ОНТОГЕНЕЗ, 2011, том 42, № 5, с. 390–396

КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ

УДК 576.52:576.5

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ФАКТОРОВ НА ИНДУКЦИЮ СПИКУЛОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРАХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК МОРСКИХ ЕЖЕЙ

© 2011 г. Ю. О. Кипрюшина[1,2], Н. А. Одинцова[1,2]

[1] *Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, 690041 Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17*

[2] *Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, 690600*

E-mail: kiprul@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.05.2010 г.
Окончательный вариант получен 17.03.2011 г.

Проведен анализ экзогенных факторов, влияющих на реализацию программы спикулогенеза, для двух видов морских ежей *(Strongylocentrotus intermedius* и *S. nudus*) в первичной культуре эмбриональных клеток, полученных со стадии бластулы и гаструлы. Установлено влияние различных типов субстратов и состава среды на процесс спикулообразования. Впервые показано, что сыворотку, присутствие которой необходимо для образования спикул *in vitro*, можно заменить, вводя в питательную среду комплекс факторов, состоящий из инсулина, трансферрина и лектинов. Управление процессами роста и дифференцировки эмбриональных клеток морских беспозвоночных *in vitro* открывает перспективу их применения для решения практических задач, связанных с получением культур клеток – продуцентов минеральных структур.

Ключевые слова: культура клеток, лектин, морской еж, спикула, спикулогенез, эмбрионы

В настоящее время все более актуальными становятся исследования, посвященные изучению процесса биоминерализации, проходящего в условиях нормальной жизнедеятельности у представителей различных организмов, таких как губки, кишечнополостные, диатомовые водоросли, немертины, радиолярии и иглокожие. У морских ежей биоминерализация начинается во время гаструляции (Davidson, 2006).

Удобным инструментом для исследования направленной дифференцировки у иглокожих являются первичные культуры их эмбриональных клеток, которые позволяют изучать конкретный вклад в реализацию программ цитодифференцировки таких факторов, как субстрат, на котором производят культивирование, наличие или отсутствие факторов роста и адгезии. Оказаки (Okazaki, 1975) показал, что изолированные микромеры морских ежей в условиях клеточной культуры при определенных условиях могут дифференцироваться в клетки, способные образовывать спикулы. В последующем эта система была использована для исследования возможного участия гликопротеинов и коллаген-подобных молекул в формировании спикул (Mintz, Lennarz, 1982).

Каждая спикула, образующая скелет личинки морских ежей, состоит из одиночного кристалла кальцита и различных количеств аморфного карбоната кальция (Wilt, 2002). Спикулы окружены внеклеточным матриксом (Wilt, 1999) и являются результатом секреторной деятельности клеток первичной мезенхимы (ПМ) (Illies, 2002; Kiyomoto et al., 2004; Yajima, Kiyomoto, 2006), преобразующих аморфный карбонат кальция в единый упорядоченный кристалл и экспрессирующих специфические белки. Кроме того, в клетках ПМ была обнаружена экспрессия гена коллагена (порядка 600–700 копий мРНК на клетку) (Angerer et al., 1988). Однако для процесса образования спикул большое значение имеет не только синтез и функционирование специфических белков, но и особое положение клеток в бластоцеле эмбриона. Клетки ПМ мигрируют во время личиночного развития в бластоцель, а на стадии средней и поздней гаструлы выстраиваются кольцом вокруг архентерона, образуя будущие центры спикулогенеза (Oliveri et al., 2002). Отростки этих клеток сливаются в синцитии, и в результате внутриклеточного отложения углекислого кальция в вакуолях при участии аппарата Гольджи синтезируется спикула (Wilt, 1999; Wilt, Ettensohn, 2007).

Управление процессами роста и дифференцировки эмбриональных клеток морских беспозвоночных *in vitro* связано с поиском факторов, направляющих дифференцировку в тот или иной тип клеток, и разработкой технологий получения

"чистой" популяции клеток одного типа. Цель данной работы – выявить факторы, влияющие на реализацию программы спикулогенеза в культуре эмбриональных клеток морских ежей, и оценить их влияние на развитие спикулогенной дифференцировки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Морских ежей (*Strongylocentrotus intermedius* и *S. nudus*) собирали в заливе Восток Японского моря с июля по октябрь 2008–2009 гг. Все эксперименты проводили на биостанции "Восток" Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН. Животных держали в ваннах с проточной аэрированной водой и перед началом эксперимента промывали два-три раза фильтрованной морской водой, обработанной ультрафиолетом. Нерест морских ежей стимулировали инъекцией 0.5 М KCl в область Аристотелева фонаря. Эмбрионов получали искусственным оплодотворением и культивировали при 18°С до стадии бластулы или гаструлы (14 и 24 ч после оплодотворения соответственно).

Получение и анализ клеточных культур

Диссоциацию эмбрионов морских ежей проводили с помощью раствора коллагеназы (2.5 мг/мл; ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток) в течение 20–30 мин при 18°С. Ферментативная диссоциация позволила получить культуры клеток с жизнеспособностью не менее 99%. Клеточную суспензию дважды промывали искусственной морской водой без Ca^{2+} и Mg^{2+}, а затем морской водой. Все растворы для промывок содержали антибиотики: гентамицин (0.4 мг/мл), пенициллин (G 100 ед/мл), стрептомицин (0.1 мг/мл) и нистатин (500 ед/мл). Полученную суспензию клеток фильтровали через стерильный газ (с размером ячеи 35 мкм) для освобождения от частично диссоциированных эмбрионов и крупных агрегатов клеток. Жизнеспособность клеток определяли методом исключения красителя трипанового синего ("Serva", Германия) в камере Горяева. Конечная концентрация клеток при культивировании во всех экспериментах составляла 2×10^6/мл.

Клетки высевали на различные субстраты: пластик (24-луночные пластиковые планшеты, "Costar", США), покровные стекла с углеродным напылением, поли-L-лизин (мол. массой 190 кДа) или фибронектин ("Sigma", США). Для культивирования клеток использовали морскую воду с содержанием эмбриональной сыворотки телят (ЭС) от 0 до 32% ("Sigma", США) или питательную среду L15 ("Flow Laboratories", Великобритания) с модификациями (L15-M) (Одинцова, 2001). Кроме того, в некоторых экспериментах в среду добавляли вместо ЭС бычий сывороточный альбумин, БСА (0.125%), инсулин (100 мкг/мл) и холотрансферрин (80 мкг/мл) (все реактивы фирмы "Sigma", США) либо набор этих же компонентов в комплексе с лектинами, такими как маннозоспецифичный лектин, конканавалин А (Кон А), ("Sigma", США) в концентрации 1.5 мкг/мл или глюкозамин-специфичный лектин из асцидии *Didemnum ternatanum* (ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток) в концентрации 2.5 мкг/мл.

Клетки культивировали при температуре 17–18°С. Число образовавшихся спикул подсчитывали через 3 сут после высева клеток на субстраты. Клеточные культуры анализировали при помощи инвертированного микроскопа Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия).

Гистохимическое выявление ферментативной активности эндогенной щелочной фосфатазы в клеточных культурах проводили согласно методу, описанному ранее (Kamalia et al., 1992).

Статистический анализ полученных данных (количество спикул) проведен при помощи программы Microsoft Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Через 1 сут после начала культивирования часть диссоциированных клеток агрегировала и образовывала эмбриоидо-подобные тела. Тест на присутствие эндогенной щелочной фосфатазы показал, что клетки, позитивные по этому параметру, обнаружены только в клеточных агрегатах, напоминающих эмбриоидо-подобные тела (рис. 1). Присутствие сыворотки не влияло на уровень активности щелочной фосфатазы в агрегатах клеток. Данную картину наблюдали на всех тестируемых субстратах, кроме поли-L-лизина. На поли-L-лизине клетки прочно связывались с субстратом, но не распластывались и не формировали эмбриоидо-подобные тела.

Среди клеток, не участвовавших в формировании эмбриоидо-подобных тел, по морфологическим признакам можно было выделить три типа клеток: пигментные клетки красно-коричневого цвета, распластанные клетки и округлые клетки (рис. 2а). Распластанные клетки при дальнейшем культивировании объединялись в синцитии. Именно в таких спикулогенных синцитиях образуются скелетные спикулы.

Культивирование клеток в морской воде в присутствии ЭС (1–32%) приводило к стабильному появлению спикул, которые можно было различить на 2-е сут культивирования. На рис. 2б и 2в представлен внешний вид спикул, которые образовывались в первичной культуре клеток бластулы морского ежа *S. nudus,* культивированных в морской воде в присутствии 10% ЭС. Спикулы были в основном правильной трехосной формы, а после 3-х суток культивирования некоторые спи-

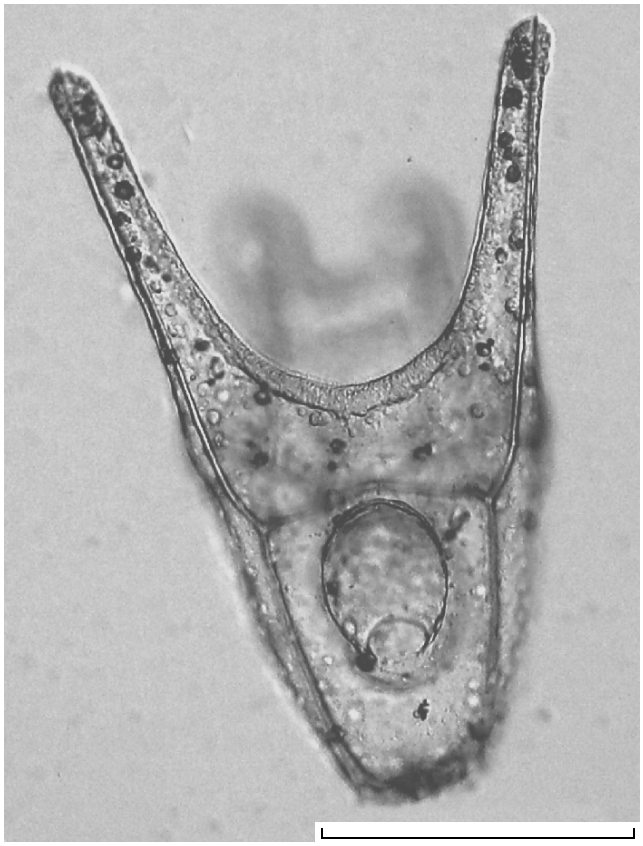

Рис. 3. Личинка морского ежа *S. nudus* (стадия плутеуса). Масштаб: 50 мкм.

кулы ветвились и образовывали отростки. В культуре клеток *S. intermedius* трехосные спикулы наблюдали редко, зато в большом количестве формировались длинные одноосные спикулы (до 50 мкм) (рис. 2г). Установлено, что при культивировании клеток, полученных с более поздней стадии развития – гаструлы, спикулогенез идет более интенсивно, чем в культуре клеток, полученной со стадии бластулы.

В нормальном личиночном развитии морского ежа трехосные спикулы являются элементами высокоупорядоченного внутреннего скелета, необходимого для поддержки архентерона, и могут быть легко различимы в живых личинках (рис. 3).

В ходе индуцированной спикулогенной дифференцировки число образующихся спикул зависело от концентрации сыворотки в морской воде и от типа субстрата, как в первичных культурах эмбриональных клеток морских ежей со стадии бластулы (рис. 4), так и гаструлы (см. рис. 5). Наиболее эффективно программа спикулогенеза реализовалась при культивировании клеток на фибронектине, тогда как на пластике и в лунках, поверхность которых была покрыта другими субстратами, число распластанных клеток и спикул было значительно меньше.

При использовании вместо морской воды питательной среды L15-M с сывороткой индуцировать спикулогенную дифференцировку не удалось. Иногда спикулы спонтанно появлялись при культивировании в морской воде без сыворотки. Это происходило довольно редко и только в культурах, полученных со стадии гаструлы.

При культивировании клеток в питательной среде L15-M в присутствии БСА, инсулина и трансферрина спикулы также отсутствовали, но образовывались синцитий-подобные островки клеток (рис. 6а). Используя эти же условия, но дополнительно вводя в среду лектины (например, Кон А), нам удалось получить спикулы в культуре клеток морского ежа со стадии гаструлы (рис. 6б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия щелочной фосфатазы является маркером плюрипотентных эмбриональных клеток многих млекопитающих (Bernstine et al., 1973;

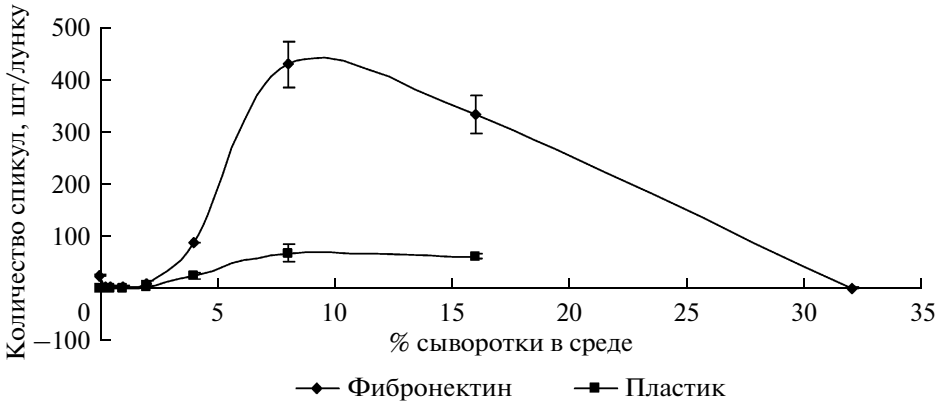

Рис. 4. Зависимость числа образовавшихся спикул в культуре клеток бластулы морского ежа *S. intermedius* от содержания сыворотки в среде культивирования (клетки культивировали в течение 3 сут на пластике и фибронектине).

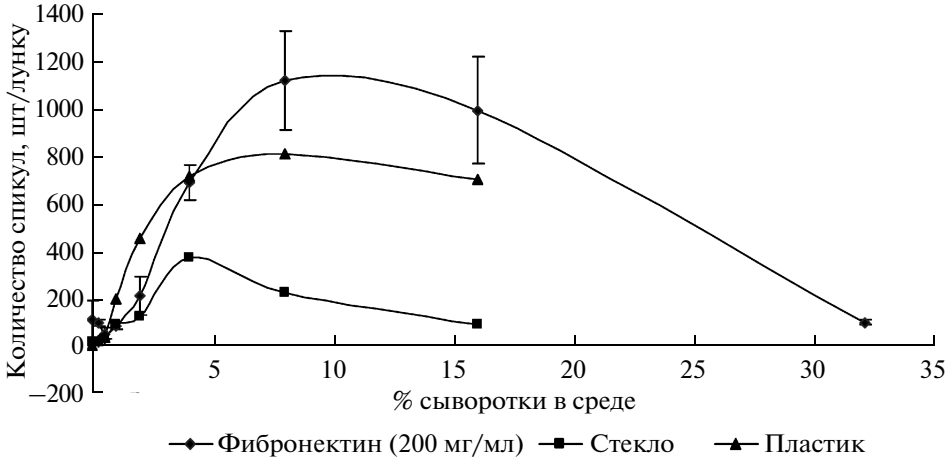

Рис. 5. Зависимость числа образовавшихся спикул в культуре клеток гаструлы морского ежа *S. intermedius* от содержания сыворотки в среде культивирования и типа субстрата (клетки культивировали в течение 3 сут на пластике, либо фибронектине, либо на стекле).

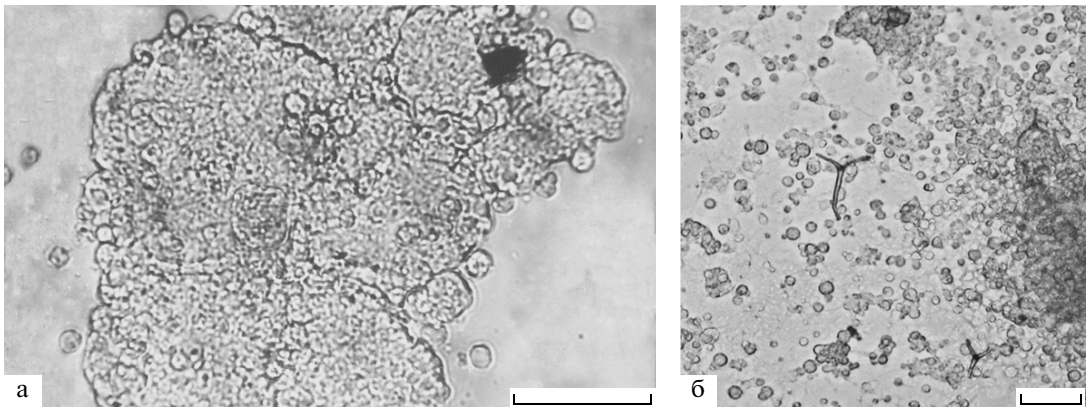

Рис. 6. Морфология эмбриональных клеток морского ежа *S. intermedius* в первичных культурах, полученных со стадии гаструлы. а – клетки, культивированные в течение 3-х сут в присутствии БСА, инсулина и трансферина; б – клетки, культивированные в течение 3-х сут в присутствии БСА, инсулина и трансферина и конканавалина А. Масштаб: 50 мкм (а), 30 мкм (б).

Brons et al., 2007) и беспозвоночных животных (Ishizuka et al., 2001), поэтому присутствие ферментативной активности эндогенной щелочной фосфатазы в культивируемых клетках со стадии бластулы в наших экспериментах, может свидетельствовать о том, что полученные клетки потенциально способны к делению.

Известно, что в культурах диссоциированных клеток эмбрионов морских ежей в зависимости от условий культивирования возможна либо реконструкция целых эмбрионов, либо дифференцировка клеток в различных направлениях (Исаева, 1994): образование мышечных клеток (Kaneko et al., 1997), пигментных клеток (Одинцова, 2001; Calestani et al., 2003) или клеток, формирующих спикулы (Okazaki, 1975; Mintz, Lennarz, 1982; Decker et al., 1987; Исаева, 1994). Выбор программы развития в культуре клеток происходит задолго до экспрессии специфических генов, зависит от состава среды и множества внешних сигналов, которые воспринимаются поверхностными рецепторами клетки (Одинцова, 2001).

Микромеры, появляясь на 16-клеточной стадии развития, являются носителями программы спикулогенеза и в последующем способны образовывать спикулы в культуре в присутствии лошадиной сыворотки или сыворотки телят (Okazaki, 1975). Пространственная упорядоченность спикул и их форма зависит от условий культивирования и коррелирует с развитием структур цитоскелета в клетках (Керкис, Исаева, 1984). Как показали наши эксперименты, форма спикул может значительно отличаться даже у близких видов морских ежей.

Микромеры, культивированные в морской воде без сыворотки, образуют “розеткоподобные”

группы округлых, отдельно лежащих друг от друга клеток. При добавлении сыворотки спикулообразование в культуре восстанавливается (McCarty, Spiegel, 1983). Природа возникновения сигналов, которые индуцируют спикулообразование иглокожих, до конца не выяснена. В наших экспериментах количество спикул в культуре увеличивалось по мере увеличения содержания ЭС в среде (до концентрации примерно 16%) для обоих видов морских ежей. При использовании более высоких концентраций сыворотки (16–32%) наблюдался обратный эффект – число образовавшихся спикул снижалось, что согласуется с данными других авторов (Kiyomoto et al., 2004). Спонтанное появление спикул при культивировании в морской воде без сыворотки происходило только в культурах, полученных со стадии гаструлы, что можно объяснить коммитированностью клеток гаструлы как более поздней стадии развития. Отсутствие спикул при культивировании в питательной среде с сывороткой, вероятно, связано с недостатком каких-либо минеральных компонентов, необходимых для формирования спикул.

Клеточный ответ на внешний стимул (сыворотку) происходит в определенном временном интервале (36–50 часов после начала культивирования). Это соответствует стадии *in vivo*, когда клетки начинают агрегировать и формировать кольцевой синцитий (Page, Benson, 1992). Хотя функция спикулообразования характерна для клеток ПМ, потомков микромеров, микрохирургическое удаление этих клеток на стадии гаструлы приводит к превращению нескелетогенных мезодермальных клеток в клетки ПМ (Ettensohn et al., 2007). Это превращение в дальнейшем сопровождается синтезом полного, хорошо выраженного скелета, хотя и с некоторым запаздыванием, и связано с активацией многих генов, отвечающих за процесс биоминерализации, в нескелетогенных мезенхимных клетках (Ettensohn, 2009). Инъекция в зиготы морских ежей мРНК рецепторов нейромедиаторов млекопитающих приводила к резкой остановке развития на стадии гаструлы и появлению дизорганизованных пигментных и скелетогенных клеток в бластоцеле эмбрионов, что может указывать на общность эндогенной сигнал-проводящей системы у позвоночных и беспозвоночных животных (Cameron et al., 1994).

Сыворотка обеспечивает присутствие фибронектина и других необходимых для спикулообразования компонентов. В наших экспериментах именно при культивировании клеток на фибронектине было зарегистрировано самое большое число спикул, что неудивительно, так как фибронектин входит в состав базальных мембран клеток иглокожих и необходим для эффективной реализации программы спикулогенеза (Hynes, 1990).

Тем не менее, даже вводя в питательную среду, а не в морскую воду, комплекс факторов, состоящий из инсулина, трансферрина и лектинов, можно заменить сыворотку, присутствие которой критично для образования спикул. Этот эффект, вероятно, связан с присутствием гликопротеинов полиманнозного типа в органическом матриксе в полости спикул морских ежей (Decker et al., 1987).

Наши данные об участии лектинов в индукции спикулогенной дифференцировки в культуре эмбриональных клеток морских ежей в отсутствии сыворотки, подтверждают способность лектинов изменять адгезивные свойства этих клеток (Mafranga et al., 1991) и воздействовать на процессы роста и дифференцировки клеток иглокожих (Latham et al., 1995; Odintsova et al., 1999). Механизмы этого явления могут быть различны – здесь могут быть вовлечены как углевод-связывающие участки, так и коллаген-подобные сайты и/или хорошо известная для многих адгезионных белков последовательность из трех аминокислот – аргинина–глицина–аспарагиновой кислоты – RGD-последовательность (Ruoslahti, Pierschbacher, 1987). Так, например, адгезивная активность лектинов, выделенных из морских ежей, эхинонектина и эхиноидина, не зависит от углевод-связывающей активности (Alliegro et al., 1990; Alliegro, Alliegro, 1991), но в состав этих лектинов входит RGD-последовательность (Ozeki et al., 1991). Адгезивная активность фибронектина, одного из самых древних лектинов (Akiyama, Johnson, 1983), связана как с RGD-последовательностью, так и с другими участками молекулы (Hynes, 1990; Tanabe et al., 1993). В процессе эмбрионального развития меняются поверхностные свойства клеток, поэтому рецепторы к лектинам или их связывающие свойства также меняются. Так, например, маннозо-специфичный лектин, Кон А, на ранних стадиях эмбрионального развития морского ежа не связывается с поверхностными рецепторами вовсе или связывается очень слабо, но на стадии бластулы и гаструлы этот лектин активно связывается с поверхностными рецепторами (Mafranga et al., 1991; Latham et al., 1995). Вероятно, гликопротеины клеточной поверхности, синтезируемые на разных стадиях развития, являются основными молекулами морфогенеза (Edelman, 1984, 1985).

Полученные результаты могут быть использованы в морской биотехнологии для решения практических задач, связанных с получением культур клеток – продуцентов минеральных структур, необходимых для нанотехнологий.

Работа поддержана Президиумом ДВО РАН (проекты № 09-I-П22-04 и 09-II-СО-06-001), РФФИ (№ 10-04-00-330) и Программой ДВФУ (№ 11 G34.31.0010).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Исаева В.В. Клетки в морфогенезе. М.: Наука, 1994. 224 с.

Керкис А.Ю., Исаева В.В. Электронно-микроскопическое исследование спикулогенеза в культуре эмбриональных клеток морского ежа *Strongylocentrotus nudus* // Онтогенез. 1984. Т. 15. № 1. С. 34–40.

Одинцова Н.А. Основы культивирования клеток морских беспозвоночных. Владивосток: Дальнаука, 2001. 162 с.

Akiyama S.K., Johnson M.D. Fibronectin in evolution: presence in invertebrates and isolation from *Microcina porifera* // Comp. Biochem. Phys. B. 1983. V. 76. P. 687–694.

Alliegro M.C., Burdsal C.A., McClay D.R. Galactose-specific lectin from sea urchin embryos // Biochem. 1990. V. 29. P. 2135–2141.

Alliegro M.C., Alliegro M.A. The structure and activities of echinonectin: a developmentally regulated cell adhesion glycoprotein with galactose-specific lectin activity // Glycobiology. 1991. V. 1. P. 253–256.

Angerer L.M., Chambers S.A., Yang Q. et al. Expression of a collagen gene in mesenchyme lineages of the *Strongylocentrotus purpuratus* embryo // Genes Dev. 1988. V. 2. P. 239–246.

Abrecht M., Chiou J.W., Guo J. et al. Probing the organic-mineral interface at the molecular level in model biominerals // Langmuir. 2008. V. 24. № 6. P. 2680–2687.

Bernstine E.G., Hoopert M.L., Grandchamp S. et al. Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. Part II. P. 3899–3903.

Brons G.M., Smithers L.E., Trotter M.W.B. et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos // Nature. 2007. V. 448. P. 191–195.

Calestani C., Rast J., Davidson E. Isolation of pigment cell specific genes in the sea urchin embryo by differential macroarray screening // Development. 2003. V. 130. P. 4587–4596.

Cameron R.A., Smith L.C., Britten R.J., Davidson E.H. Ligand-dependent stimulation of introduced mammalian brain receptors alters spicule symmetry and other morphogenetic events in sea urchin embryos // Mech. Dev. 1994. V. 45(1). P. 31–47.

Custodio M.R., Hajdu E., Muricy G. Cellular dynamics of *in vitro* allogeneic reactions of *Hymeniacidon heliophila* (Demospongiae: Halichondrida) // Mar. Biol. 2004. V. 144. P. 999–1010.

Davidson E.H. The Regulatory Genome: Gene Regulatory Networks in Development and Evolution. San Diego, CA: Acad. Press., 2006. 304 p.

Decker G.L., Morrill J.B., Lennarz W.J. Characterization of sea urchin primary mesenchyme cells and spicules during biomineralization *in vitro* // Development. 1987. V. 101. P. 297–312.

Edelman G.M. Cell adhesion and morphogenesis: the regulation hypothesis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 1460–1464.

Edelman G.M. Modulation mechanisms in cell-cell recognition // Trends Pharmacol. Sci. 1985. V. 6. P. 208–214.

Ettensohn C.A., Kitazawa C., Cheers M.S. et al. Gene regulatory networks and developmental plasticity in the early sea urchin embryo: alternative deployment of the skeletogenic gene regulatory network // Development. 2007. V. 134. P. 3077–3087.

Ettensohn C.A. Lessons from a gene regulatory network: echinoderm skeletogenesis provides insights into evolution, plasticity and morphogenesis // Development. 2009. V. 136. P. 11–21.

Hynes R.O. Fibronectins. NewYork: Springer, 1990. 546 p.

Illies M.R., Peeler M.T., Dechtiaruk A.M. et al. Identification and developmental expression of new biomineralization proteins in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* // Dev. Genes Evol. 2002. V. 9. P. 419–31.

Ishizuka Y., Minokawa T., Amemiya S. Micromere descendants at the blastula stage are involved in normal archenteron formation in sea urchin embryos // Dev. Genes Evol. 2001. V. 211. P. 83–88.

Kamalia N., McCulloch C.A.G., Tenenbaum H.C. et al. Direct flow cytometric quantification of alkaline phosphatase activity in rat bone marrow stromal cells // J. Histochem. Cytochaniary. 1992. V. 40. № 7. P. 1059–1065.

Kaneko H., Kawahara Y., Okamoto M. et al. Study on the nature of starfish larval muscle cells *in vitro* // Zoolog. Sci. 1997. V. 14. P. 287–296.

Kiyomoto M., Zito F., Sciarrino S. et al. Commitment and response to inductive signals of primary mesenchyme cells of the sea urchin embryo // Dev. Growth Differ. 2004. V. 46 № 1. P. 107–114.

Latham V.H., Herrera S., Rostamiani K. et al. Rapid identification of lectin receptors and their possible function in sea urchin cell systems // Acta Histochem. 1995. V. 97. № 4. P. 373–382.

Mafranga V., Di Ferro D., Cervello M. et al. Adhesion of sea urchin embryonic cells to substrata coated with cell adhesion molecules // Biol. Cell. 1991. V. 1. № 71. P. 289–291.

Mc Carty R.A., Spiegel M. Serum effects on the *in vitro* differentiation of sea urchin micromeres // Exp. Cell Res. 1983. V. 149. P. 433–441.

Mintz G.R., Lennarz W.J. Spicule formation by cultured embryonic cells from the sea urchin // Cell Diff. 1982. V. 11. P. 331–333.

Odintsova N.A., Belogortseva N.I., Ermak A.V. et al. Adhesive and growth properties of lectin from the ascidian *Didemnum ternatanum* on cultivated marine invertebrate cells // BBA-Mol. Cell Biol. 1999. V. 1448. P. 381–389.

Okazaki K. Spicule formation by isolated micromers of sea urchin embryo // Amer. Zool. 1975. V. 15. № 3. P. 567–582.

Oliveri P., Carrick D.M., Davidson E.H. A gene regulatory network that directs micromere specification in the sea urchin embryo // Dev. Biol. 2002. V. 246. P. 209–228.

Ozeki Y., Matsui T., Titani K. Cell adhesive activity of two animal lectins through different recognition mechanisms // FEBS Lett. 1991. V. 30. P. 2391–2394.

Page L., Benson S. Analysis of competence in cultured sea urchin micromeres // Exp. Cell Res. 1992. V. 203. № 2. P. 305–311.

Pain B., Clark M.E., Shen M. et al. Long-term *in vitro* culture and characterization of avian embryonic stem cells

with multiple morphogenetic potentialities // Development. 1996. V. 122. P. 2339–2348.

Peled-Kamar M., Hamilton P., Wilt F.H. Spicule matrix protein LSM34 is essential for biomineralization of the sea urchin spicule // Exp. Cell Res. 2002. V. 272. № 1. P. 56–61.

Ruoslahti E., Pierschbacher M.D. New perspectives in cell adhesion: RGD and Integrins // Science. 1987. V. 238. P. 491–497.

Seto J., Zhang Y., Hamilton P., Wilt F. The localization of occluded matrix proteins in calcareous spicules of sea urchin larvae // J. Struct. Biol. 2004. V. 1. P. 123–130.

Tanabe J., Fujita H., Iwamatsu A., Mohri H. et al. Fibronectin inhibis platelet aggregation independently of RGD-sequence // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 27143–27147.

Wilt F.H. Matrix and mineral in the sea urchin larval skeleton // J. Struct. Biol. 1999. V. 126. № 3. P. 216–226.

Wilt F.H. Biomineralization of the spicules of sea urchin embryos // Zoolog. Sci. 2002. V. 3. P. 253–261.

Wilt F.H., Ettensohn C.A. The morphogenesis and biomineralization of the sea urchin larval skeleton // Handbook of Biomineralization (ed. E. Bauerlein), Weinheim: Wiley-VCH Press. 2007. P. 183–210.

Yajima M., Kiyomoto M. Study of larval and adult skeletogenic cells in developing sea urchin larvae // Biol. Bull. 2006. V. 211. № 2. P. 183–192.

Effect of Exogenous Factors on the Induction of Spicule Formation in Sea Urchin Embryonic Cell Cultures

Yu. O. Kipryushina[a, b] and N. A. Odintsova[a, b]

[a]*Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, ul. Pal'chevskogo 17, Vladivostok 690041 Russia*
e-mail: kiprul@yandex.ru
[b]*Far East Federal University, Vladivostok, 690600 Russia*

Abstract—The effect of exogenous factors on the realization of the spicule formation program in two sea urchin species, *Strongylocentrotus intermedius* and *S. nudus*, has been studied in primary embryonic cell cultures derived from the blastula and gastrula stages. It has been shown that the process of spicule formation depends on the type of substrate and the composition of the medium. An original finding is that calf or horse serum necessary for spicule formation in vitro can be replaced by a complex of factors including insulin, transferrin, and lectins. Methods allowing control over the growth and differentiation of marine invertebrate embryonic cells in vitro open prospects for their application to practical problems such as the establishment of cell cultures producing certain mineral structures.

Keywords: cell culture, lectin, sea urchin, spicule, spicule formation, embryos

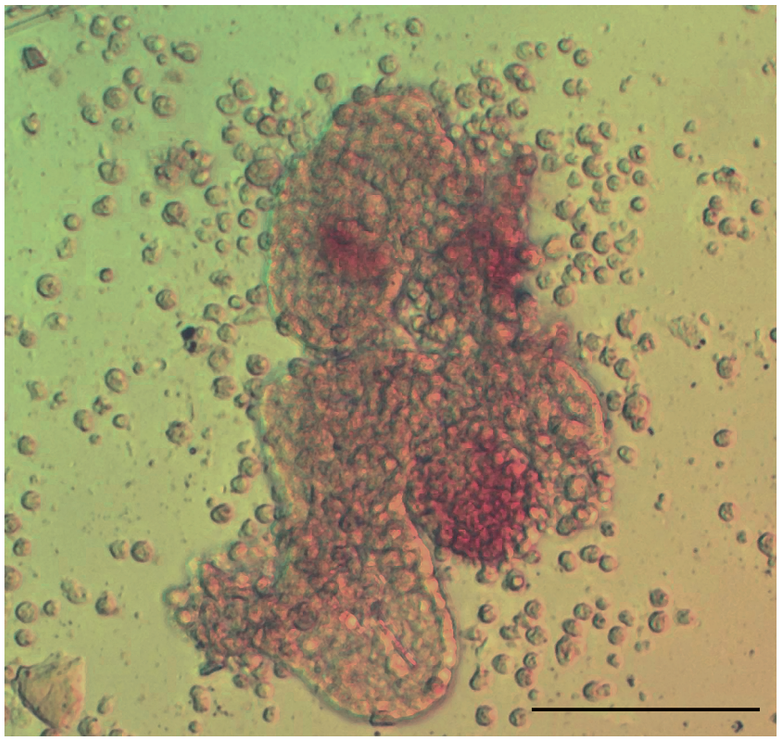

Рис. 1. Выявление активности эндогенной щелочной фосфатазы в культуре эмбриональных клеток морского ежа *S. intermedius* после трех дней культивирования в морской воде с добавлением 4% сыворотки. Масштаб: 100 мкм.

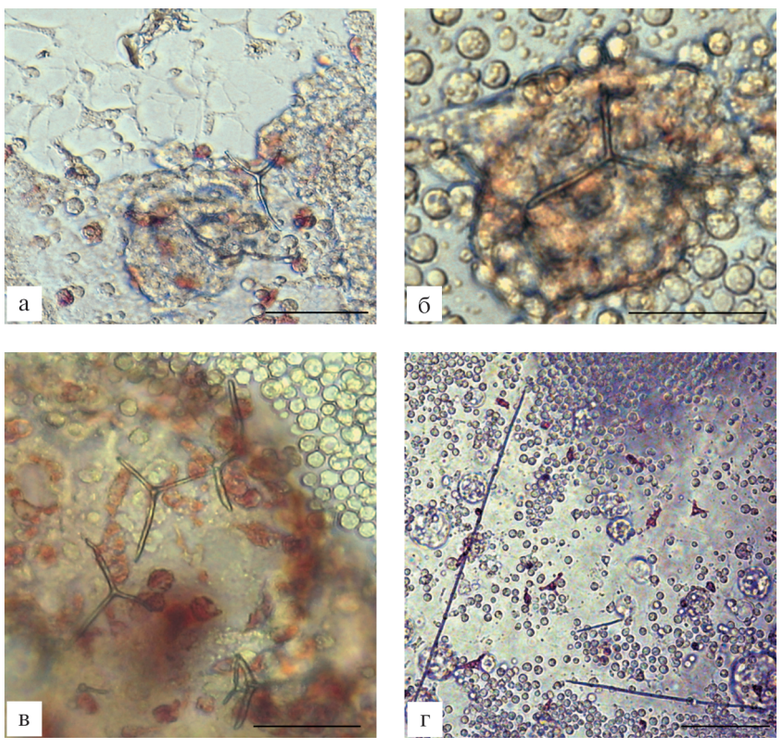

Рис. 2. Спикулогенез в культуре эмбриональных клеток морских ежей, полученных со стадии бластулы: а, б, в – культура эмбриональных клеток морского ежа *S. nudus*; г – культура эмбриональных клеток морского ежа *S. intermedius*. Клетки культивировали в течение 72 часов. Масштаб: 20 мкм (а, в), 30 мкм (б), 100 мкм (г).

Ontoginez № 5_ver.indd 2 9/8/11 1:35:20 PM