулоцитов и общим количеством клеток в гемолимфе. В этой связи напомним, что у *M. edulis* базофильные гранулоциты обнаруживали способность к репликации ДНК (Renwrantz et al., 2013), а в гемолимфе мидии Грея ни один из структурных типов клеток не показал митотическую активность, хотя в отдельных случаях наблюдали картины незавершенного асимметричного митоза.

На основании результатов исследования можно предположить, что вид *S. grayanus* реализует

стратегию, направленную на длительное сохранение клеток, что согласуется с высокой продолжительностью жизни моллюска и может быть связано с эффективной антиоксидантной защитой (Strahl, Abele, 2010). Развитие данного предположения мы видим в анализе возрастной динамики клеточной популяции гемоцитов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую признательность ст. н. с. Лаборатории физиологии ННЦМБ ДВО РАН В.Я. Кавуну за содействие в сборе материала и ст. н. с. Лаборатории клеточных технологий ННЦМБ ДВО РАН А.В. Бороде за организацию работы на проточном цитометре CytoFLEX.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Анисимова А.А. Идентификация клеточных субпопуляций гемоцитов *Modiolus kurilensis* (Bernard, 1983) (Bivalvia: Mytilidae) методами проточной цитометрии и световой микроскопии // Биол. моря. 2012. Т. 38. № 5. С. 400–408.
- Анисимова А.А. Морфофункциональные параметры гемоцитов в оценке физиологического состояния двустворчатых моллюсков // Биол. моря. 2013. Т. 39. № 6. С. 389–399.
- Анисимова А.А., Пономарева А.Л., Гринченко А.В. и др. Состав и сезонная динамика клеточной популяции гемоцитов двустворчатого моллюска *Corbicula japonica* Prime, 1864 из эстуария реки Киевка (бассейн Японского моря) // Биол. моря. 2017. Т. 43. № 2. С. 125–132.
- Дзюба С.М., Романова Л.Г. Морфология амёбоцитов гемолимфы приморского гребешка // Цитология. 1992. Т. 34. № 10. С. 52–54.
- Кавун В.Я., Шулькин В.М. Изменение микроэлементного состава органов и тканей двустворчатого моллюска *Crenomytilus grayanus* при акклиматизации в биотопе, хронически загрязненном тяжелыми металлами // Биол. моря. 2005. Т. 31. № 2. С. 123–128.
- Ковалев Н.Н., Костецкий Э.Я., Веланский П.В. и др. Оценка стабильности жирнокислотного состава основных мембранных липидов мидии Грея *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) (Bivalvia: Mytilidae) в условиях хронического антропогенного загрязнения // Биол. моря. 2019. Т. 45. № 2. С. 114–124.
- Явнов С.В. Атлас двустворчатых моллюсков дальневосточных морей России. Владивосток: Дюма. 2000. 168 с.
- Allam B., Ashton-Alcox K.A., Ford S.E. Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs // Fish Shellfish Immunol. 2002. V. 13. P. 141–158.
- Andreyeva A.Y., Efremova E.S., Kukhareva T.A. Morphological and functional characterization of hemocytes in cultivated mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and effect of hypoxia on hemocyte parameters // Fish Shellfish Immunol. 2019. V. 89. P. 361–367.
- Carballal M.J., López C., Azevedo C., Villalba A. In vitro study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. haemocytes // Fish Shellfish Immunol. 1997. V. 7. P. 403–416.
- Carballal M.J., Villalba A., López C. Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development, and parasitism on the hemogram of *Mytilus galloprovincialis* // J. Invertebr. Pathol. 1998. V. 72. P. 304–312.
- Cheng T.C. Bivalves. In: Invertebrate blood cells. Eds. N.A. Ratcliffe, A.E. Rowley. London: Academic Press. 1981. V. 2. P. 233–300.
- Cima F., Matozzo V. Proliferation and differentiation of circulating haemocytes of *Ruditapes philippinarum* as a response to bacterial challenge // Fish Shellfish Immunol. 2018. V. 81. P. 73–82.
- Estrada N., Velázquez E., Rodríguez-Jaramillo C., Ascencio F. Morphofunctional study of hemocytes from lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus* // Immunobiology. 2013. V. 218. № 8. P. 1093–1103.
- Farrington J.W., Tripp B.W., Tanabe S. et al. Edward D. Goldberg's proposal of "the Mussel Watch": Reflections after 40 years // Mar. Pollut. Bull. 2016. V. 110. P. 501–510.
- Foley D.A., Cheng T.C. Degranulation and other changes of molluscan granulocytes associated with phagocytosis // J. Invertebr. Pathol. 1977. V. 29. № 3. P. 321–325.
- Galimany E., Place A.R., Ramón M. et al. The effects of feeding *Karlodinium veneficum* (PLY # 103; *Gymnodinium veneficum* Ballantine) to the blue mussel *Mytilus edulis* // Harmful Algae. 2008. V. 7. № 1. P. 91–98.
- García-García E., Prado-Álvarez M., Novoa B. et al. Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families // Dev. Comp. Immunol. 2008. V. 32. P. 637–653.
- Kavun V.Y., Yurchenko O.V., Podgurskaya O.V. Integrated assessment of the acclimation capacity of the marine bivalve *Crenomytilus grayanus* under naturally highly contaminated conditions: Subcellular distribution of trace metals and structural alterations of nephrocytes // Sci. Total Environ. 2020. V. 739. Art. ID 139015. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139015>
- Le Foll F., Rioult D., Boussa S., Pasquier J. Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging // Fish Shellfish Immunol. 2010. V. 28. № 2. P. 372–386.
- Mateo D.R., Spurmanis A., Siah A. et al. Changes induced by two strains of *Vibrio splendidus* in haemocyte subpopulations of *Mya arenaria*, detected by flow cytometry

- with LysoTracker // *Dis. Aquat. Org.* 2009. V. 86. № 3. P. 253–262.
- Matozzo V., Marin M.G., Cima F., Ballarin L.* First evidence of cell division in circulating haemocytes from the Manila clam *Tapes philippinarum* // *Cell Biol. Int.* 2008. V. 32. № 7. P. 865–868.
- Mix M.C.* A general model for leukocyte cell renewal in bivalve mollusks // *Mar. Fish. Rev.* 1976. V. 38. № 10. P. 37–41.
- Ottaviani E., Franchini A., Barbieri D., Kletsas D.* Comparative and morphofunctional studies on *Mytilus galloprovincialis* hemocytes: Presence of two aging-related hemocyte stages // *Ital. J. Zool.* 1998. V. 65. № 4. P. 349–354.
- Parrino V., Costa G., Cannavà C. et al.* Flow cytometry and micro-Raman spectroscopy: Identification of hemocyte populations in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae) from Faro Lake and Tyrrhenian Sea (Sicily, Italy) // *Fish Shellfish Immunol.* 2019. V. 87. P. 1–8.
- Piló D., Carvalho S., Pereira P. et al.* Is metal contamination responsible for increasing aneuploidy levels in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*? // *Sci. Total Environ.* 2017. V. 577. P. 340–348.
- Rebello M.d.F., Figueiredo E.d.S., Mariante R.M. et al.* New insights from the oyster *Crassostrea rhizophorae* on bivalve circulating hemocytes // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 2. Art. ID e57384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057384>
- Renault T.* Immunotoxicological effects of environmental contaminants on marine bivalves // *Fish Shellfish Immunol.* 2015. V. 46. № 1. P. 88–93.
- Renwantz L., Siegmund E., Woldmann M.* Variations in hemocyte counts in the mussel, *Mytilus edulis*: Similar reaction patterns occur in disappearance and return of molluscan hemocytes and vertebrate leukocytes // *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* 2013. V. 164. P. 629–637.
- Sendra M., Carrasco-Braganza M.I., Yeste P.M. et al.* Immunotoxicity of polystyrene nanoplastics in different hemocyte subpopulations of *Mytilus galloprovincialis* // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. Art. ID 8637. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65596-8>
- Sminia T., van der Knaap W.P.W.* Cells and molecules in molluscan immunology // *Dev. Comp. Immunol.* 1987. V. 11. P. 17–28.
- Strahl J., Abele D.* Cell turnover in tissues of the long-lived ocean quahog *Arctica islandica* and the short-lived scallop *Aequipecten opercularis* // *Mar. Biol.* 2010. V. 157. № 6. P. 1283–1292.
- Sun J., Guo Y., Wang A. et al.* Flow cytometric analysis of the defense functions of hemocytes from oyster (*Crassostrea ariakensis*) // *Int. J. Agric. Biol.* 2018. V. 20. P. 1413–1418.
- Wootton E.C., Dyrinda E.A., Ratcliffe N.A.* Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*) // *Fish Shellfish Immunol.* 2003. V. 15. P. 195–210.

Composition and Kinetics of Hemocyte Population in the Mussel *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853)

A. A. Anisimova^a, M. N. Diagleva^a, O. A. Karusheva^a, A. V. Sinenko^a, and I. A. Dmitrieva^a

^aCell Biology and Genetics Department, Institute of the World Ocean, Far Eastern Federal University, Vladivostok 690922, Russia

Based on light microscopy data, hemocytes of *Crenomytilus grayanus* are classified into five morphological types common for Bivalvia. In the stage of sexual inertia (late October), the proportions of the cell types are as follows: (1) hemoblasts ($0.2 \pm 0.1\%$), (2) hyalinocytes ($1.9 \pm 0.3\%$), and also (3) basophilic ($10.9 \pm 1.4\%$), (4) neutrophilic ($13.3 \pm 3.0\%$), and (5) acidophilic ($74.1 \pm 2.9\%$) granulocytes. All hemocytes are divided into four groups on the basis of their size (FSC) and complexity (SSC) by flow cytometry. A correlation analysis has shown that R1 corresponds to hemoblasts, R2 to hyalinocytes, and R4 to granulocytes and their acidophilic forms. However, these correlations are not observed in the summer season. The hemocyte morphology and quantitative relationships between their structural types confirm the Mix's hematopoietic model which postulates a histogenetic continuity of hyalinocytes and granulocytes. The arrangement of cells in the light-scatter dot plots (FSC vs. SSC) indicates their maturity stage, depends on functional status, and may change with disturbances of the mitotic cycle. The hemocyte population in *C. grayanus* shows a low rate of renewal and a dominance of acidophilic granulocytes (up to 99% of all cells in the sexual inertia stage), which suggests a strategy targeted at long-term maintenance of highly differentiated cells and is consistent with high life expectancy of the species.

Keywords: hemocytes, hematopoiesis, histogenesis, *Crenomytilus grayanus*, Mytilidae, Bivalvia