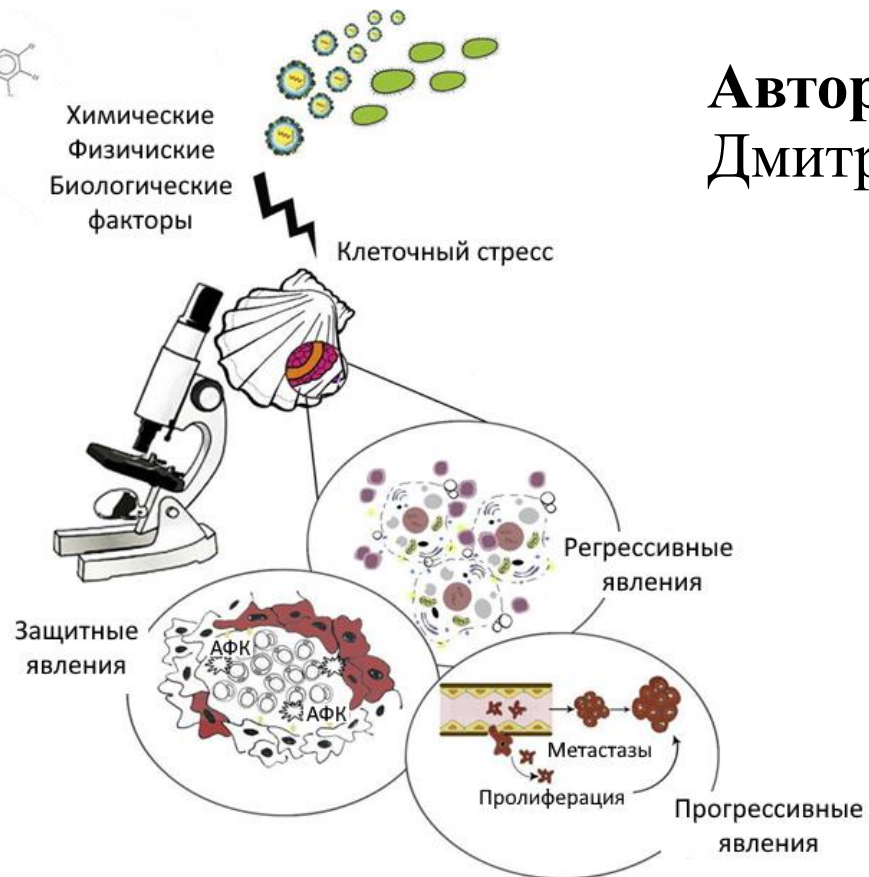


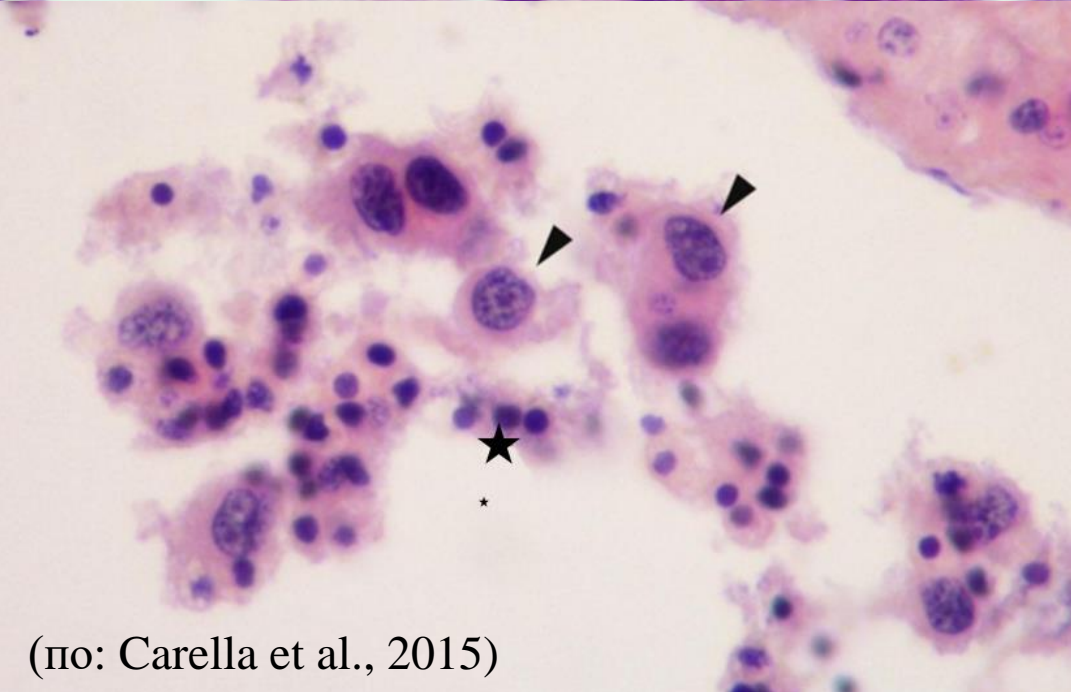
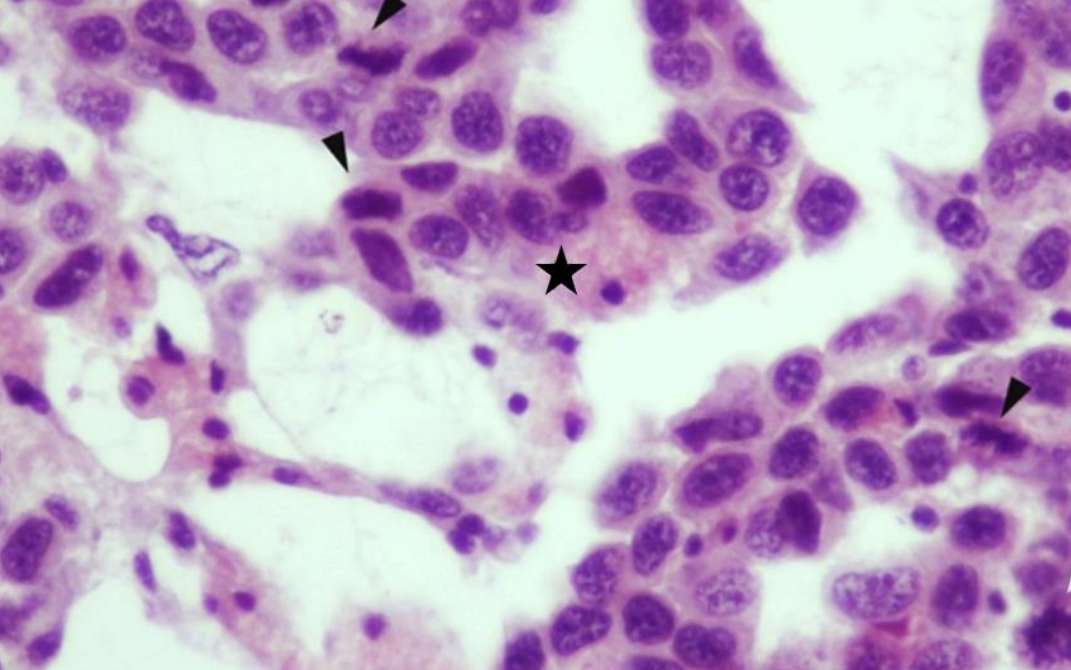
Дальневосточный федеральный университет, Институт
Мирового океана, Кафедра клеточной биологии и генетики

К ВОПРОСУ О ВОЗМОЖНОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ЛЕЙКЕМИЯ-ПОДОБНОГО РАКА В ПРИМОРСКИХ ПОПУЛЯЦИЯХ ГРЕБЕШКА *MIZUNOPRESTEN YESSOENSIS*

Авторы: Дягилева М.Н. (докладчик),
Дмитриева И.А., Анисимова А.А.

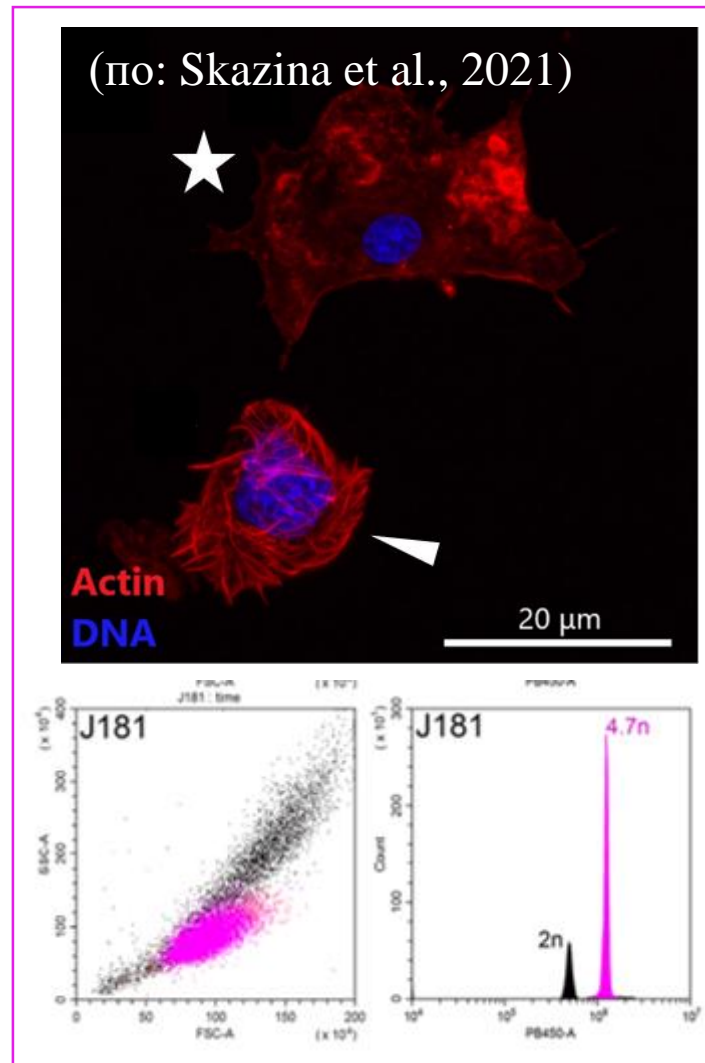


г. Владивосток



Характерная черта диссеминированной неоплазии (ДН) у двустворчатых моллюсков – наличие крупных анапластических клеток округлой формы с высоким ЯЦО в соединительной ткани, гемальных сосудах и пазухах внутренних органов:

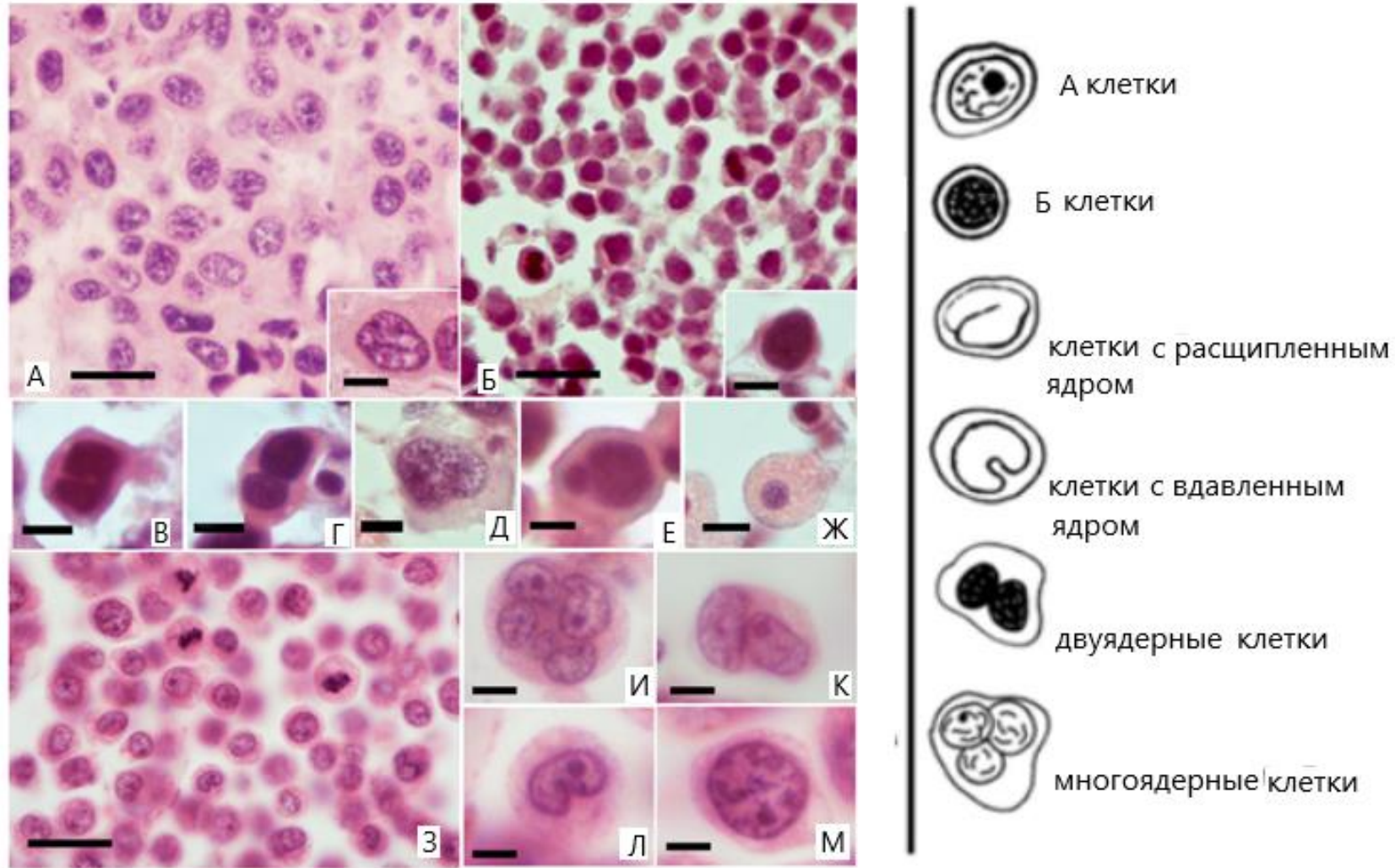
- гипертрофированные и гиперхроматические ядра;
- реорганизация цитоскелета и потеря адгезивных свойств;
- повышенная митотическая активность;
- повышенное содержание гликогена;
- изменение ультраструктуры митохондрий;
- увеличение числа хромосом.



(по: Carella et al., 2015)

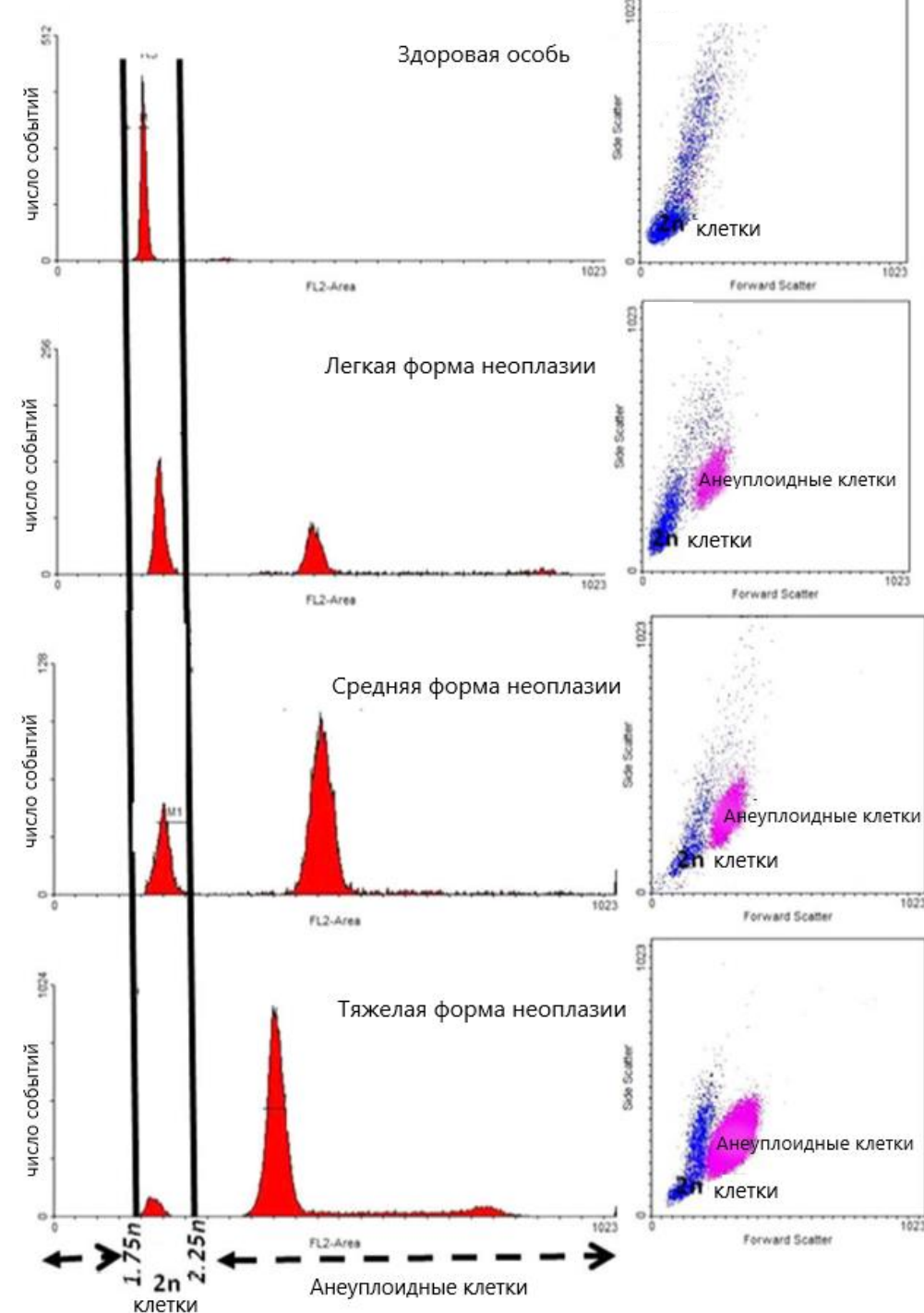
Звездочками указаны нормальные гемоциты, **стрелками** – неопластические клетки

ДН может проявляться разными морфотипами клеток:



Разные клеточные линии,
или разные стадии ДН?

Морфология опухолевых клеток у (А-Е) *Mytilus galloprovincialis* и (Ж—М) *Cerastoderma edule*. (А, Б) Клетки А- и В-типа. (В) Клетка с расщепленным ядром. (Г) Двухъядерная клетка. (Д) Многоядерная гигантская клетка с не менее чем 3 ядрами, дисперсным хроматином и видимыми ядрышками. (Е) Клетка с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. (Ж) Нормальные гемоциты: иалоноциты и гранулоциты. (З—М) (по: Carella et.al., 2013).



Генотипы клеток ДН генетически нестабильны, демонстрируя анеу- или полиплоидные значения массы ДНК, до $8c$ и выше.

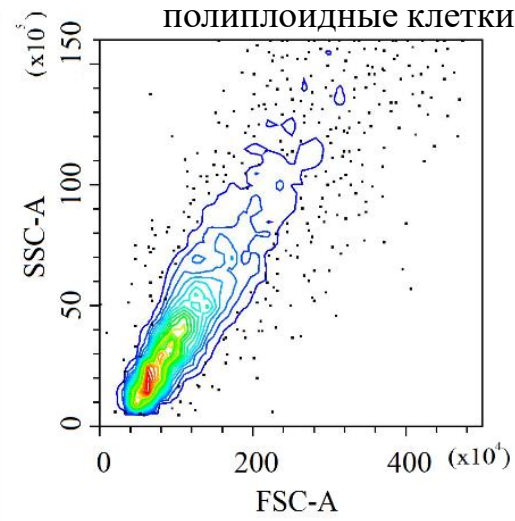
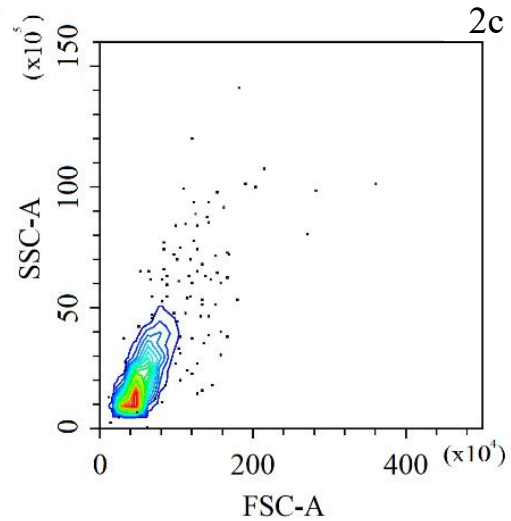
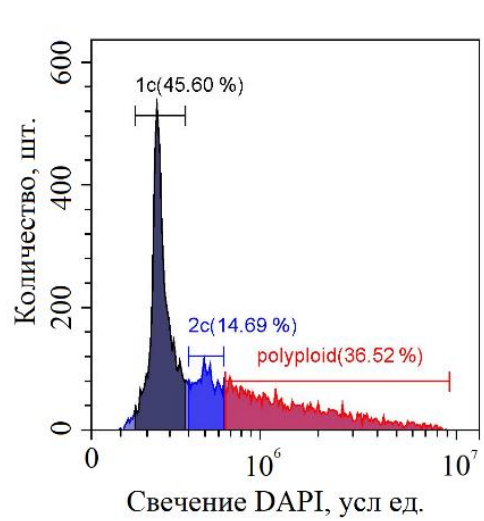
Процесс **малигнизации** может начинаться со стадии хаотической дестабилизации хромосомного набора с последующей селекцией клонов, закрепляющей определенные устойчивые уровни ploидности

Дублирование хромосом может позволить опухолевым клеткам быстро **адаптироваться** к изменениям окружающей среды за счет интенсивного **селективного давления**

Примеры гистограмм проточной цитометрии клеток гемолимфы *Cerastoderma edule*. Пики представляют собой распределение одиночных клеток в соответствии с содержанием ДНК. Маркеры ploидности $1,75n$ и $2,25n$ разграничивают ворота нормальных диплоидных клеток. Клетки вне этих ворот считались анеуплоидными и, следовательно, неопластическими (по: Le Grand et. al., 2010).

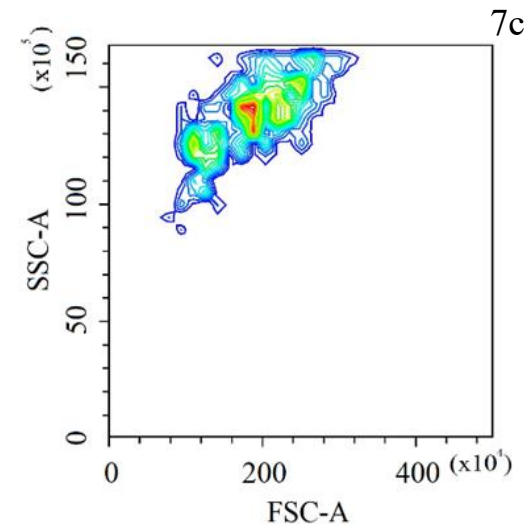
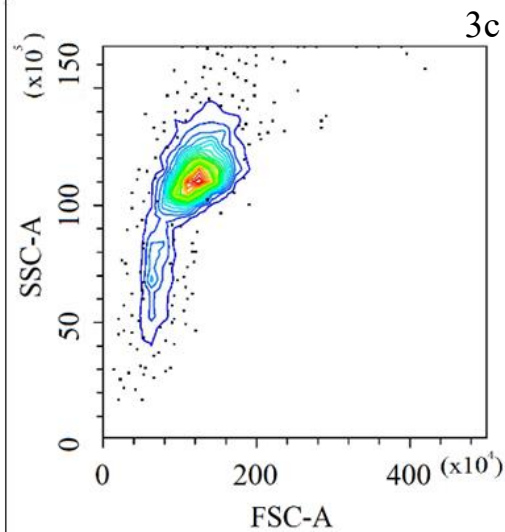
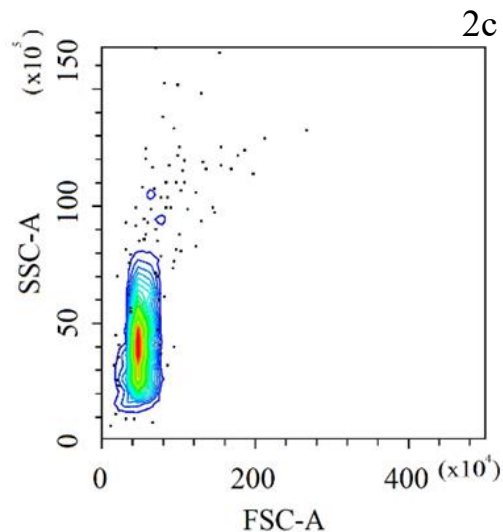
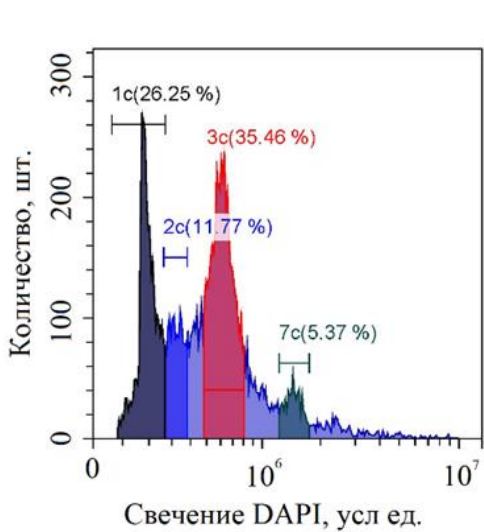


Характеристика гемоцитов гребешка *M. yessoensis* методом проточной-ДНК цитометрии.

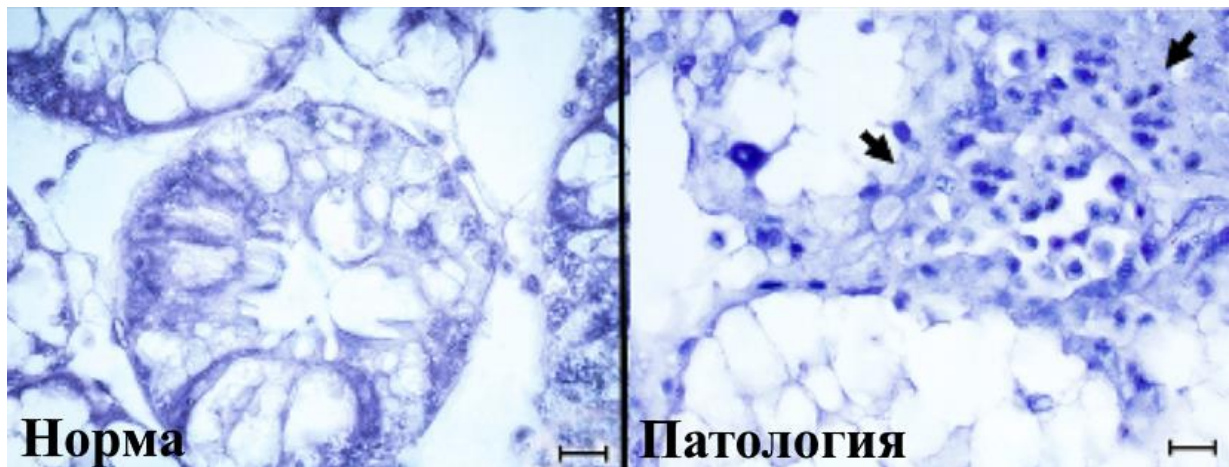


← промежуточная стадия неоплазии ?

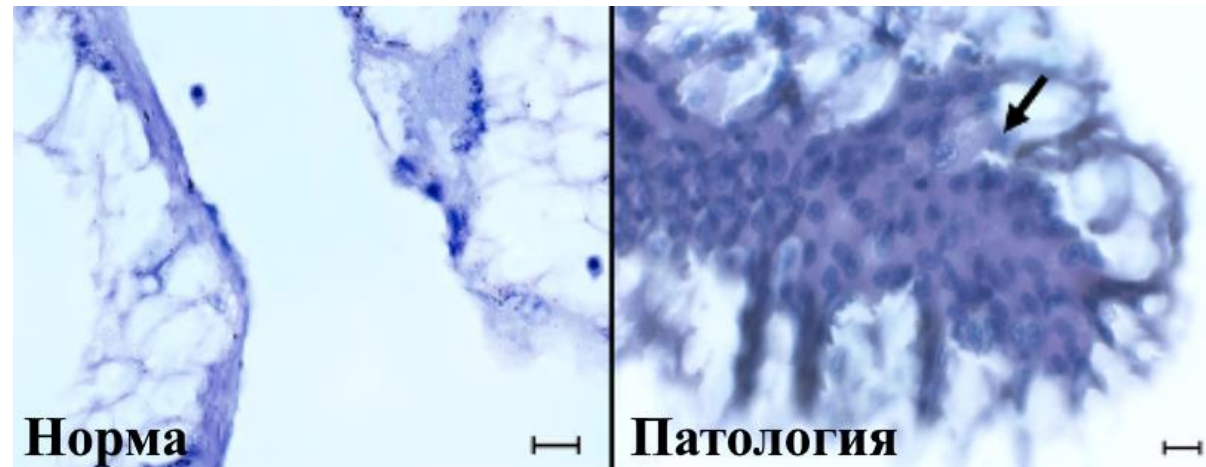
ПОЗДНЯЯ СТАДИЯ неоплазии ?



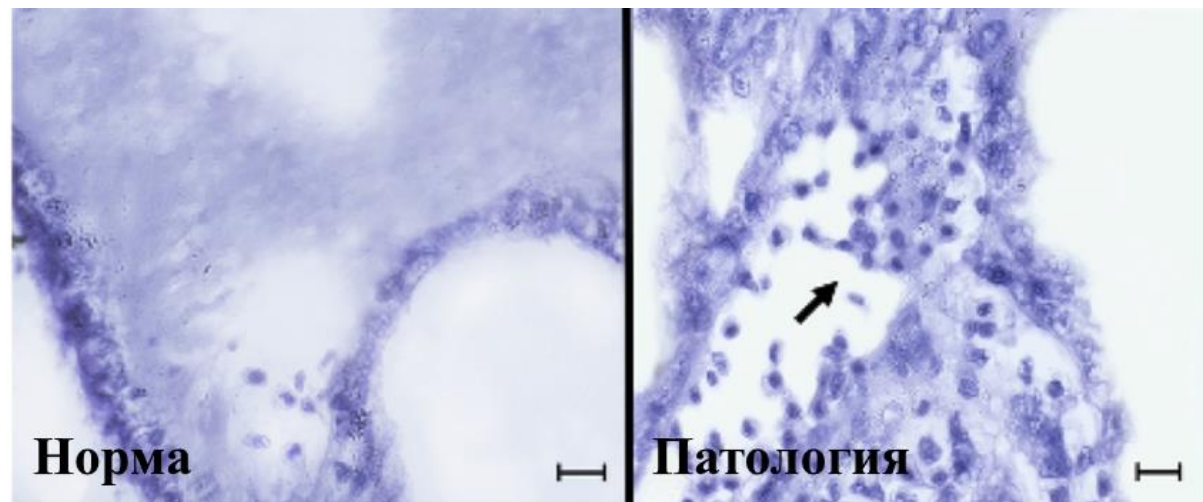
Гистологический анализ органов у особей гребешка *M. yessoensis* с атипичными гемоцитами



Норма Патология
Пищеварительная железы



Норма Патология
Почка



Норма Патология
Жабра

Окраска: гематоксилин-эозин

Масштабная линейка: 20 мкм

Стрелками указаны очаги инфильтрации гемоцитами атипичной морфологии

Морфология нормальных и атипичных гемоцитов у гребешков *M. yessoensis* б. Витязь.

а – гемобласты;

б – гиалиноциты с выраженными ламеллоподиями (б1) и филлоподиями (б2);

в – атипичные гемоциты типа А веретеновидной (в1), каплевидной (в2) и неправильной (в3) формы;

г – атипичные гемоциты типа Б с округлыми (г1), бобовидными (г2) и расщипленными (г3) ядрами;

д – двухъядерные атипичные гемоциты;

е – гемоциты со специфической гранулообразными включениями;

ж1 – гемоциты с гранулярной организацией хроматина;

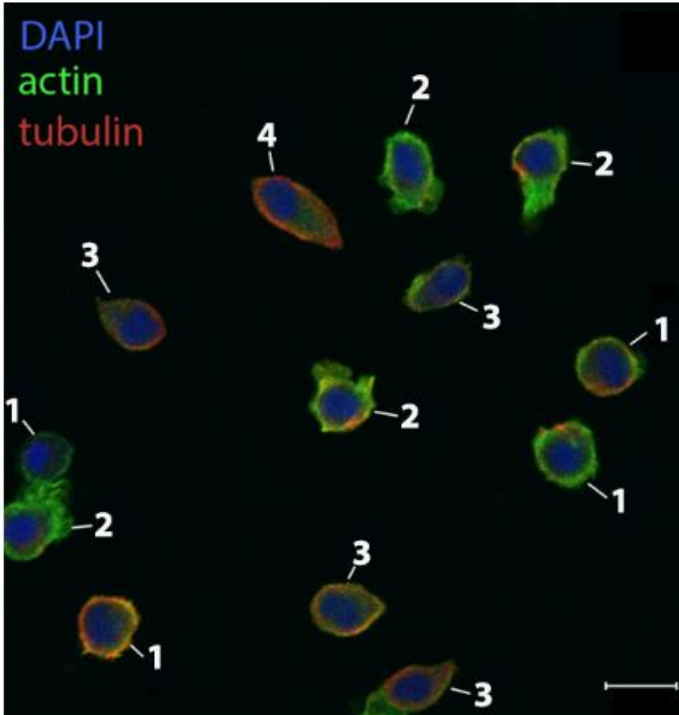
ж2 – гемоциты с картинами деструкции ядра

Для сравнения:



Нормальные гемоциты *M.* при их распластовании на стекле (по: Karetin, 2010)

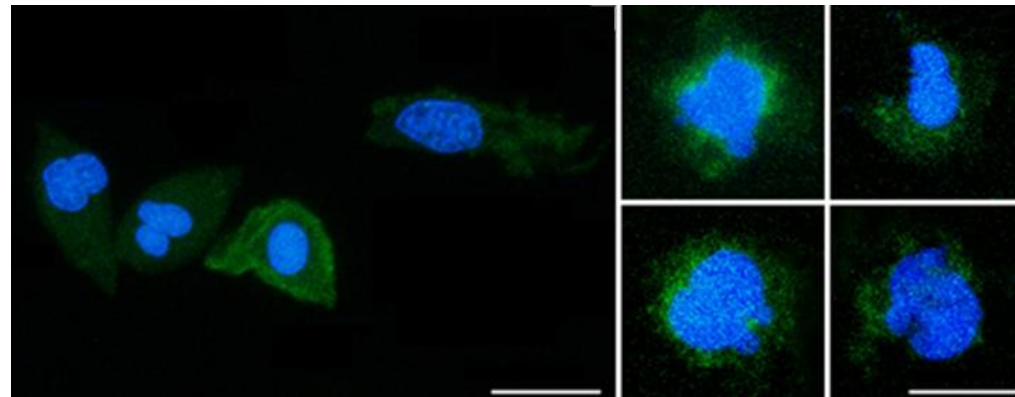
Организация актинового цитоскелета в атипичных клетках А и Б у гребешков *M. yessoensis* из б. Гайдамак



- 1 – округлые гемоциты,
- 2 – подиальные гемоциты,
- 3 – каплевидные гемоциты,
- 4 – веретеновидные гемоциты;

А-тип

Б-тип

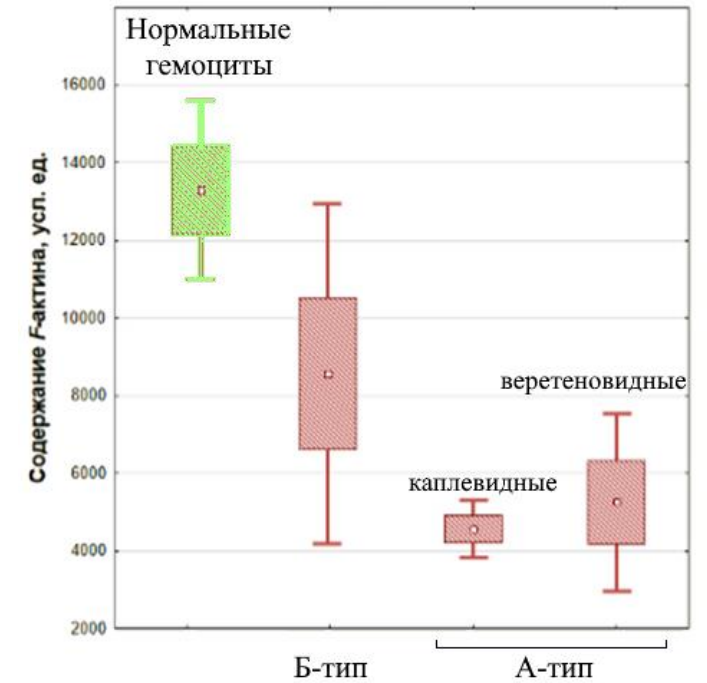


Тип А – каплевидные и веретеновидные клетки,

Тип Б – преимущественно округлые клетки с гигантским плеоморфным ядром. Конфокальная микроскопия.

Окраска: *синий* – DAPI, *зеленый* – родамин-фаллоидин.

Масштабная линейка 10 мкм.



Суммарное содержание **F-актина**, определенное методом конфокальной микроскопии на полнообъемных изображениях гемоцитов во всех типах **атипичных** клеток **было ниже**, чем в **нормальных**

Выбор морфометрических параметров для анализ клеток гемолимфы у гребешков *M. yessoensis* из б. Витязь



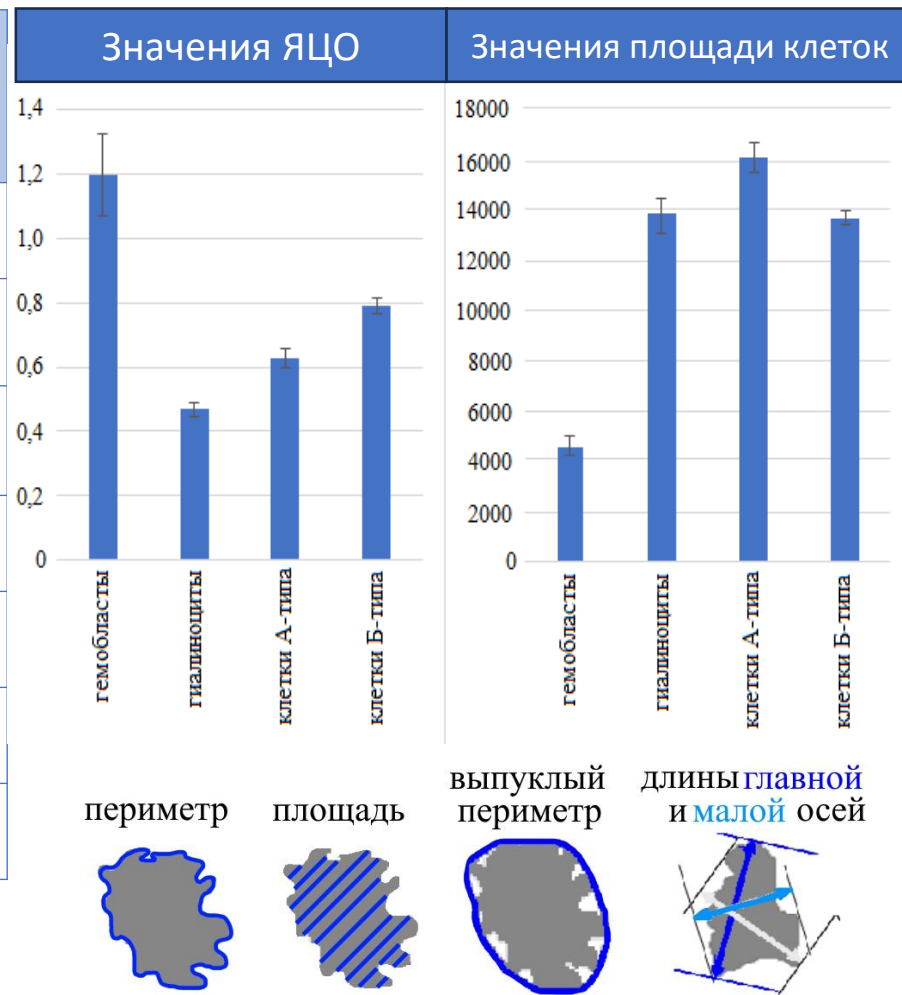
№	Название параметра	Расшифровка математического смысла параметра
1	Периметр	Общее количество пикселей вокруг границы выделенного объекта
2	Площадь	Фактическое количество пикселей в выделенном объекте за исключением всех отверстий, которые содержит данный объект
3	Компактность	Если компактность приближается к единице, то можно судить, что выпуклых и вогнутых частей у структуры нет
4	Выпуклость	Параметр, определяемый как выпуклый периметр, деленный на периметр Крофтона
5	Длина главной оси	Расстояние между двумя максимально удалёнными точками на границе объекта
6	Длина малой оси	Расстояние между двумя максимально приближенными точками на границе объекта
7	Форм-фактор	Описывает форму области (форм-фактору идеальной окружности присваивается значение 1)

формула компактности: $\frac{4 \cdot \pi \cdot \text{площадь}}{\text{выпуклый периметр}^2}$

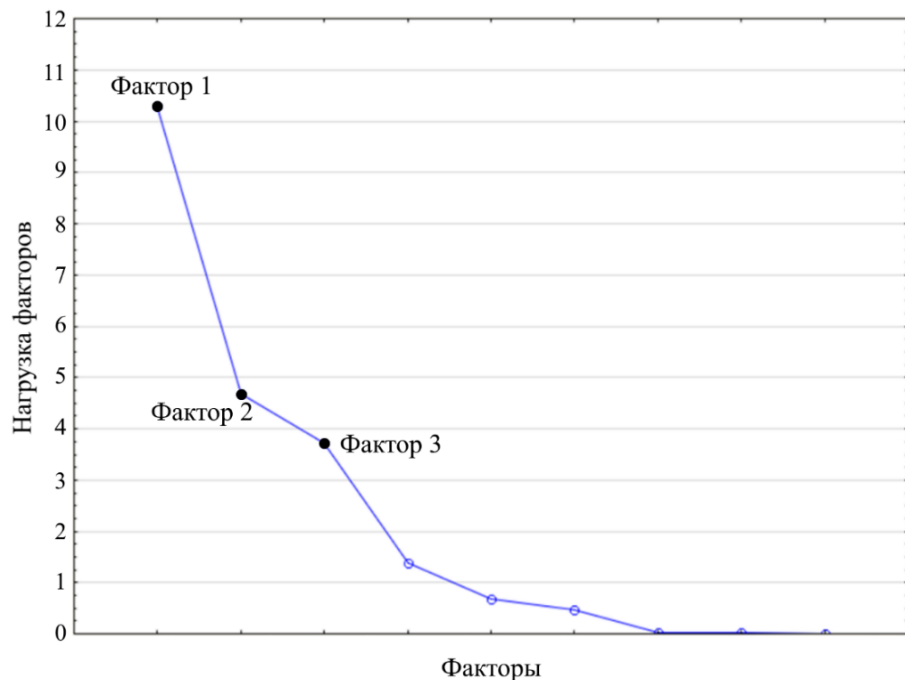
формула выпуклости: $\frac{\text{выпуклый периметр}}{\text{периметр Крофтона}}$

формула форм-фактора: $4 \cdot \pi \cdot \frac{\text{площадь}}{\text{периметр Крофтона}^2}$

*Периметр Крофтона связывает длину кривой со средним числом пересечений с прямыми



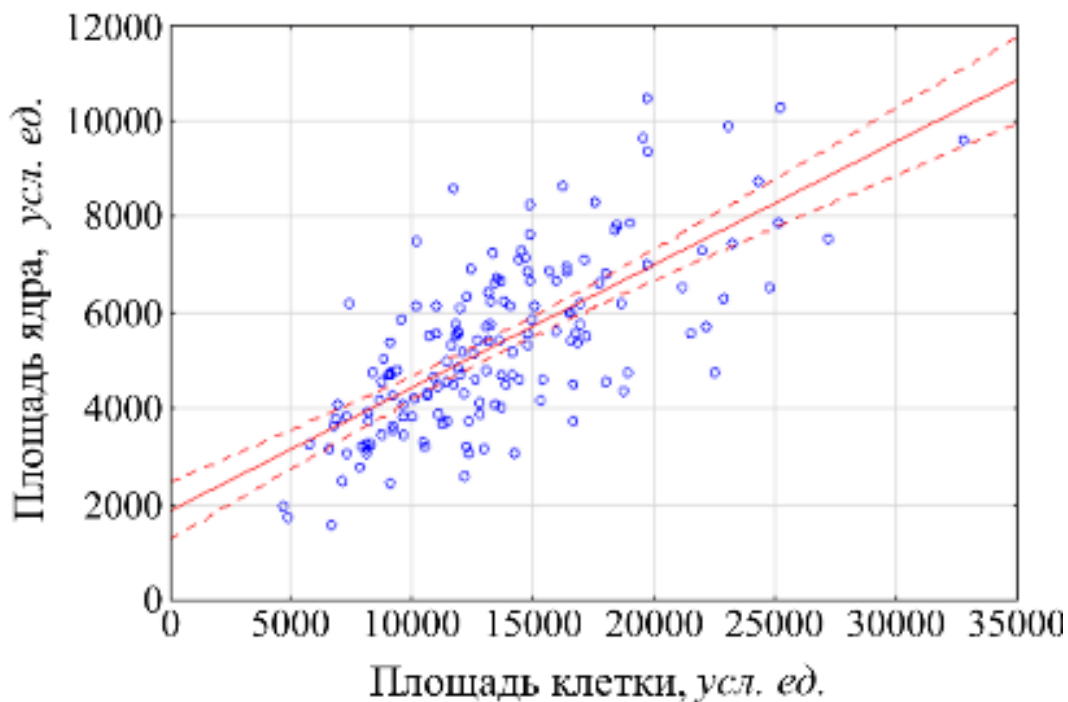
Оценка диагностической значимости переменных и анализ корреляционных связей между параметрами гемоцитов



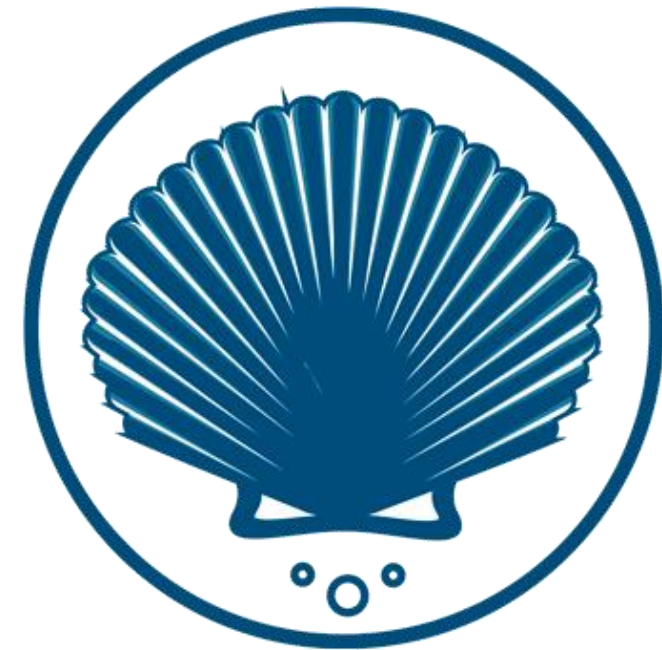
Фактор 1 - (42.9 % влияния на общую дисперсию) площади, периметра, длины главной оси и длины малой оси клеток и их ядер

Фактор 2 - (19.6 %) округлость, компактность и форм-фактор клетки

Фактор 3 - (15.5 %) округлость, компактность и форм-фактор ядра



($r = 0.70$ при $p < 0.05$)



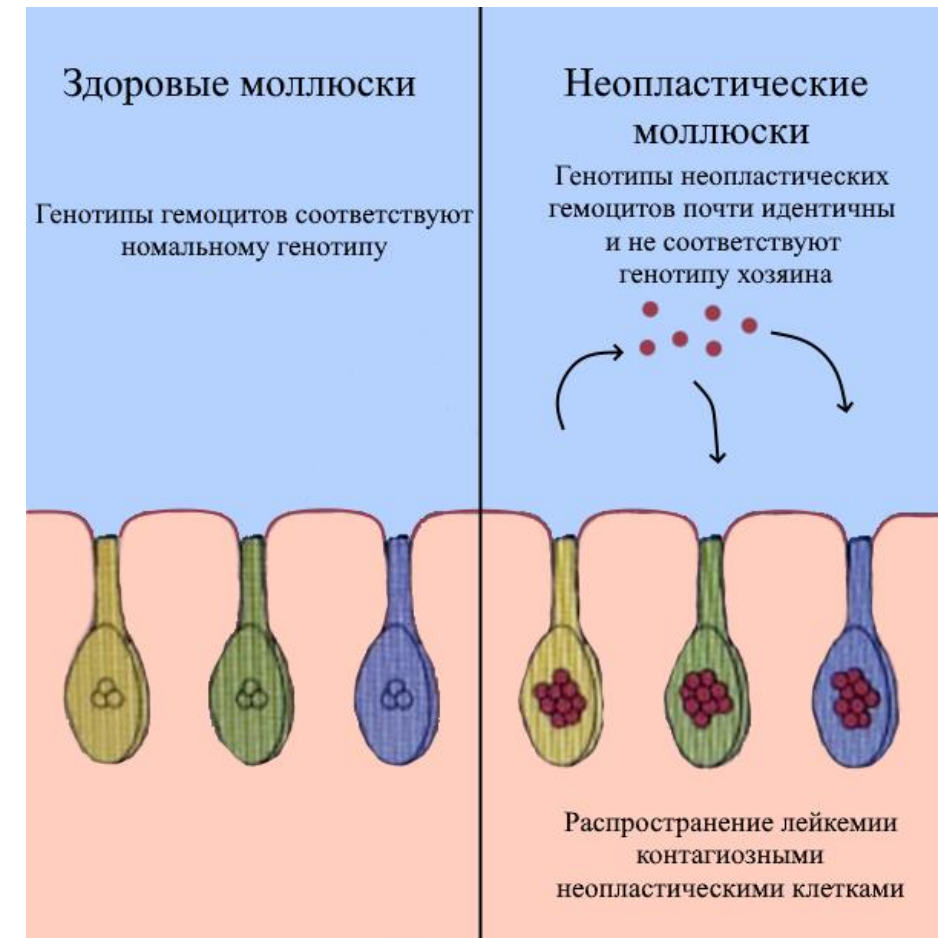
СПАСИБО ЗА
ВНИМАНИЕ!

Диссемиринованная неоплазия (лейкемия-подобный рак/гемическая неоплазия) - заболевание, характеризующееся нарушением пролиферации клеток гемолимфы и опухолевыми новообразованиями.*

Основные черты заболевания:

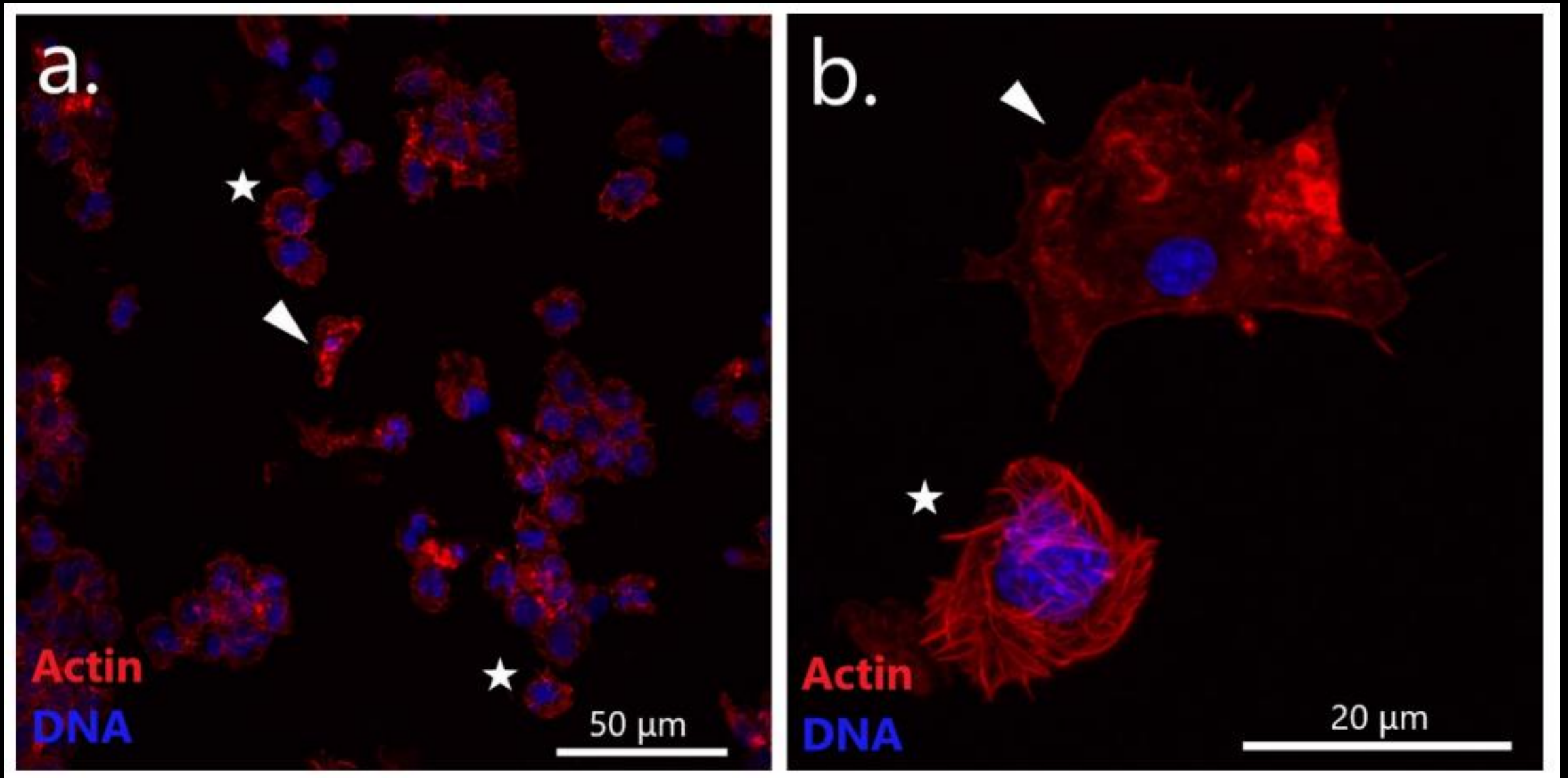
- аномальная пролиферация гемоцитов;
- ухудшение здоровья и приспособленности двустворчатых моллюсков;
- массовая гибель.

Возбудители заболевания — **контагиозные злокачественные клеточные линии**, способные заражать не только особей внутри популяции, но и преодолевать видовые барьеры между двустворчатыми моллюсками.**



*Впервые сообщил Фарлей в 1969 году у *Mytilus edulis*

**Впервые предположил Мецгер, 2015 год



Изображения конфокальной микроскопии гемоцитов мидии *Mytilus trossulus*, окрашенных **DAPI** (синий) и фаллоидином, меченным **TRITC** (красный). Стрелки указывают на нормальные распластанные гемоциты с небольшим компактным ядром. Звездочками отмечены неопластические анеуплоидные круглые клетки с крупным дольчатым ядром и измененным актиновым цитоскелетом (по: Skazina et al., 2021).

ВЫВОДЫ

1. В гемолимфе гребешка *M. yessoensis* помимо обычных гемоцитов были выделены две популяции крупных клеток атипичной формы с высоким ЯЦО – типы А и Б. К типу А были отнесены веретеновидные или каплевидные клетки с овальными крупными гиперхромными ядрами, клетки типа Б имели округлую форму и плеоморфные ядра.
2. Из 18 морфометрических параметров, протестированных путем компьютерного анализа изображений, семь показали максимальную информативность при описании морфологических особенностей клеток и их ядер, определяемых соотношением размера и формы.
3. По мере усиления процесса малигнизации, клетки гемолимфы гребешка *M. yessoensis* претерпевают этапы усиления генетической нестабильности, выраженной в увеличении уровня ploидности ядер атипичных гемоцитов.

ВЫВОДЫ

4. Наибольший вклад в дисперсию признаков вносил фактор, одновременно принимающий нагрузку от размерных параметров как самих клеток, так и их ядер; второй по значимости фактор определялся исключительно размерами клеток, третий – исключительно размерами ядер.
5. В образце с высоким содержанием клеток атипичной формы была выявлена тенденция к одновременному увеличению размера клетки и ее ядра, что противоречит динамике структурных преобразований гемоцитов в рамках нормального гистогенеза, но полностью соответствует картине диссеминированной неоплазии у *Bivalvia*.