

## СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ МОРСКИХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ: РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ИНДУКЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ IN VITRO

© Н. А. Одинцова

*Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток;  
электронный адрес: nelodin@mail.ru*

В обзоре рассмотрены собственные и литературные данные, свидетельствующие о пластичности стволовых клеток (СК) морских беспозвоночных. Стволовые и эмбриональные клеточные культуры морских беспозвоночных представляют собой новые модельные системы с высоким уровнем всех физиологических и синтетических процессов. Продукция биологически активных веществ *in vitro* может стать альтернативой химическому синтезу или аквакультуре. Проведен анализ факторов, вовлеченных в детерминацию и поддержание мультипотентности стволовых клеток этих животных в культуре. Технология индукции дифференцировки СК морских беспозвоночных *in vitro* в определенный функционально активный клеточный тип включает в себя использование не только различных факторов роста и субстратов искусственного и природного происхождения, но и уникальных биологически активных веществ из тканей морских организмов. Для увеличения экспрессии регуляторных генов морских беспозвоночных нами предложен подход, основанный на использовании генно-инженерных конструкций, содержащих чужеродные гены. Эмбриональные СК морских беспозвоночных *in vitro* и управление процессами их роста и дифференцировки открывают перспективу их широкого применения в биологии развития и в морской биотехнологии.

**Ключевые слова:** морские беспозвоночные, стволовые клетки, клеточные культуры, направленная дифференцировка.

Получение постоянных линий эмбриональных стволовых клеток было отнесено к одному из наиболее значимых достижений биологии XX в. и получило широкий научный и общественный резонанс. Если у большинства организмов стволовые клетки (СК) взрослых особей редки и трудны для изучения, то у некоторых морских беспозвоночных в связи с повышенной их способностью к регенерации и наличием у них бесполого размножения существует постоянно высокий пул СК.

Широкий спектр биологически активных веществ делает морских беспозвоночных привлекательным объектом для биотехнологических разработок. Однако при культивировании клеток морских беспозвоночных различных таксонов исследователи сталкиваются с рядом проблем, важнейшие из которых — низкая пролиферативная активность клеток в культурах и контаминация. Клетки сохраняют высокую жизнеспособность в течение длительного периода времени (до 2—3 нед), однако интенсивность метаболических процессов при культивировании снижается. При этом задача состоит в том, как из клеток, размножающихся в культуре, получить не только отдельные тканеспецифические клетки морских гидробионтов, а их определенные комбинации, способные к синтезу биологически активных веществ, формированию спикул и т. д.

Если с 1988 по 1998 г. большую часть исследований по культивированию клеток морских беспозвоночных проводили на клетках моллюсков, то в последние годы значительно увеличилось количество работ, проводимых

на клетках таксонов других морских беспозвоночных (Rinkevich, 2005). Цель данной работы — анализ факторов, вовлеченных в детерминацию и поддержание плюрипотентности СК различных типов морских беспозвоночных в культуре.

### Губки (Porifera)

Губки — самые древние из многоклеточных животных. Они размножаются как бесполом, так и половым путем, продуцируя гаметы. Губки содержат недифференцированные клетки (архециты), которые постепенно возобновляются и дифференцируются в любые другие клеточные типы, выполняющие специфические физиологические функции. Архециты можно считать эмбриональными СК губок. Их дифференцировку, например, в скелетные клетки, синтезирующие спиккулы, можно индуцировать силикатами и ионами железа (Plan et al., 1996). Количество работ по культивированию клеток губок увеличилось за последние 5 лет в 5 раз (Rinkevich, 2005), потому что среди морских гидробионтов именно губки продуцируют наибольшее количество самых разнообразных биологически активных веществ. Диссоциированные клетки губок в культуре быстро теряют теломеразную активность (Custodio et al., 2004). Однако в среде, содержащей большие количества магния и кальция, диссоциированные клетки губок образуют небольшие сферические агрегаты (примморфы диаметром 1—2 мм), в которых об-

наружены теломеразная активность и включение бромдезоксигуанидина (Müller et al., 1999), что характерно для активно делящихся клеток. Кроме того, именно в приморфях клетки способны синтезировать вторичные метаболиты, такие как, например, аварол (Müller et al., 2000). Увеличение пролиферативной активности и направленная дифференцировка СК губок могут быть достигнуты при введении лектинов. В первичной культуре археоциты, стимулированные лектином фитогемагглютинином, удваивались за 36 ч (Willoughby, Pomponi, 2000). Более того, в процессе культивирования этих клеток возрастала скорость синтеза стевенсина, обладающего противоопухолевым эффектом.

### Стрекающие (Cnidaria)

При культивировании клеток из тканей Cnidaria была установлена определяющая роль клеточно-субстратных взаимодействий в активации клеточного деления (Frank, Rinkevich, 1999; Schmid et al., 1999). Получены клеточные линии из нескольких видов колониальных коралловых полипов (Frank et al., 1994).

Молекулярные механизмы влияния межклеточного матрикса и факторов адгезии на направление дифференцировки клеток остаются неясными, однако известно, что специфические субстраты не только усиливают прикрепление клеток, но и могут регулировать направление их дифференцировки (Boudreau, Bissell, 1998). Клетки мягких и твердых кораллов, культивированные на положительно заряженной поверхности, очень быстро прикреплялись и через 1 нед начинали синтезировать коллаген и другие белки межклеточного матрикса. Ежедневное введение аскорбиновой кислоты в культуральную среду увеличивало синтез коллагена на 40 % (Helman et al., 2008). Отмечены увеличение активности щелочной фосфатазы и отложение кристаллов углекислого кальция в форме арагонита только в прикрепленных клетках первичных культур этих животных (Domart-Coulon et al., 2001).

### Ракообразные (Crustacea)

Для корнеголовых ракообразных, как и для многих колониальных беспозвоночных, характерно чередование полового и бесполого размножения. Клеточной основой такой репродуктивной стратегии являются СК, в которых обнаружена селективная экспрессия активности щелочной фосфатазы и ядерного антигена пролиферирующих клеток — маркеров эмбриональных СК позвоночных животных (Исаева и др., 2007).

В большинстве работ, описывающих первичные культуры из тканей ракообразных, культивируют клетки креветок рода *Penaeus*. Клетки в этих культурах остаются жизнеспособными около 1 мес. Только в одной работе клетки яичников креветок поддерживали более 17 мес (Fraser, Hall, 1999). Авторы описывают дифференцировку этих клеток в 4 морфологических типа, но конфлюэнтные монослои образовывали только фибробластоподобные клетки, которые субкультивировали трижды. Для оценки пролиферативного потенциала различных тканей креветок был проведен специальный скрининг на наличие теломеразной активности (Lang et al., 2004). Во всех тканях, включая лимфоидную ткань, мышцы, сердце, гепатопанкреус, семенники и яичники, обнаружена теломеразная ак-

тивность, но максимальный уровень зарегистрирован для яичников. Для сравнения заметим, что у млекопитающих в большинстве соматических клеток отсутствует теломеразная активность, которая исчезает и при дифференцировке СК в культуре (Kim et al., 1994). В процессе культивирования клеток лимфоидной ткани креветок уровень теломеразной активности возрастал и достигал максимума на 20-е сут культивирования, превышая уровень в лимфоидной ткани в 2.5 раза (Lang et al., 2004).

### Колониальные асцидии (Colonial tunicates, Urochordata)

Получение постоянных клеточных линий асцидий двумя независимыми группами ученых показало, что низкий митотический индекс (0.1—0.2 %) и продолжительный клеточный цикл (170—200 ч), характерные для организма асцидий, можно изменить в культуре (Rinkevich, Rabinovitz, 1994; Kawamura, Fujiwara, 1995). Клетки постоянной линии, полученной Кавамурой и Фудживарой из целомического эпителия колониальной асцидии рода *Botryllus*, удваивались в культуре всего за 13 ч (Kawamura, Fujiwara, 1995). Такая высокая скорость деления, вероятно, связана с введением в среду специфического лектина из тканей асцидии, который обладал свойствами фактора роста для этих клеток. Установлено, что в условиях *in vitro* не только основные механизмы колониального роста асцидий замещаются другими путями развития, но и внутренние часы колоний с программируемой смертью замещаются новым биологическим механизмом с другим «расписанием» (Rabinovitz, Rinkevich, 2004).

### Иглокожие (Echinodermata)

На сегодняшний день существует далеко не полная информация о генах ростовых факторов, которые экспрессируются в тканях морских беспозвоночных животных (Yuh et al., 1998), что не позволяет целенаправленно действовать на конкретные гены. Для позвоночных животных известно, что высокий потенциал пролиферации, характерный для эмбриональных СК в культуре, связан с выключением «программ» специализации, а механизм реализации программы СК на поддержание тотипотентности определяется набором генов, регулирующих состояния «стволовости» (Rodda et al., 2005). Ключевым звеном в этой цепочке являются два гена — *oct-4* и *nanog*. Один из этих консервативных генов был обнаружен в морском еже *Strongylocentrotus purpuratus* как ген *SpOct* (Char et al., 1993).

Мы провели скрининг последовательностей ДНК, гомологичных таковым другого ключевого гена плюрипотентности — *nanog* — у некоторых морских беспозвоночных и обнаружили его гомолог в геноме морских ежей (Одинцова и др., 2007): гомология по аминокислотным остаткам около 64 %, идентичность — 44.7 %. Более того, обнаружено, что эти последовательности имеют более высокое сходство с геном *bsx* (brain-specific homeobox gene) мыши: гомология — 80.8 %, идентичность — 61.7 %. У млекопитающих экспрессия этого гена происходит во время закладки нервной системы (Stemona et al., 2004), тогда как у морского ежа экспрессия обнаружена на стадии мезенхимной бластулы (самое начало гаструляции).

Как уже отмечалось, увеличение времени культивирования приводит к снижению метаболической активности клеток, даже в эмбриональных культурах. Так, например, через 10 сут культивирования уровень синтеза ДНК (уровень включения  $^3\text{H}$ -тимидина) в клетках бластулы морского ежа падает практически до 0 (рис. 1). Для увеличения метаболической активности культивируемых клеток кроме широко используемых для многих таксонов морских беспозвоночных экзогенных факторов роста мы использовали введение генетических конструкций, несущих чужеродные гены.

Ранее мы показали, что чужеродные гены, такие как ген *gal4*, кодирующий активатор транскрипции у дрожжей, и агробактериальные онкогены *rol*, могут быть встроены в геном эмбрионов морских ежей, экспрессироваться там и приводить к аномалиям эмбрионального развития этих животных (Bulgakov et al., 2002, 2006). С помощью введения плазмид, содержащих ген *gal4*, можно индуцировать активную пролиферацию эмбриональных клеток морских ежей и в культуре (рис. 2). В клетках, полученных из трансфицированных эмбрионов, через 2 мес культивирования было обнаружено присутствие нафтохиноидных пигментов (Одинцова и др., 2003), спектр поглощения которых сходен со спектром эхинохрома — вещества с уникальными терапевтическими свойствами.

Важнейшим инструментом воздействия на клетки морских беспозвоночных в условиях культуры могут быть лектины. Митогенное действие, хорошо известное для растительных лектинов, характерно и для некоторых лектинов из тканей морских беспозвоночных (Bretting et al., 1981; Engel et al., 1992; Kawamura, Fujiwara, 1995). Более того, в составе молекул нескольких лектинов обнаружены ЭФР-подобные последовательности (Dhume et al., 1996).

Мы установили, что глюкозамин-специфичный лектин (с мол. массой 27 кДа) из тканей асцидии *Didemnum ternatum* стимулировал рост или дифференцировку культивируемых эмбриональных клеток моллюсков и иглокожих в зависимости от стадии эмбрионального развития (Odintsova et al., 1999). Он проявлял свойства фактора роста для СК — клеток ранних эмбриональных стадий (рис. 3, а, б), а свойства фактора адгезии и дифференцировки — для клеток, полученных на поздних эмбриональных стадиях (рис. 3, в, г).

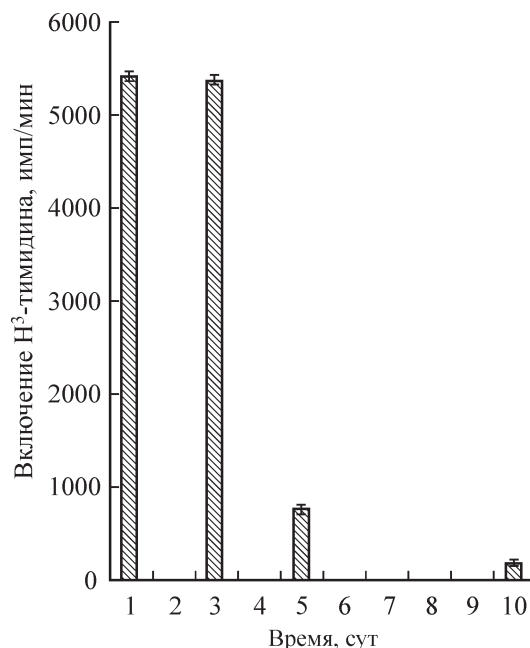


Рис. 1. Изменение синтеза ДНК в клетках гастролы морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* в процессе культивирования.

Для индукции деления используют не только различные факторы роста, но и субстраты искусственного и природного происхождения. В культуре регенерирующей кишки трепанга (на определенной стадии регенерации) были обнаружены активно делящиеся клетки: на полилизинном субстрате в виде монослоя росли преимущественно клетки целомического эпителия, тогда как при культивировании на пластике или коллагене клетки, морфологически похожие на энтероциты, переходили в суспензию, и их число быстро увеличивалось (Odintsova et al., 2005).

Исследования по направленной дифференцировке СК иглокожих связаны в основном с индукцией спиколюгенеза в культуре. Существует единственное сообщение о митогенной дифференцировке в культуре эмбриональных клеток морской звезды (Kaneko et al., 1997). 1-суточная инкубация эмбрионов морской звезды на стадии гастролы в растворе 0.6 М глицина приводила к тому, что в культу-

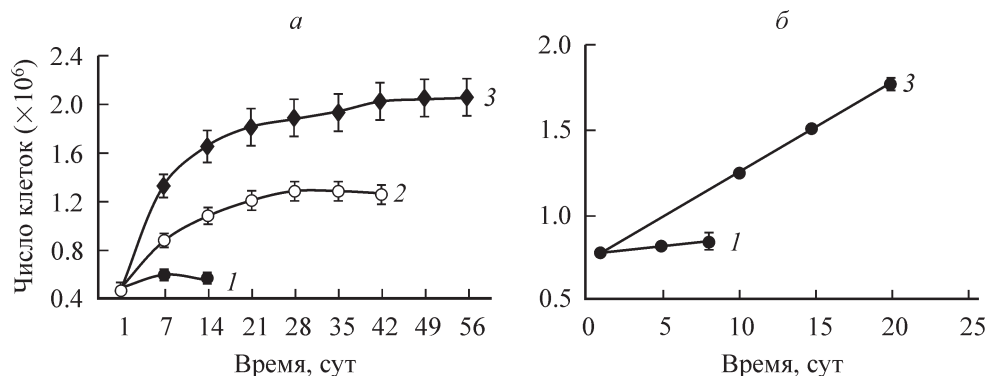


Рис. 2. Активация пролиферации в клетках бластулы двух видов морских ежей, обработанных плазмидами, несущими ген *gal4*.

а — клетки *Strongylocentrotus intermedius*; б — клетки *Schaphechinus mirabilis*. 1 — контрольные клетки; 2—3 — клетки после обработки генетическими конструкциями, содержащими ген *gal4*: рМА564 с неактивным геном (2) и рМА563 с функциональным геном (3). Суспензия клеток была инкубирована с плазмидной ДНК (0.01—1.00 мкг) в течение 1 мин и затем постепенно был добавлен равный объем 15%-ного раствора полиэтиленгликоля (мол. масса 4000) в морской воде. Пролиферативную активность клеток оценивали с помощью прямого подсчета клеток в течение всего времени культивирования.

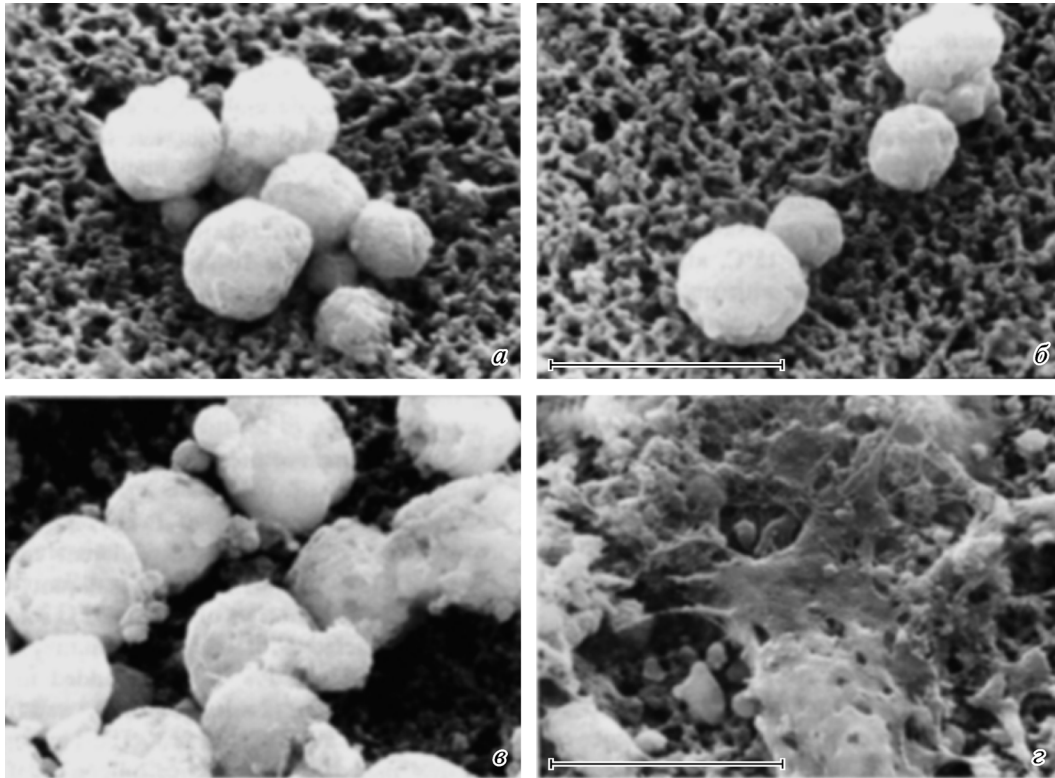


Рис. 3. Влияние лектина из асцидии *Didemnum ternatanum* (DTL) на эмбриональные клетки морского ежа *Strongylocentrotus nudus* (сканирующая электронная микроскопия).

*a, б* — клетки бластулы; *в, г* — клетки гастротулы; *a, в* — контроль; *б, г* — клетки после инкубации с DTL (2.5 мкг/мл). Клетки культивировали при 15 °С на фильтрах (Millipore, 0.22 мкм) в течение 3 сут до фиксации. На всех панелях одно и то же увеличение. Масштабная линейка — 10 мкм.

ре все эпителиальные клетки погибали. Оставались только мезенхимные клетки, образующие в течение 1 сут в присутствии инсулина обширные сети. Через 1 нед в культуре среди мезенхимных синцитиев были обнаружены мышечные клетки.

### Моллюски (Mollusca)

Моллюски — это животные с очень ранним типом детерминации всех зародышевых листков. После появления первого квартета микромеров на анимальном полюсе происходит индукция вегетативно расположенной СК мезодермы (3D-макромера). Центральное положение этого макромера индуцирует развитие СК мезодермы. Индукция мезодермы происходит на 24-клеточной стадии, ког-

да на апикальном конце устанавливается тесный контакт между 3D-макромером и рядом микромеров, которые при следующем делении становятся мезодермальными СК (De Laat et al., 1980). При такой ранней детерминации очень трудно получить делящиеся клетки, тем не менее митозы были обнаружены в длительно переживающих культурах (до 5—6 мес) клеток моллюсков, полученных из эмбриональных клеток гребешка *Mizuchopecten yessoensis* (Odintsova, Khomenko, 1991) и из сердца двустворчатого моллюска *Meretrix lusoria* (Chen, Wen, 1999).

В культуре эмбриональных клеток брюхоногого моллюска *Haliotis rufescens* впервые для морских беспозвоночных была установлена миогенная дифференцировка (Naganuma et al., 1994). Первоначально клетки не обладали какой-либо двигательной активностью, но уже через 12 ч были отмечены первые спонтанные сокращения. Раз-

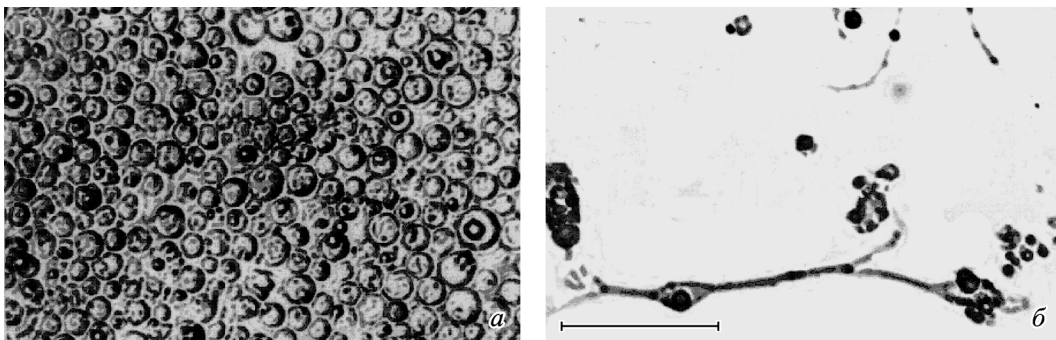


Рис. 4. Морфология личиночных клеток мидии *Mytilus trossulus*, культивированных на разных субстратах.

*a* — на коллагене (I типа), *б* — на пластике. Время культивирования 3 сут. Масштабная линейка — 50 мкм.

работанный нами комплекс условий для направленной миогенной дифференцировки эмбриональных клеток моллюсков позволяет получать мышечные клетки и в бесывороточных средах. Принципиальным является выбор субстрата. На коллагене эмбриональные клетки моллюсков имели высокий пролиферативный потенциал (Odintsova, Khomenko, 1991), но коллагеновый субстрат препятствовал распластыванию клеток (рис. 4, а) и как следствие терминальным стадиям миогенеза. На ранних этапах миогенной дифференцировки впервые была обнаружена поперечная исчерченность клеток в культуре (Дячук, 2008), которая характерна для мышц ранних стадий личиночного развития мидии — велигера (Одинцова и др., 2007а). На поздних стадиях дифференцировки формировались функционально полноценные гладкомышечные клетки (рис. 4, б), обладающие теми же набором основных мышечных белков и спектром двигательной активности, что и гладкомышечные клетки мидии, дифференцировавшиеся *in vivo* (Odintsova et al., 2000; Plotnikov et al., 2003).

Кроме того, нами впервые были подобраны условия культивирования эмбриональных клеток мидии, при которых может быть реализована не только мышечная, но и нейрональная дифференцировка (Дячук, Одинцова, 2007). Обнаружено, что СК моллюсков могут одновременно дифференцироваться в культуре как в мышечные клетки, производные мезодермы, так и в нейрональные клетки, производные эктодермы. С помощью полученных антител против мышечных белков мидии (миозина, парамиозина и твитчина) и коммерческих антител против нейромедиаторов (серотонина и FMRFамида) установлено, что на начальных этапах культивирования мышечные и нейрональные элементы располагаются хаотично, но на более поздних стадиях происходит ассоциация клеток в колонии (Дячук, 2008). В центре колоний располагались серотонин- и FMRFамид-иммунореактивные клетки, а на периферии располагались мышечные клетки, которые объединялись с другими группами мышечных клеток, формируя сокращающуюся сеть.

Результаты, полученные на беспозвоночных животных, могут помочь в определении общего механизма плюрипотентности эукариот, а СК морских беспозвоночных *in vitro* и управление процессами их роста и дифференцировки открывают перспективу их широкого применения в морской биотехнологии.

Выражаю искреннюю благодарность за плодотворное обсуждение разделов статьи В. А. Дячуку, К. В. Яковлеву (Институт биологии моря ДВО РАН), В. П. Булгакову (Биолого-почвенный институт ДВО РАН) и О. Л. Серову (Институт цитологии и генетики СО РАН).

Работа выполнена при финансовой поддержке ДВО РАН (проекты 06-П-СО-06-025 и NT-08-016-04).

### Список литературы

Дячук В. А. 2008. Миогенная и нейрональная дифференцировка клеток личинок мидии *Mytilus trossulus* *in vivo* и *in vitro*: Автореф. канд. дис. Владивосток. 24 с.  
 Дячук В. А., Одинцова Н. А. 2007. Направленная дифференцировка эмбриональных клеток мидии *Mytilus trossulus* в культуре: Матер. Междунар. симп. «Клеточные, молекулярные и эволюционные аспекты морфогенеза» (Москва, 9—13 октября 2007). 54—55.

Исаева В. В., Шукалюк А. И., Ахмадиева А. В. 2007. Стволовые клетки беспозвоночных животных с репродуктивной стратегией, включающей бесполое размножение. Биология моря. 33 (1) : 3—10.

Одинцова Н. А., Дячук В. А., Карпенко А. А. 2007а. Развитие мышечного аппарата и сократительной активности мидии *Mytilus trossulus* (Mollusca: Bivalvia). Онтогенез. 38 (3): 235—240.

Одинцова Н. А., Киселев К. В., Булгаков В. П., Кольцова Е. А., Яковлев К. В. 2003. Влияние активатора транскрипции эукариот GAL4 на рост и развитие эмбрионов и эмбриональных клеток в первичных культурах морского ежа *Scaphechinus mirabilis*. Онтогенез. 34 (4) : 267—272.

Одинцова Н. А., Яковлев К. В., Дячук В. А., Серов О. Л. 2007б. Эволюционно консервативные гены плюрипотентности клеток морских беспозвоночных. Цитология. 49 (9) : 780—781.

Boudreau N., Bissell M. J. 1998. Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. Curr. Opin. Cell Biol. 10 : 640—646.

Bretting H., Phillips S. G., Klumppart H. J., Kabat E. A. 1981. A mitogenic lactose-binding lectin from the sponge *Geodia cydonium*. J. Immunol. 127 : 1652—1658.

Bulgakov V. P., Kiselev K. V., Zhuravlev Yu. N., Yakovlev K. V., Gontcharov A. A., Odintsova N. A. 2006. Agrobacterium-mediated transformation of sea urchin embryos. J. Biotechnol. 1 : 454—461.

Bulgakov V. P., Odintsova N. A., Plotnikov S. V., Kiselev K. V., Zacharov E. V., Zhuravlev Yu. N. 2002. Gal4 gene-dependent alterations of embryo development and cell growth in a primary culture of the sea urchins. Marine Biotechnol. 4 : 480—486.

Char B. R., Bell J. R., Dovala J., Coffman J. A., Harrington M. G., Becerra J. C., Davidson E. H., Calzone F. J., Maxson R. 1993. SpOct, a gene encoding the major octamer-binding protein in sea urchin embryos: expression profile, evolutionary relationships, and DNA binding of expressed protein. Develop. Biol. 158 : 350—363.

Chen S. N., Wen C. M. 1999. Establishment of cell lines derived from oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg and hard clam, *Meretrix lusoria* Roding. Methods Cell Sci. 21 : 183—192.

Cremona M., Colombo E., Andreazzoli M., Cossu G., Broccoli V. 2004. Bsx, an evolutionary conserved brain specific homeobox gene expressed in the septum, epiphysis, mammillary bodies and arcuate nucleus. Gene Exp. Patterns. 4 : 47—51.

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

De Laat S. W., Tertoolen L. G. J., Dorresteijn A. W. C., van den Biggelaar J. A. M. 1980. Intercellular communication patterns are involved in cell determination in early molluscan development. Nature. 287 : 546—548.

Dhume S. T., Stears R. L., Lennerz W. L. 1996. Sea urchin egg receptor for sperm: the oligosaccharide chains stabilize sperm binding. Glycobiology. 6 : 59—64.

Domart-Coulon I., Elbert D. C., Scully E. P., Calimlim P. S., Ostrander G. K. 2001. Aragonite crystallization in primary cell cultures of multicellular isolates from a hard coral *Pocillopora damicornis*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 98 : 11 885—11 890.

Engel M., Bachmann M., Schroder H. C., Rinkevich B., Kljajic Z., Uhlenbruck G., Muller W. E. 1992. A novel galactose- and arabinose-specific lectin from the sponge *Pellina semitubulosa*: isolation, characterization and immunobiological properties. Biochimie. 74 : 527—537.

Frank U., Rabinowitz C., Rinkevich B. 1994. *In vitro* establishment of continuous cell cultures and cell lines from ten colonial cnidarians. Marine Biol. 120 : 491—499.

Frank U., Rinkevich B. 1999. Scyphozoan jellyfish's mesoglea supports attachment, spreading and migration of anthozoans' cells *in vitro*. Cell Biol. Int. 23 : 307—311.

Fraser C. A., Hall M. R. 1999. Studies on primary cell cultures derived from ovarian tissue of *Penaeus monodon*. Methods Cell Sci. 21 : 213—218.

- Helman Y., Natale F., Sherrell R. M., LaVigne M., Starovoytov V., Gorbunov M. Y., Falkowski P. G. 2008. Extracellular matrix production and calcium carbonate precipitation by coral cells *in vitro*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 105 : 54—58.
- Ilan M., Contini H., Carmeli S., Rinkevich B. 1996. Progress towards cell cultures from a marine sponge that produces bioactive compounds. J. Marine Biotechnol. 4 : 145—149.
- Kaneko H., Kawahara Y., Okamoto M., Dan-Sonkawa M. 1997. Study on the nature of starfish larval muscle cells *in vitro*. Zool. Sci. 14 : 287—296.
- Kawamura K., Fujiwara S. 1995. Establishment of cell lines from multipotent epithelial sheet in the budding tunicate, *Polyandrocampa misakiensis*. Cell Structure and Function. 20 : 97—106.
- Kim N. W., Piatyszek M. A., Prowse K. R., Harley C. B., West M. D., Ho P. L. C., Coviello G. M., Wright W. E., Weinrich S. L., Shay J. W. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science. 266 : 2011—2015.
- Lang G. H., Wang B.-Z., Nomura N., Matsumura M. 2004. Detection of telomerase activity in tissues and primary cultured lymphoid cells of *Penaeus japonicus*. Marine Biotechnol. 6 : 347—354.
- Müller W. E. G., Bohm M., Batel R., De Rosa S., Tommonaro G., Müller I. M., Schroder H. C. 2000. Application of cell culture for the production of bioactive compounds from sponges: synthesis of avarol by primmorphs from *Dysidea avara*. J. Nat. Prod. 63 : 1077—1081.
- Müller W. E. G., Wiens M., Batel R., Steffen R., Custodio M. R. 1999. Establishment of a primary cell culture from a sponge: primmorphs from *Suberites domuncula*. Marine Ecol. Prog. Ser. 178 : 205—219.
- Odintsova N. A., Belogortseva N. I., Ermak A. V., Molchanova V. I., Luk'yanov P. A. 1999. Adhesive and growth properties of lectin from the ascidian *Didemnum ternatanum* on cultivated marine invertebrate cells. Biochim. biophys. acta. 1448 : 381—389.
- Odintsova N. A., Dolmatov I. Yu., Mashanov V. S. 2005. Regenerating holothurian tissues as a source of cells for long-term cell cultures. Marine Biol. 146 : 915—921.
- Odintsova N. A., Khomenko A. V. 1991. Primary cell culture from embryos of the Japanese scallop *Mizuchopecten yessoensis* (Bivalvia). Cytotechnology. 6 : 49—54.
- Odintsova N. A., Plotnikov S. V., Karpenko A. A. 2000. Isolation and partial characterization of myogenic cells from mussel larvae *in vitro*. Tissue and Cell. 32 : 417—424.
- Naganuma T., Degnan B. M., Horikoshi K., Morse D. E. 1994. Myogenesis in primary cell cultures from larvae of the abalone, *Haliotis rufescens*. Mol. Marine Biol. Biotechnol. 3 : 131—140.
- Plotnikov S. V., Karpenko A. A., Odintsova N. A. 2003. Comparative characteristic of *Mytilus* muscle cells developed *in vitro* and *in vivo*. J. Exp. Zool. 298 A : 77—85.
- Rabinowitz C., Rinkevich B. 2004. *In vitro* delayed senescence of extirpated buds from zooids of the colonial tunicate *Botryllus schlosseri*. J. Exp. Biol. 207 : 1523—1532.
- Rinkevich B. 2005. Marine invertebrate cell cultures: new Millennium trends. Marine Biotechnol. 7 : 429—439.
- Rinkevich B., Rabinowitz C. 1994. Acquiring embryo-derived cell cultures and aseptically metamorphosis of larvae from the colonial protochordate *Botryllus schlosseri*. Inverteb. Reprod. Develop. 25 : 59—72.
- Rodda D. J., Chew J.-L., Lim L.-H., Loh Y.-H., Wang B., Ng H.-H., Robson P. 2005. Transcriptional regulation of Nanog by OCT4 and SOX2. J. Biol. Chem. 280 : 24 731—24 737.
- Schmid V., Ono S. I., Reber-Müller S. 1999. Cell-substrate interaction in Cnidaria. Micros. Res. Tech. 44 : 254—268.
- Willoughby R., Pomponi S. A. 2000. Quantitative assessment of marine sponge cell *in vitro*: development of improved growth medium. In Vitro Cell Develop. Biol. Anim. 36 : 194—200.
- Yuh C. H., Bolouri H., Davidson E. H. 1998. Genomic Cis-regulatory logic: experimental and computational analysis of a sea urchin gene. Science. 279 : 1896—1902.

Поступила 18 II 2008

#### STEM CELLS OF MARINE INVERTEBRATES: REGULATION OF PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION PROCESSES *IN VITRO*

N. A. Odintsova

Institute of Marine Biology of Far East Branch of RAS, Vladivostok;  
e-mail: neladin@mail.ru

Own and literary data pointing to plasticity of stem cells of marine invertebrates are viewed. Stem and embryonic cell cultures of marine invertebrates are model cell systems with a high level of all physiological and synthetic processes. The production of biological active substances *in vitro* may become an alternative to the chemical synthesis or marine aquaculture. The factors involved in determination and maintenance of the pluripotency of marine invertebrate stem cells are analyzed. The *in vitro* technology of directional differentiation of marine invertebrate stem cells in certain functionally active cell species includes the use of different growth factors, various natural and artificial substrates and also the unique biological active substances from marine invertebrate tissues. To increase expression levels of the cell growth regulatory genes and thus achieve enhanced cell growth, one method of attack was reported using the genetically engineered constructions with foreign genes. Our knowledge gained in invertebrate systems can help to determine a general mechanism of eukaryote pluripotency, and cultivated marine invertebrate cells can be used in marine biotechnology.

This work was supported by grants 06-II-CO-06-025 and NT-08-016-04 of the Far East Branch of RAS.

Key words: marine invertebrates, stem cells, cell cultures, directional differentiation.