

УДК: 593.95:616-092.4

## МОРСКОЙ ЁЖ (*STRONGYLOCENTROTUS PURPURATUS*) КАК МОДЕЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ.

Гальцова Е.А., Раджабова Г.С., Голубова С.А

ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава Российской Федерации – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, направление подготовки «Биология», Россия, Волгоград, e-mail: [takizyka@mail.ru](mailto:takizyka@mail.ru)

В этой статье обобщены современные знания о морских ежах и их текущем использовании в лабораторных исследованиях. Морские ежи довольно долго используются в исследованиях клеточной биологии и биологии развития в силу того, что имеют множество преимуществ: они широко распространены, имеют высокую плодовитость, сам зародыш прост в строении и прозрачен, что облегчает исследование, помимо этого существенным плюсом так же является быстрый эмбриогенез и высокая выносливость. Морской ёж – это очень мощный источник производства гамет. Самцов и самок морских ежей легко заставить выделить огромное количество яйцеклеток или сперматозоидов. Опыты на морских ежах внесли огромный вклад в ряд биологических наук, включая биохимию, генетику, физиологию и эмбриологию, в саму медицину в целом. Эти животные также являются фаворитами в классе, и их легко использовать для живой демонстрации оплодотворения и раннего развития. Основные открытия в области морских ежей значительно расширили знания о взаимодействии сперматозоидов и яйцеклеток, механизмах активации яйцеклеток, контроле клеточного цикла, генетических сетях развития и защите эмбриона и зародышевой линии.

**Ключевые слова:** пурпурный морской ёж, модельный объект, тестирование на токсичность

## SEA URCHIN (*STRONGYLOCENTROTUS PURPURATUS*) AS A MODEL OBJECT IN BIOLOGICAL RESEARCH.

Galtsova E.A., Radzhabova G.S., Golubova S.A.

FSBEI HE VolgSMU Of the Ministry of Healthcare of the Russia Federaion – Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Volgograd State Medical University» Of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation direction of preparation “Biology”, Russia, Volgograd, e-mail: [takizyka@mail.ru](mailto:takizyka@mail.ru)

This article summarizes current knowledge about sea urchins and their current use in laboratory research. Sea urchins have been used for quite a long time in research of cell biology and developmental biology due to the fact that they have many advantages: they are widespread, have high fertility, the embryo itself is simple in structure and transparent, which facilitates research, in addition, a significant plus is also rapid embryogenesis and high endurance. The sea urchin is a very powerful source of gamete production. Males and females of sea urchins can easily be forced to secrete a huge number of eggs or sperm. Experiments on sea urchins have made a huge contribution to a number of biological sciences, including biochemistry, genetics, physiology and embryology, to medicine itself in general. These animals are also favorites in the classroom, and they are easy to use for a live demonstration of fertilization and early development. Major discoveries in the field of sea urchins have significantly expanded knowledge about the interaction of sperm and eggs, the mechanisms of egg activation, cell cycle control, genetic networks of development and protection of the embryo and germ line.

**Key words:** purple sea urchin, model object, toxicity testing.

## **Введение**

В качестве модельных объектов для биологических исследований не всегда выбирают животных с наиболее простыми условиями содержания, иногда подходящий объект для исследования бывает очень сложен в уходе. Одним из таких модельных объектов является морской ёж его сложно содержать, из-за требующегося для этого дорогого оборудования. Задача данной работы рассмотреть морского ёжа как объекта биологических исследований и конкретно - пурпурного морского ёжа. Целью данного обзора является обобщение информации по культивированию, содержанию и использованию в лабораторной деятельности морских ежей. Актуальность выбранной темы обусловлена высоким спросом объекта, как в медицинских, так и в биологических целях.

## **Описание *Strongylocentrotus purpuratus***

**Морской ёжи** - это донные животные, относящиеся к классу иглокожих. Они обитают во многих морях и океанах. Одно из условий их существования - очень соленая вода, поэтому в таких морях как Черное, Каспийское и Балтийское, их практически нет. [5]

**Пурпурный морской ёж** обитает вдоль тихоокеанского побережья Северной Америки от Аляски до острова Цедрос (Мексика). [6]

Пурпурный морской ёж имеет шаровидное тело, состоящее из радиально симметричного панциря, покрытого многочисленными подвижными светло-фиолетовыми иглами. Размер взрослой особи варьирует от 5 до 10 см. У молодых ежей в окраске игл преобладает зеленоватый оттенок. Среди игл находятся амбулакральные ножки и педицеллярии. Оральная сторона тела, на которой располагается рот, обращена к субстрату. Во рту морских ежей находится сложно устроенный пищедобывательный аппарат — «аристотелев фонарь». Пять костных зубов, входящих в его состав, позволяют откусывать или соскребать пищу.

На противоположной (аборальной) стороне открывается анальным отверстием задняя кишка. Самцы и самки пурпурного морского ежа морфологически не различаются. [7, 8]

## **Культивирование эмбрионов и рост личинок**

Животных тщательно промывают фильтрованной морской водой, чтобы смыть с их поверхности любые микроорганизмы, которые могут поселиться среди яиц и впоследствии загрязнить культуры.

Нерест вызывается с помощью введения соли KCl концентрацией 0,5 мкмоль/л через перистомиальную мембрану в область гонад. Количество этой соли варьируется в зависимости от размера животного. Часто требуется несколько инъекций и энергичное встряхивание, чтобы вызвать размножение всех пяти гонопор.

Для сбора яиц самок морских ежей переворачивают над стаканами с фильтрованной морской водой, которые охлаждают в ванне с колотым льдом. Пурпурные морские ежи способны производить до нескольких миллионов икринок за нерест.

Сперму собирают “сухой” у нерестящегося животного с помощью пастеровской пипетки. Затем сперму хранят в пробирке на льду до тех пор, пока она не понадобится. Во время линьки животные должны быть влажными и находиться вне воды не более 30-40 минут. При соблюдении этих простых мер предосторожности смертность от нереста незначительна, и животное может нереститься снова и снова.

Если требуется несколько самок, образец яиц каждой из них должен быть сначала проверен на оплодотворяемость, прежде чем яйца будут объединены. Иногда морские ежи сбрасывают незрелые или деформированные яйцеклетки, особенно в первые несколько недель нового сезона. Эти гаметы следует выбросить.

После нереста икру фильтруют через 100 мкм сетку, которая прикрепляется ко дну небольшого акрилового цилиндра, чтобы избавиться от колючек и другого мусора. Яйца пурпурного ежа имеют диаметр около 80 мкм, и поэтому сетка толщиной 100 мкм идеально подходит для этой цели.

Затем яйцам дают отстояться, а надосадочную морскую воду отсасывают. Они промываются таким образом три раза с использованием морской воды, отфильтрованной с помощью миллипор. При полном отстаивании объем 1 мл содержит примерно 1 000 000 яиц.

Для оплодотворения промытых яйцеклеток разбавляют одну каплю сухой спермы на 5 мл морской воды и добавляют часть этого раствора в яйцеклетки. Двух миллилитров этой суспензии сперматозоидов обычно достаточно для оплодотворения  $4 \cdot 10^7$  яйцеклеток в 4 литрах морской воды.

Через 24 часа после оплодотворения бластулы вылупляются и становятся свободно плавающими организмами. После гастрюляции у личинок развиваются удлиненные руки, поддерживаемые известковыми скелетными стержнями. Руки выстланы реснитчатыми полосами и используются для подвижности и сбора пищи.

Эмбрионы культивируют в морской воде, отфильтрованной с помощью миллипор 0,45 мкм, и до тех пор, пока личинки не начнут питаться, в среду добавляют 40 мг/л антибиотика, гентамицина сульфата.

Эмбрионы выращивают в культуральных камерах, которые частично погружены в водяную баню для поддержания постоянной температуры 16°C. Эмбрионы осторожно перемешивают пластиковой лопаткой, приводимой в действие электрическим двигателем с частотой вращения 20 оборотов в минуту. Так эмбрионы и личинки поддерживаются во взвешенном состоянии

Воду в культуре личинок следует менять раз в неделю или чаще, если она становится грязной или контаминированной. Помимо перемешивания, никакой дополнительной аэрации не требуется, если воду регулярно менять.

Пока зародыши не достигнут стадии плутеуса, их можно выращивать в довольно плотных популяциях (до  $10^4$  личинок на 1 мл) при достаточном перемешивании и аэрации, но по мере того, как они начинают питаться и расти, это количество значительно уменьшается. Начало подкармливания *S. purpuratus* происходит на пятый день после оплодотворения. В это время уменьшаем культуру до трех личинок/мл. Через 14 дней количество уменьшается до одной личинки/мл, а через 21 день - до одной личинки на 3 мл. К тому времени, когда более развитые личинки готовы к метаморфозу (обычно через 6-8 недель) плотность снижается до одной личинки на 10 мл.

Личинок кормят одноклеточной золотисто-коричневой водоросли (рационом *Rhodomonas lens*), которую выращивают в лаборатории. Кормят ежедневно и дают столько клеток, сколько они могут съесть за 24 часа. В течение первых 2 недель нужно кормить личинок 3000 клеток *Rhodomonas* на 1 мл морской воды, а в течение последних 2 недель 6000 клеток/мл. Личинки должны быть проверены с помощью препарирующего микроскопа на наличие водорослей в кишечнике, и из среды можно взять образец для быстрого подсчета *Rhodomonas* в культуре (по образцу определяют концентрацию водорослей).

Перекармливание приведет к загрязнению среды.

Недостаточное питание приведет к замедлению развития и возможной дегенерации личинок.

Водоросли культивируются в среде *Provasoli D* (модифицированный раствор микроэлементов для среды) с добавлением в формулу биотина. Питательная среда состоит из искусственной основы из морской воды, дополненной витаминами и микроэлементами.

Развитие обычно происходит более синхронно при выращивании небольшого количества животных, с которыми можно обращаться индивидуально на протяжении всего процесса. Метаморфоза обычно начинается в течение 1 часа после того, как развитые личинки оседают. У животных образуются пять трубчатых ног, ряд хрупких шипов и три педицеллярии, а затем они остаются прикрепленными ко дну в течение 5-6 дней (за это время процесс метаморфоза завершится). В течение этого времени они не питаются.

В конце метаморфического периода молодь морских ежей переносят в пластиковые чашки Петри, в которых культивировали диатомовые водоросли. В этих посудах молодь содержится около 10 дней или до тех пор, пока она не сможет пастись на покрытых водорослями камнях или других естественных источниках пищи. В каждой чашке можно выращивать примерно 20 недавно подвергшихся метаморфозе морских ежей.

Через день из посуды выкачивается половина морской воды, а затем добавляется свежая. Когда диатомовые водоросли почти все съедены (обычно в течение 5-6 дней) молодых морских ежей перекладывают в новую чашку Петри с питательной средой.

От десяти до 20 молоди, в зависимости от размера породы, переносятся в новую среду в аквариум, поддерживаемый при температуре 16°C и оснащенный надежной системой фильтрации. Флуоресцентное освещение используется для поддержания здоровья водорослей. Месяц спустя, когда они все еще пасутся на камнях, нужно начать кормить этих молодых морских ежей маленькими кусочками ульвы или морского салата. Примерно через 3 месяца после метаморфозы в их рацион вводят кусочки ламинарии. [4]

### **Причины выбора этого объекта и области использования.**

Положительные стороны Пурпурного морского ежа:

- Широко распространён;
- Большое количество особей в популяции, очень плодовиты;
- Активный промысел (в нескольких регионах мира);
- Важный компонент сублиторальной (прибрежная зона моря) морской экологии;
- Выносливость в качестве организма для лабораторных исследований;
- Простота получения взрослых особей, эмбрионов и вызывания быстрого эмбриогенеза;
- Зародыш прозрачен и имеет простое строение;
- Являются ближайшими известными родственниками хордовых;
- Секвенирование генома и описание сложных сетей регуляции генов во время эмбриогенеза морского ежа сделали этот модельный объект незаменимым для изучения регуляции экспрессии генов.

Отрицательные: длительное время его генерации, что делает его непрактичным в качестве модели для создания и поддержания трансгенных линий; дорогостоящее оборудование для содержания.

Морские ежи оказались чрезвычайно полезными для научного понимания ряда биологических дисциплин, включая физиологию, эмбриологию, биохимию и генетику. Эти исследования предоставили совокупность знаний, которые стали основой того, что мы знаем о базовых клеточных событиях, таких как митоз, с первыми сообщениями о хромосомах, оплодотворении и эмбриогенезе, с последствиями, выходящими далеко за рамки биологии иглокожих, а затем переведенными в общую биологию и медицину.

Используя этот модельный вид, ученые смогли подробно описать механизмы контроля клеточного цикла и клеточной адгезии, оплодотворения, передачи сигналов кальция, дифференцировки клеток и гибели. Массивное параллельное секвенирование генома

морского ежа позволило расшифровать основные компоненты регуляторных сетей генов во время активации эмбриональных сигнальных путей. [2]

### **Биологические анализы морских ежей при тестировании на токсичность**

**Подкисление морской воды:** изменения рН первоначально изучались в эмбрионах и сперме морских ежей в качестве предмета стандартизации биологических анализов.

Было обнаружено, что развивающиеся эмбрионы в условиях незначительного снижения рН (порядка 0,5 единиц рН), подвергались повреждению эмбриогенеза и митотическим абберациям, с более сильным эффектом, когда обработка проводилась до вылупления, чем на более поздних стадиях развития (бластула / гастрюла).

Когда сперма морского ежа подвергалась воздействию изменений рН, оплодотворение ингибировалось и снижением рН (<7), и повышением (>8,5). Кроме того, наблюдалось трансмиссивное повреждение потомства спермы, подвергшейся воздействию низкого рН, с точки зрения дефектов развития и снижения митотической активности.

**Ряд неорганических веществ (Cd, As, Cr, Pb, Cl, Ag, Mn, La, Ce, Gd)** были протестированы на морских ежах. Оказалось, что эти вещества неблагоприятно воздействуют на развитие морских ежей, а точнее на успешность оплодотворения, митотическую активность, также и на другие эффекты, такие как индукция апоптоза, дефекты кальцификации, повреждение ДНК и увеличение производства активных форм кислорода. [1]

### **Влияние меди и никеля на стадии эмбрионального развития Пурпурного морского ежа**

Целью этого исследования было получение данных о механизмах токсичности меди [Cu (4-12 мг/л)] и никеля [Ni (33-40 мг/л)] при непрерывном сублетальном (доза загрязнителя окружающей среды, значительно нарушающая жизненные функции) воздействии в морской воде (32 ppt, 15°C) в чувствительном тестовом организме (*Strongylocentrotus purpuratus*) на его эмбриональное развитие.

Ионы всего организма [кальций (Ca), натрий (Na), калий (K) и магний (Mg)], содержание металлов, поглощение Ca и активность Ca-АТФазы измеряли каждые 12 ч в течение первых 72-84 ч развития. Нарушение ионорегуляции, было важным механизмом токсичности для обоих металлов и происходило при минимальной биоаккумуляции металлов.

Как итог:

Было значительное нарушение гомеостаза Ca, прекращалось накопление Ca во всем организме и уменьшилась активность Ca-АТФазы.

В разное время эмбрионы, подвергшиеся воздействию Cu и Ni, также демонстрировали более низкую степень содержания K и повышенное содержание Na, что указывает на ингибирование активности Na/K АТФазы.

Также наблюдалось увеличение уровня Mg на начальных стадиях развития у эмбрионов, подвергшихся воздействию Cu (исследователи посчитали что сработал компенсаторный механизм нарушений гомеостаза Ca, поскольку оба этих иона являются важными составляющими развивающейся спикулы).[3]

### **Заключение**

В ходе исследований было описано как культивируются морские ежи, выяснилось, как они реагируют на разного рода раздражители: на изменение pH, неорганические вещества и др. Исследования, проведённые на пурпурных морских ежах полезны для биологических дисциплин, включая физиологию, эмбриологию, биохимию и генетику.

### **Список используемой литературы**

1. Giovanni Pagano, Marco Guida, Marco Trifuoggi, Philippe Thomas Sea Urchin Bioassays in Toxicity Testing: I. Inorganics, Organics, Complex Mixtures and Natural Products // Expert Opinion on Environmental Biology. - 2017. - Vol 6 No 1. - С. 10.
2. Leonid Adonin, Anatoliy Drozdov, Nickolai A. Barlev Sea Urchin as a Universal Model for Studies of Gene Networks // Frontiers in Genetics. - 2021. - №Vol. 11. - С. 12.
3. Margaret S Tellis, Mariana M Lauer, Sunita Nadella, Adalto Bianchini The effects of copper and nickel on the embryonic life stages of the purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) // Arch Environ Contam Toxicol. - 2014. - №Vol 67 No 3. - С. 453-464.
4. Thomas E. Schroeder Methods in cell biology. - vol. 27 изд. - New York: Academic Press, 1986. - 470 с.
5. Морские ежи // sitekid.ru онлайн энциклопедия URL: [https://sitekid.ru/zivotnye/morskie\\_ezhi.html](https://sitekid.ru/zivotnye/morskie_ezhi.html) (дата обращения: 14.10.22).
6. БИОЛОГИЯ И ЗНАЧЕНИЕ МОРСКИХ ЕЖЕЙ, Рефераты из Зоология // docsity URL: <https://www.docsity.com/ru/biologiya-i-znachenie-morskih-ezhey/5352675/> (дата обращения: 14.10.22).
7. Пурпурный морской еж // многообразие животных URL: <https://sites.google.com/site/animals548/bespozvonocnye/iglokozje/purpurnyj-morskoj-ez> (дата обращения: 14.10.22).
8. *Strongylocentrotus purpuratus* // Animal Diversity Web URL: [https://animaldiversity.org/accounts/Strongylocentrotus\\_purpuratus/](https://animaldiversity.org/accounts/Strongylocentrotus_purpuratus/) (дата обращения: 14.10.22).