

ЭМБРИОГЕНЕЗ И КАНЦЕРОГЕНЕЗ

УДК 593.9

ПИГМЕНТЫ ПЛОСКОГО МОРСКОГО ЕЖА *SCAPHECHINUS MIRABILIS* (ECHINOIDEA, CLYPEASTEROIDA) В ЯЙЦЕКЛЕТКАХ И ЭПИДЕРМИСЕ

© 2017 г. А. Л. Дроздов^{а, с, *}, А. А. Артюков^б, Ю. Н. Елькин^б

^аИнститут биологии моря им. А.В. Жирмунского, Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН
690041 Владивосток, ул. Пальчевского, 17

^бТихоокеанский институт биоорганической химии моря им. Г.Б. Елякова ДВО РАН
690022 Владивосток, ул. 100 лет Владивостоку, 159

^сДальневосточный федеральный университет
690950 Владивосток, ул. Суханова, 8

*E-mail: anatoliyld@mail.ru

Поступила в редакцию 20.12.2015 г.
Окончательный вариант получен 23.09.2016 г.

Изучены нафтохиноидные пигменты эпидермальных клеток и гамет клипестероидного плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis*, выделенные ферментативным методом с последующей экстракцией спиртом. Обнаружено, что нафтохиноидные пигменты присутствуют в пигментных клетках, инкорпорированных в студенистые оболочки овоцитов, но отсутствуют в цитоплазме неоплодотворенных яиц. Масс-спектры ионизацией лазерной десорбции показали, что пигментные клетки, инкорпорированные в оболочки зрелых яйцеклеток, содержат спинохромы Е и D, а находящиеся в эпидермисе взрослых ежей — эхинохром А и спинохром D. В яйцах, лишенных оболочек, спинохромы не обнаружены. Оплодотворение морских ежей сопровождается оксидативным взрывом, связанным с производством пероксида водорода из молекулярного кислорода хинон- и нафтохинон-зависимой оксидазой Udx1. Поскольку в яйцеклетках *S. mirabilis* хинонов не оказалось, можно предположить, что для перекисного стимулирования эмбриогенеза используется водорастворимый спинохром Е, проникающий путем диффузии в цитоплазму яиц из пигментных клеток оболочки. Доминирующий в клетках поверхностного эпидермиса взрослого животного эхинохром А в воде не растворяется и, по-видимому, иммобилизован гидрофобным якорем этильной группы.

Ключевые слова: клипестероидные морские ежи, нафтохиноны, эхинохром, спинохромы, пигменты студенистой оболочки, эпидермис

DOI: 10.7868/S0475145017040048

ВВЕДЕНИЕ

Нафтохиноидные пигменты морских ежей были обнаружены в конце 19-го века и названы эхинохромами (MacMunn, 1883). Со временем среди них было идентифицировано несколько десятков соединений, из которых только шесть встречаются чаще других (Anderson et al., 1969). Среди них только эхинохром А (ЭхА), исторически открытый первым, сохранил обобщающее название, остальные пять называются спинохромами (Сп) А, В, С, D, Е.

Наличие нафтохиноидных пигментов — одна из характерных биохимических синапоморфий морских ежей, обусловленная генами, кодирующими ферменты поликетидсинтазы, которые необходимы для биосинтеза спинохромов. У правильных шарообразных морских ежей, например, у *Strongylocentrotus purpuratus*, нафтохиноидные пигменты появляются на стадии бластулы (Castoe et al., 2007; Calestani, Rogers, 2010; Beeble, Calestani, 2012).

Имеются предварительные данные, что и в неоплодотворенных яйцах некоторых видов морских ежей могут содержаться нафтохиноновые пигменты. Однако у взрослых особей их разнообразие гораздо выше, чем в неоплодотворенных яйцах, эмбрионах и личинках (Koltsova et al., 1981).

Клипестероидные морские ежи, к которым относится и изучаемый нами *Sc. mirabilis*, отличаются от всех других групп морских ежей тем, что у них уже в овогенезе овоциты окружены фолликулярными клетками, которые содержат вакуоли с пигментными гранулами. Процесс овогенеза и появление вакуолей с пигментами в фолликулярных клетках подробно изучен у клипестероидного морского ежа *Dendraster excentricus* (Burke, Bouland, 1989). В овоцитах и зрелых яйцах дальневосточных видов клипестероидных морских ежей *Scaphechinus mirabilis*, *S. griseus* и *Echinarachnius parma* наблюдается аналогичная картина: фолликулярные клетки с вакуолями, содержащими пиг-

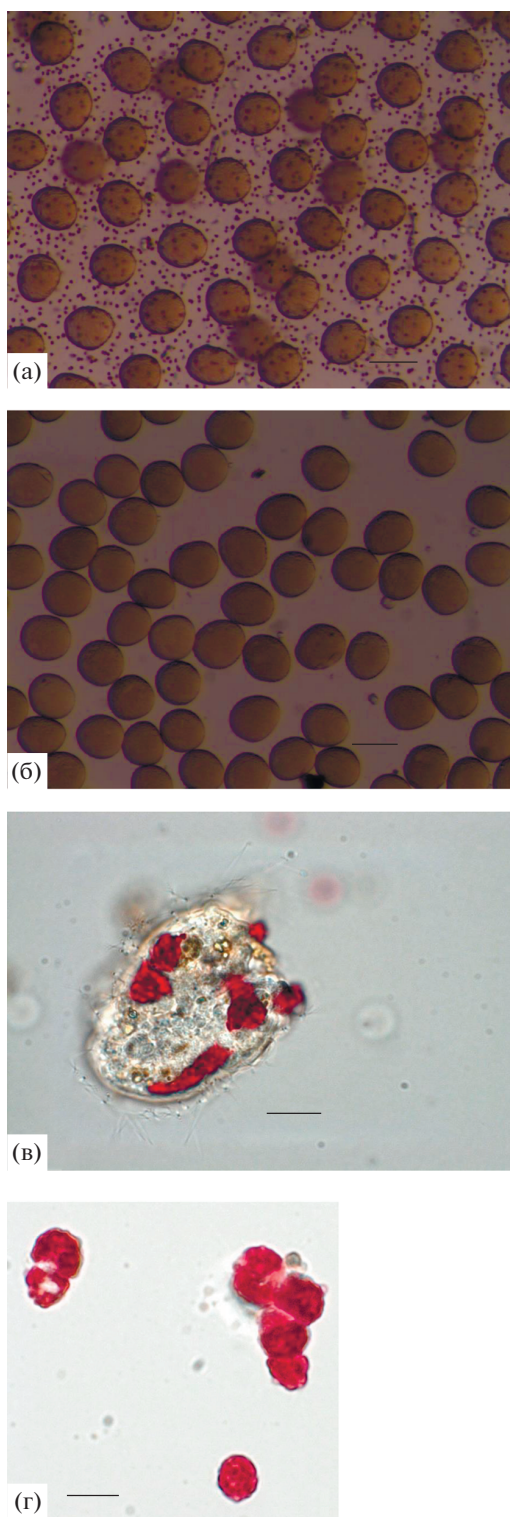


Рис. 1. Хроматоформные тела студенистых оболочек *Scaphechinus mirabilis*. (а) — неоплодотворенные яйца в студенистой оболочке с хроматоформными клетками; (б) — неоплодотворенные яйца без студенистых оболочек; (в) — пигментные гранулы в остатках студенистой оболочки, отделенной от яйцеклеток; (г) — пигментные гранулы, выделенные из студенистой оболочки. Масштаб: (а, б) — 100, (в, г) — 10 мкм.

ментные гранулы, окружают развивающиеся овоциты. Они сохраняются в оболочках зрелых яиц и в эмбрионах до момента выхода личинок на стадии поздней бластулы из оболочки оплодотворения (Дроздов, Винникова, 2010).

У эмбрионов морских ежей, начиная со стадии ранней гастролы, синтезируется новая генерация нафтохиноновых пигментов. Как и многие другие виды неправильных морских ежей плоский морской еж *Scaphechinus mirabilis* также продуцирует в основном ЭхА (Nishibori, 1957). Время появления пигментов в ходе эмбрионального развития варьируется у разных видов. У эмбрионов *S. mirabilis* они впервые появляются на вегетативном полюсе у ранней гастролы, а затем они выявляются и на анимальном полюсе. К моменту, когда архентерон достигает анимального полюса, клетки с пигментами распределены среди аборальной эктодермы (Takata, Kominami, 2003). На стадии плутеуса на поверхности личинок *S. mirabilis* расположены уже десятки пигментных клеток (Kominami et al., 2001).

В настоящей работе мы исследовали состав спинохромов студенистой оболочки нативных неоплодотворенных яиц с яйцевыми оболочками, неоплодотворенных яиц без лишённых студенистых оболочек, и пигментных эпидермальных клеток плоского морского ежа *S. mirabilis* с целью пролить свет на роль спинохромов в эмбриогенезе этого вида морского ежа. Спинохромы определяли измерением масс-спектра их анионов, полученных прямой десорбцией с ионизацией, методом, не требующем пробоподготовки спиртового экстракта клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плоских морских ежей *Scaphechinus mirabilis* (Agassiz, 1863) (Irregularia, Clypeasteroidea, Scutellidae Gray, 1825) собирали в заливе Петра Великого (заливы Восток, Уссурийский и Посыета) Японского моря. Неоплодотворенные яйцеклетки получали инъекцией KCl в полость морских ежей, находящихся в нерестовом состоянии. Осевшие на дно стакана светло-коричневые гаметы пятикратно отмывали отфильтрованной морской водой до слегка бежевого цвета воды. Воду декантировали, а гаметы помещали на 30 мин в раствор коллагеназы КК (5 мг/300 мл морской воды) при температуре 25°C. Высвободившиеся в результате ферментализации пигментные клетки вместе со студенистой оболочкой отделяли от яиц центрифугированием и дважды промывали морской водой. Для экстракции пигментов использовали 0.1% раствор фосфорной кислоты в 96% этиловом спирте. Аналогично получали пигментные клетки эпидермиса взрослого животного, за исключением того, что клетки после ферментализации снимали под струей морской воды. Яйцеклетки, оставшиеся после отделения студенистой оболочки, пятикратно от-

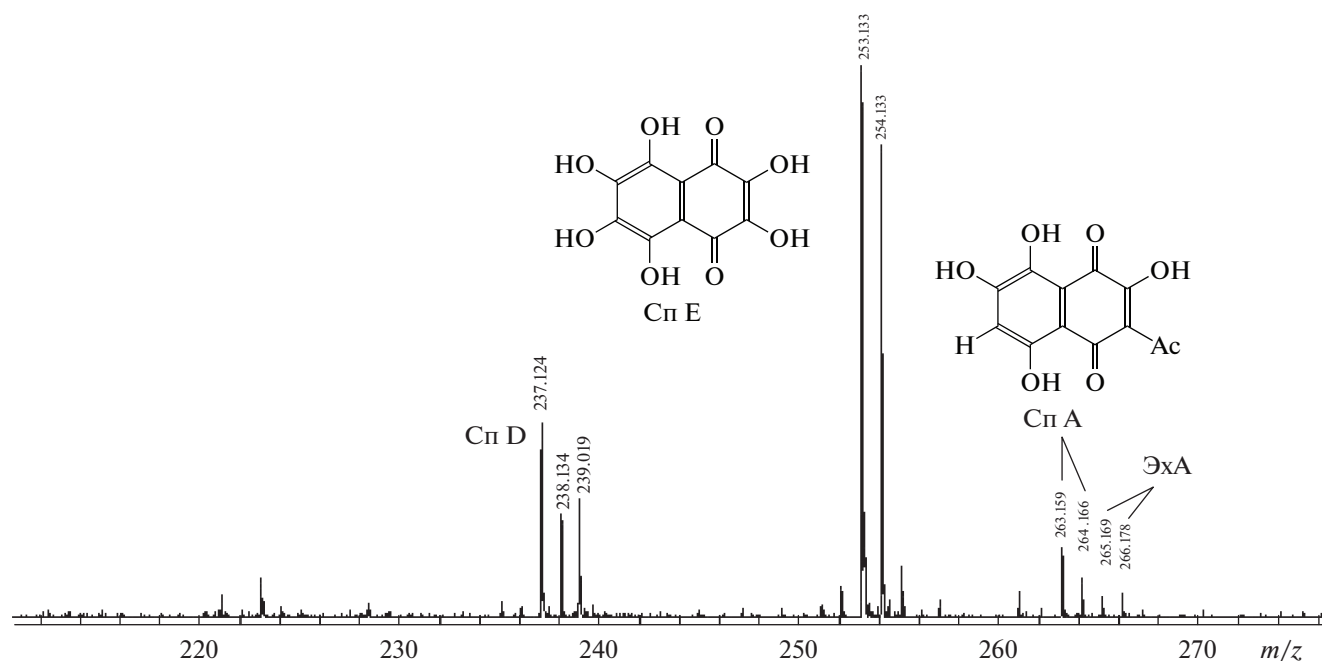


Рис. 2. Масс-спектр лазерной десорбции/ионизации спинохромов пигментов студенистой оболочки яиц. В пигментах преобладают СпЕ (254/253) и СпD (237/238). Эхинохром А (266/265) и спинохром А (264/263) составляют незначительную часть пула из 4 обнаруженных пигментов.

мывали фильтрованной морской водой. Цвет полученных овоцитов клеток более светлый, чем у исходных гамет. Отмытые овоциты экстрагировали так же, как и пигментные клетки. Все три экстракта (пигментных клеток, инкорпорированных в студенистую оболочку, яйцеклеток без студенистой оболочки и пигментных клеток покровного эпителия взрослого морского ежа) исследовали методом масс-спектрометрии лазерной десорбции/ионизации в режиме измерения отрицательных ионов на приборе MALDI TOFMS Ultraflex III, Bruker. Экстракт (0.5 мкл) наносили на мишень прибора и после испарения спирта подвергали лазерной абляции с использованием потока фотонов немного выше порога ионизации (Елькин и др., 2011, 2012).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфология яиц

Зрелые яйца *S. mirabilis* диаметром 110 мкм (рис. 1а, 1б) окружены тонкой желточной оболочкой (около 1 мкм) и имеющей волокнистую структуру студенистой оболочкой, в которой отмечены многочисленные пигментные клетки, лежащие в некотором отдалении от желточной оболочки (рис. 1а). Среди плоских морских ежей необыкновенный плоский морской еж *S. mirabilis* выделяется наибольшим содержанием пигментных клеток — их 40. Обработка коллагеназой позволяет мягко удалить студенистые оболочки с яйцеклеток, не повреждая их (рис. 1б). Из удаленных студенистых оболочек удается выделить

пигментные гранулы и очистить их от материала студенистых оболочек (рис. 1в, 1г).

Масс-спектры выделенных пигментных гранул (рис. 1г) свидетельствуют, что хиноидные пигменты присутствуют в хроматоидных телах, инкорпорированных в студенистые оболочки. Эхинохром А (266/265) и спинохром А (264/263) содержатся в небольших количествах, а преобладают спинохромы СпЕ (254/253) и СпD (237/238) (рис. 2). Масс-спектры суспензии яйцеклеток, лишенных студенистых оболочек в результате обработки коллагеназой, не показывают наличия в них хиноидных пигментов.

После оплодотворения зиготы дробятся, оставаясь в студенистых оболочках. У клеток средней бластулы формируются реснички, и она начинает двигаться и выходит из студенистой оболочки. На стадии средней гаструлы в клетках появляются окрашенные гранулы. Наиболее интенсивно они синтезируются на вегетативном полюсе в районе, прилегающем к архентерону. По мере развития личинки число окрашенных клеток увеличивается. На разных стадиях плутеуса они визуализируются практически по всей поверхности личинки.

Взрослые ежи покрыты эпидермисом, клетки которого также содержат пигментные гранулы (рис. 3а). Их можно выделять из эпидермальных клеток, обрабатывая их коллагеназой (рис. 3б).

Масс-спектры пигментных гранул, выделенных из клеток эпидермиса показали, что они богаты хиноидными пигментами, состав которых отличается от пигментов, присутствующих в студенистых оболочках яиц. Спинохромы СпА (264/263)

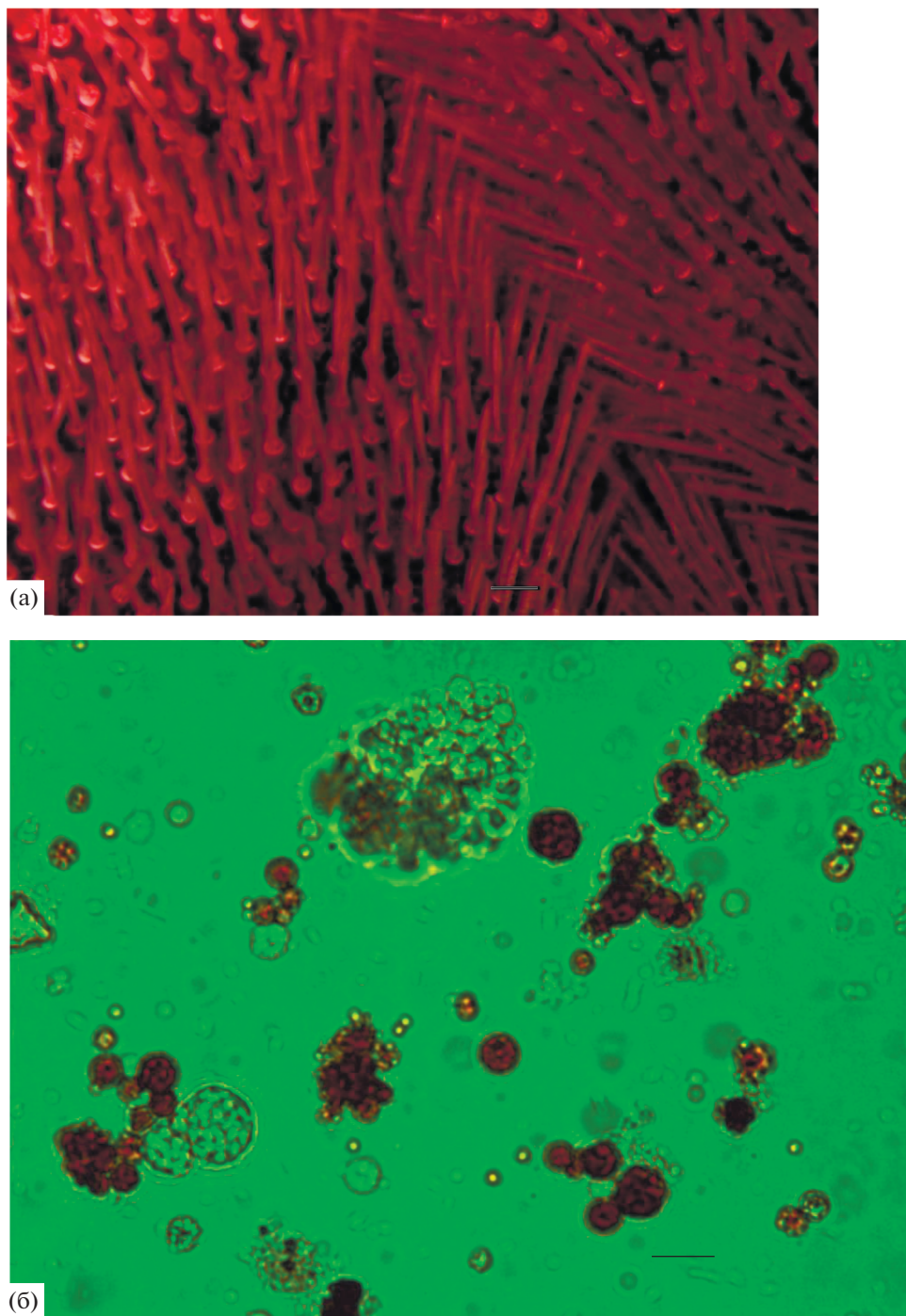


Рис. 3. (а) — аборальная поверхность *Sc. mirabilis*. Видны иглы и ампулы с пигментными гранулами; (б) — выделенные пигментные гранулы. Масштаб: (а) — 2.5 мм, (б) — 10 мкм.

и СпЕ (254/253) не выявлены, однако присутствуют ЭхА (266/265) и СпD (237/238) (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Морские ежи — это очень перспективный источник вторичных метаболитов, в частности наф-

тохинонов, используемых в фармацевтических, пищевых и иных коммерческих целях (Volkman, 1999). Несмотря на многочисленные биохимические исследования нафтохинонов и их применение в медицине и ветеринарии, физиологическая роль этих соединений в нормальной физиологии морских ежей далека от понимания. Есть предпо-

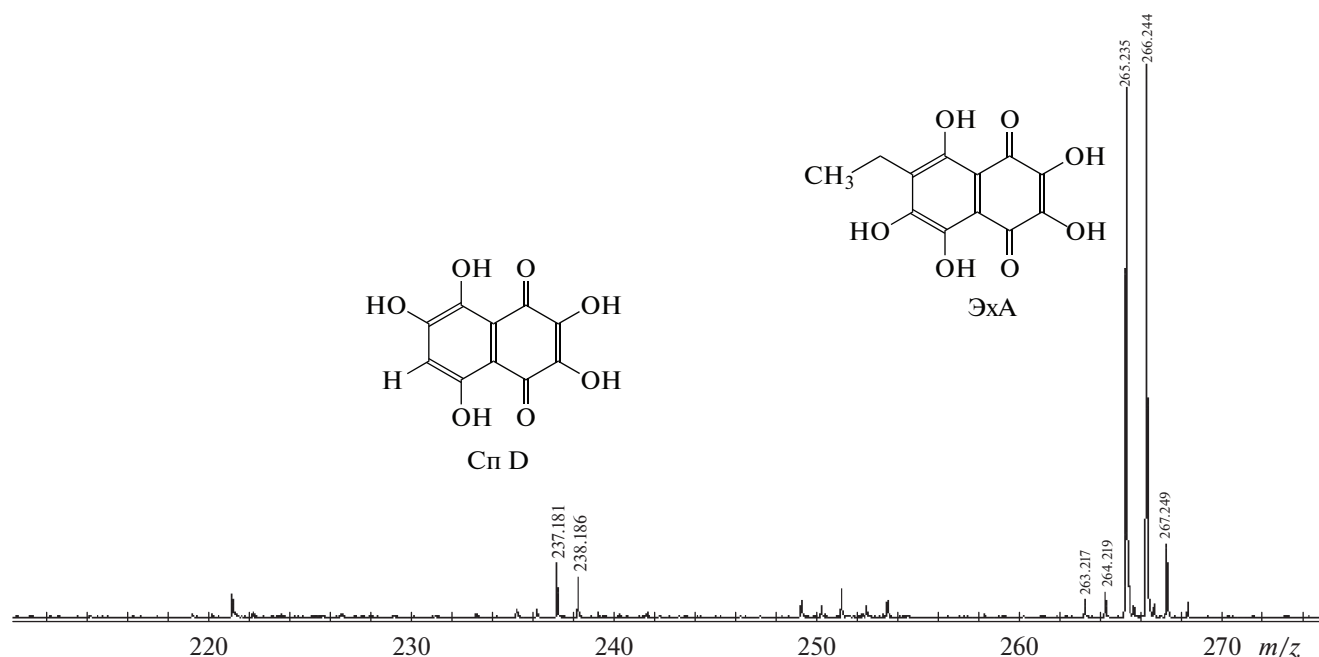


Рис. 4. Масс-спектр лазерной десорбции/ионизации спинохромов пигментов эпидермальных клеток *S. mirabilis* показывает присутствие в основном спинохром ЭхА (266/265) и незначительное количество СпД (237/238).

ложение, что качественный и количественный состав хиноидных пигментов коррелирует с особенностями их экологии (Koltsova et al., 1981). Хинойдные пигменты (эхинохром А и спинохромы) морских ежей долгое время рассматривали в качестве эффективных природных антиоксидантов, регулирующих дыхательную функцию клеток (Kuwahara et al., 2009), однако позднее выявлена их антибактериальная, антигрибковая и противоопухолевая активность (Service, Wardlaw, 1984).

Мы обнаружили, что хиноидные пигменты присутствуют в пигментных клетках, инкорпорированных в студенистые оболочки овоцитов. Они формируются в ходе овогенеза и сохраняются в студенистой оболочке, окружающей эмбрион до стадии средней бластулы. Это свойственно всем клипестероидным плоским морским ежам: *Dendraster excentricus* (Burke, Bould, 1989), *Scapochinus mirabilis*, *Sc. griseus*, *Echinarachnius parva* (Дроздов, Винникова, 2010). Число пигментных клеток в студенистой оболочке отдельной яйцеклетки мало различается внутри вида, но различно у разных видов. Наибольшее их число у *Sc. mirabilis*, а наименьшее — у *Sc. griseus*. По-видимому, оно коррелирует с общим содержанием пигментов эхинохромов у морских ежей. Известно, что содержание пигментов выше у *S. mirabilis*, именно этот вид используют для получения фармакологического препарата гистохром, который используется в кардиологии и офтальмологии. Масс-спектры ЛДИ пигментов свидетельствует, что в яйцевых оболочках преобладают пигменты СпЕ (254/253) и СпД (237/238). Пигментные

клетки эпидермиса взрослых ежей показывают в масс-спектре преобладание ЭхА (266/265). Эти данные согласуются с данными Е.А. Кольцовой с соавторами (Koltsova et al., 1981), которые показали, что хиноидные пигменты у личинок морских ежей начинают синтезироваться на стадии ранней гастролы, когда формируется личиночный кальциевый скелет. Интересно, что в результате наших исследований, в яйцах, лишенных студенистой оболочки, спинохромы не обнаружены.

Обилие —ОН-групп на нафтохиноидном остове молекул спинохромов (СпЕ имеет максимальный набор — 6 —ОН-групп) обуславливает формирование иона $[M-H]^-$ при их определении последовательностью пробоподготовки и жидкостной хроматографией-масс-спектрометрией (ЖХ-МС) с ионизацией электрораспылением (Zhou et al., 2011). Использованный в нашей работе способ лазерной десорбции/ионизации позволяет без пробоподготовки и разделения измерять спинохромы в сырых экстрактах благодаря характерному дублету ионов $[M-H]^-$ и $M^{\bullet-}$. Последний, долгоживущий молекулярный анион-радикал, является специфическим признаком хинонов (Елькин и др., 2011). А вместе с ионом $[M-H]^-$ характеризует полигидроксилированные хиноны, к которым относятся спинохромы морских ежей (Елькин и др., 2012). Масс-спектр ЛДИ экстракта пигментных клеток эпидермиса *S. mirabilis* (рис. 4) показал, что состав спинохромов, СпД и ЭхА, аналогичен таковому в личинках на 6-й день жизни (Ageenko et al., 2014). Исследование состава

экстракта пигментных клеток, инкорпорированных в студенистую оболочку, показало существенно иной состав пигментов, в котором доминирует СпЕ (ионы 253/254) (рис. 2). Незначительные количества ЭхА (ионы 265/266), можно отнести на счет неполной отмывки гамет от этого спинхрома, окрашивающего гаметы при процедуре их экскреции. Поскольку спинохром Е не растворяется в хлороформе, то Е.А. Кольцова с соавторами, используя хлороформ для экстракции неотмытых, гамет выявили в них только ЭхА, возможно адсорбированный оболочкой гамет из морской воды (Koltsova и др., 1981).

Известно, что оплодотворение морских ежей сопровождается оксидативным взрывом, связанным с производством пероксида водорода (H_2O_2) из молекулярного кислорода хинон- и нафтохинон-зависимой оксидазой Udx1 (Shapiro, 1991). Поскольку в яйцах хинонов и овотиола нет, то для перекисного стимулирования эмбриогенеза используется водорастворимый СпЕ, проникающий в цитоплазму в результате диффузии. Спинохром ЭхА не растворяется в воде и иммобилизован гидрофобным якорем этильной группы в клетках поверхности животного.

Работа поддержана программой “Дальний Восток” (проекты 15-I-6-0050 и 15-I-6-0070).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дроздов А.Л., Винникова В.В. Морфология гамет морских ежей залива Петра Великого Японского моря // Онтогенез. 2010. Т. 41. № 1. С. 47–57.
- Елькин Ю.Н., Чередниченко А.И., Кольцова Е.А., Артюков А.А. Масс-спектрометрия с ионизацией захватом электронов эхинохрома А // Масс-спектрометрия. 2011. Т. 8. № 2. С. 147–149.
- Елькин Ю.Н., Задорожный П.А., Кольцова Е.А., Пишенин С.А., Воробьев А.С., Асфандиаров Н.Л. Масс-спектры отрицательных ионов полярных нафтохинонов // Масс-спектрометрия. 2012. Т. 9. № 4. С. 277–280.
- Ageenko N.V., Kiselev K.V., Dmitrenok P.S., Odintsova N.A. Pigment cell differentiation in sea urchin blastula-derived primary cell cultures // Marine Drugs. 2014. V. 12. № 7. P. 3874–3891. doi 10.3390/md12073874
- Anderson H.A., Mathieson J.W., Thomson R.H. Distribution of spinochrome pigments in echinoids // Comp. Biochem. Physiol. 1969. V. 28. P. 333–345.
- Beeble A., Calestani C. Expression pattern of polyketide synthase-2 during sea urchin development // Gene Expression Patterns. 2012. V. 12. P. 7–10.
- Belanger A.M., Rustad R.C. Movements of echinochrome granules during the early development of sea urchin eggs // Nature New Biol. 1972. V. 239. P. 81–83.
- Burke R.D., Bouland C. Pigment follicle cells and the maturation of oocytes in the sand dollar, *Dendraster excentricus* // Devel. Growth Differ. 1989. V. 31. № 5. P. 431–437.
- Calestani C., Rogers D.J. Cis-regulatory analysis of the sea urchin pigment cell gene polyketide synthase // Devel. Biol. 2010. V. 340. № 2. P. 249–255. doi 10.1016/j.ydbio.2010.01.026
- Castoe T.A., Stephens T., Noonan B.P., Calestani C. A novel group of type I polyketide synthases (PKS) in animals and the complex phylogenomics of PKSs // Gene. 2007. 392. N1–2. 47–58. doi 10.1016/j.gene.2006.11.005
- Koltsova E.F., Boguslavskaya L.V., Maximov O.B. On the function of quinoid pigments in sea urchin embryos // Int. J. Invertebrate Reproduction. 1981. V. 4. № 1. P. 17–23.
- Kominami T., Takata H., Takaichi M. Behavior of pigment cells in gastrula-stage embryos of *Hemicentrotus pulcherrimus* and *Scaphechinus mirabilis* // Develop. Growth Differ. 2001. V. 43. P. 699–707.
- Kominami T., Takata H. Process of pigment cell specification in the sand dollar, *Scaphechinus mirabilis* // Dev. Growth Differ. 2002. V. 44. P. 113–125.
- Kuwahara R., Hatate H., Chkami A., Murata H., Kijidani Y. Quantitative separation of antioxidant pigments in purple sea urchin shells using a reversed-phase high performance liquid chromatography // LWT Food Sci. Technol. 2010. V. 43. P. 1185–1190.
- MacMuun C.A. Studies in animal chromatology // Pros. Brit. Phyl. Soc. 1883. V. 3. P. 380–407.
- Nishibori K. Studies on pigments of marine animals-III. Echinochrome A from the spine of sanddollar, *Echinorachnius mirabilis* // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 1957. V. 22. № 11. P. 708–712.
- Service M., Wardlaw A. Echinochrome-A as a bactericidal substance in the coelomic fluid of *Echinus esculentus* (L.) // Comp. Biochem. Physiol. Part B. 1984. V. 79. P. 161–165.
- Shapiro B.M. The control of oxidant stress at fertilization // Science. 1991. V. 252. № 5005. P. 533–536.
- Takata H., Kominami T. Behavior and differentiation process of pigment cells in a tropical sea urchin *Echinometra mathaei* // Develop. Growth Differ. 2003. V. 45. № 5–6. P. 473–483.
- Volkman J.K. Australasian research on marine natural products: Chemistry, bioactivity and ecology // Mar. Freshw. Res. 1999. V. 50. P. 761–779.
- Wong J.L., Wessel G.M. Reactive oxygen species and Udx1 during early sea urchin development // Devel. Biol. 2005. V. 288. № 2. P. 317–333.
- Zhou D.Y., Qin L., Zhu B.W., Wang X.D., Tan H., Yang J.F., Li D.M., Dong X.P., Wu H.T., Sun L.M., Li X.L., Murata Y. Extraction and antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from spines of purple sea urchin *Strongylocentrotus nudus* // Food Chemistry. 2011. V. 129. № 4. P. 1591–1597. doi 10.1016/j.foodchem.2011.06.014

Pigments in Eggs and Epidermal Cells of Clypester Sand Dollars *Scaphechinus mirabilis*

A. L. Drozdov^{1, 3, *}, A. A. Artyukov², and Y. N. Elkin²

¹*Zhirmunsky Institute of Marine Biology, National Scientific Center of Marine Biology, FEB RAS, Vladivostok, 690041*

²*Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, 690022*

³*Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690950*

*e-mail: anatoliyld@mail.ru

Received December 23, 2015; in final form, September 23, 2016

The pigment cells of epidermis and gametes for Clypesteroidae sand dollar *Scaphechinus mirabilis* were isolated with help an enzymatic method and naphtaquinone pigments of their alcohol extract were studied. It was found that naphtaquinone pigments present in the pigment cells that imbedded into their jelly coat of the oocytes but not in the cytoplasm of unfertilized eggs. Mass spectra laser desorption ionization showed that pigments of the jelly coat are composed of spinochromes E and D, where as echinochrome A and spinochrome D were measured in the pigment cells isolated from epidermis of adult urchins. Spinochromes of the eggs deprived jelly coat were found. It is known that the sea urchin fertilization accompanied by oxidative burst associated with the production of hydrogen peroxide from molecular oxygen by quinone and naphthoquinone-dependent oxidase Udx1. Because of the fact lacking quinones in eggs cytoplasm, then biosynthesis of hydrogen peroxide to stimulate embryogenesis apparently used the spinochrome E water soluble and penetrating by diffusion into the cytoplasm. The dominant in epidermal cells echinochrome A is not soluble in water and, presumably, immobilized by hydrophobic anchor ethyl group in the surface cells of the epidermis of the animal.

Keywords: clipesteroid sea urchins, naphthoquinones, echinochrome, spinohrome, pigments, jelly envelope, epidermis