БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ, 2023, том 40, № 6, с. 456–462

УДК 57.017.642,577.175.823

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КОМПОНЕНТОВ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В РАННЕМ РАЗВИТИИ МЫШИ

© 2023 г. В. С. Фролова[a, *], А. Д. Иванова[a], М. С. Конорова[a], Ю. Б. Шмуклер[b], Д. А. Никишин[a, b]

[a] *Московской государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия*

[b] *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334 Россия*

**e-mail: frolova.veronika.2014@post.bio.msu.ru*

Поступила в редакцию 17.04.2023 г.
После доработки 25.07.2023 г.
Принята к публикации 02.08.2023 г.

Серотонин является регулятором раннего эмбрионального развития и имеет полноценную функциональную систему в доимплантационных эмбрионах млекопитающих. В данной работе было проведено описание пространственного внутриклеточного распределения серотонина, везикулярного транспортера моноаминов VMAT2 и рецепторов серотонина 5-HT_{1D} и 5-HT_{2A} на разных стадиях раннего эмбрионального развития мыши. Серотонин, транспортер VMAT2 и рецептор 5-HT_{1D} визуализируются в кортикальном компартменте клеток, тогда как рецептор 5-HT_{2A} имеет более равномерное распределение по всей цитоплазме. Сравнение размеров иммунореактивных частиц показало, что статистически значимые различия между серотонином и транспортером VMAT2 отсутствуют, что говорит в пользу наличия везикул, в которых серотонин накапливается при участии VMAT2 для дальнейшей межклеточной сигнализации. Кроме того, паттерны иммунореактивности рецепторов 5-HT_{1D} и 5-HT_{2A} существенно различались, что может свидетельствовать о выполнении каждым из этих серотониновых рецепторов разных функций в раннем эмбриогенезе.

Ключевые слова: мышь, нейротрансмиттеры, доимплантационные эмбрионы, серотонин, серотонинергическая система

DOI: 10.31857/S023347552306004X, **EDN:** GLJNWH

ВВЕДЕНИЕ

Нейротрансмиттеры – биологически активные вещества разнообразной природы, которые играют важную роль в передаче электрохимического импульса между нейронами, а также от нейронов к клеткам мышечной ткани и железистым клеткам [1]. К классическим представителям этой группы относят некоторые аминокислоты и их производные, например гистамин, индоламины, катехоламины – эволюционно древние молекулы, осуществляющие функции модуляторов долговременных морфофункциональных изменений в клетке [2]. Функциональная активность этих веществ была показана как для животных, не имеющих нервной системы (например, простейших и губок), так и для высших многоклеточных животных, обладающих сложной нервной системой [3, 4].

Долгое время эти химические соединения изучались преимущественно в контексте передачи сигналов между нервными клетками взрослого организма. Г.А. Бузников в середине XX века впервые предположил и экспериментально продемонстрировал регуляторную роль некоторых нейротрансмиттеров, в частности серотонина, в донервном эмбриогенезе различных животных [5–10]. Наличие серотонина, его транспортеров и рецепторов на ранних стадиях эмбриогенеза, а также способность серотонинспецифических фармакологических агентов вмешиваться в эмбриональное развитие привели к предположению, что в ранних эмбрионах серотонин участвует в регуляции клеточной пролиферации и/или морфогенетических движений [11]. Однако до сих пор представление о локализации донервных трансмиттеров, а также о распределении их рецепторов и транспортеров в эмбриональных клетках остается неполным.

В ооцитах и ранних эмбрионах мыши серотонин выявляется на всех стадиях развития в виде точечных структур [12, 13]. Кроме того, в раннем развитии мыши показана экспрессия генов основных компонентов серотонинергической си-

стемы – ферментов синтеза и деградации, мембранных рецепторов, специфического мембранного транспортера [12–15]. Целью настоящей работы было исследование пространственного распределения внутри клетки серотонина и компонентов серотонинергической системы – везикулярного транспортера моноаминов VMAT2, рецепторов серотонина 5-HT_{1D} и 5-HT_{2A} – в ооцитах и доимплантационных зародышах мыши.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Работу проводили на половозрелых самках мышей линии C57Bl/6, которых на ночь подсаживали к самцам для получения датированной беременности. Утро, когда была обнаружена вагинальная пробка, было принято за срок развития dpc 0.5. Эмбрионы на разных стадиях доимплантационного развития получали на сроках dpc 1.5 (двухклеточная стадия), dpc 2.0 (четырехклеточная стадия), dpc 2.5 (восьмиклеточная стадия), dpc 3.0 (морула) и dpc 3.5 (бластоциста).

Иммуноцитохимия. GV-ооциты и эмбрионы фиксировали в течение 1 ч при комнатной температуре, либо в течение ночи при 4°C в 4% растворе параформальдегида, разведенном в фосфатно-солевом буфере (PBS). Затем ооциты и эмбрионы отмывали в фосфатно-солевом буфере с добавлением Triton X-100 (Sigma-Aldrich) (PBST) и обрабатывали 0.25% раствором коллагеназы (ПанЭко, П011-1) или 1% раствором додецилсульфата натрия (SDS) для снятия блестящей оболочки, после чего снова отмывали PBST. В дальнейшем образцы инкубировали в течение 1 ч в блокирующем растворе: смеси 3% бычьего сывороточного альбумина (BSA) (Sigma-Aldrich), 1% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich), 0.1% Triton X-100, 0.01% Tween-20 (Sigma-Aldrich) и 0.01 M PBS (pH 7.4).

После этого образцы инкубировали в первичных антителах, разведенных в блокирующем растворе, в течение ночи при 4°C. Были использованы следующие первичные антитела: кроличьи антитела против серотонина (Sigma-Aldrich, S5545, 1 : 1000), кроличьи антитела против VMAT2 (Invitrogen, PA5-77496, 1 : 1000); кроличьи антитела против 5-HT_{1D} (Invitrogen, PA5-95901, 1 : 1000); кроличьи антитела против 5-HT_{2A} (Invitrogen, PA5-95288, 1 : 1000). Затем образцы отмывали PBST и инкубировали в течение 1 ч во вторичных антителах: FITC-конъюгированные козьи антитела против IgG кролика (Jackson ImmonoResearch, 111-095-003, 1 : 200). Затем образцы отмывали и монтировали на предметные стекла в среду Mowiol. Анализ иммунореактивности в образцах проводили с помощью конфокальных лазерных сканирующих установок Zeiss LSM880 (Carl Zeiss AG, Германия) и Leica TCS SP5 (Leica Microsystem GmbH, Германия), используя 63× и 100× масляные объективы соответственно. Для визуализации использовали лазер с длиной волны возбуждающего света 488 нм. В качестве негативного контроля использовали препараты, которые не инкубировали в растворе первичных антител. Полученные изображения анализировали с использованием программного обеспечения ImageJ. Размер частиц оценивался вручную на отдельных оптических срезах: после выделения очертаний частицы вычислялся диаметр круга полученной площади, что определялось как линейный размер частицы.

Вестерн-блотинг. В качестве положительного контроля иммуноспецифического связывания препаратов для конфокальной лазерной сканирующей микроскопии был проведен вестерн-блотинг образцов ткани яичника для транспортера VMAT2, рецепторов 5-HT_{1D} и 5-HT_{2A}. Для этого образцы ткани яичника гомогенизировали в буфере RIPA, а концентрацию белка измеряли с помощью набора для анализа белка BCA Pierce™ (Thermo Fisher Scientific). Образцы денатурировали в буфере Лэммли в течение 30 мин при 37°C. Белки разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, используя 10% разделяющий буфер, а затем переносили на мембрану Immun-Blot® PVDF с помощью системы мокрого блотинга Mini-Protean (Bio-Rad Laboratories Inc.). Мембраны блокировали 5% BSA в течение 1 ч при комнатной температуре и инкубировали с первичными антителами (1 : 20000), которые также были использованы для иммуноцитохимического связывания, в течение 1 ч при комнатной температуре. После отмывки в TBST мембраны инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Jackson ImmonoResearch, 111-035-003, 1 : 50000). После отмывки в TBST конъюгированные антитела визуализировали с помощью усиленной хемилюминесценции в 0.1 M Трис-HCl, pH 8.5, 12.5 мМ люминола, 2 мМ кумаровой кислоты и 0.09% H_2O_2. Изображения получали с использованием системы визуализации ChemiDoc™ и анализировали с помощью программного обеспечения Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты, полученные с помощью Вестерн-блотинга, позволили обнаружить транспортер VMAT2, а также рецепторы 5-HT_{1D} и 5-HT_{2A} в яичнике мыши (рис. 1). В качестве положительного контроля для Вестерн-блотинга использовалась ткань полосатого тела мозга (*corpus striatum*) мыши.

Серотонин выявляется в цитоплазме GV-ооцитов и доимплантационных зародышей в виде мелких гранул. На стадии GV-ооцитов наибольшая

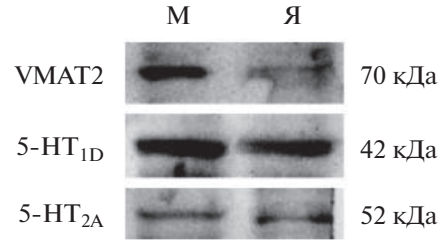

Рис. 1. Компоненты серотонинергической системы, выявленные в мозге и яичнике мыши методом Вестерн-блотинга. М – мозг (полосатое тело), Я – яичник.

иммунореактивность серотонина выявляется в кортикальном слое (рис. 2*а*) и снижается к центру яйцеклетки. Аналогичная картина наблюдается на стадиях двух- (рис. 2*б*), четырех- (рис. 2*в*) и восьмиклеточных (рис. 2*г*) зародышей, а также на морулах (рис. 2*д*) – серотонин в большей степени выявляется в апикальном компартменте на периферии эмбриона (рис. 3*а*). На стадии бластоцисты гранулы серотонина сконцентрированы в трофобласте, тогда как во внутренней клеточной массе (эмбриобласте) практически отсутствует (рис. 2*е*). Измерение размера частиц серотонина на разных стадиях демонстрирует, что по мере развития он остается неизменным и составляет 0.445 ± 0.113 мкм (рис. 3*д*).

Везикулярный транспортер моноаминов VMAT2, ответственный за накопление серотонина в везикулярных структурах, иммуногистохимически выявляется в цитоплазме GV-ооцитов и бластомерах доимплантационных зародышей, демонстрируя схожий с серотонином паттерн иммунореактивности (рис. 3*б*). При использовании антител против VMAT2 неспецифическая иммунореакция выявляется по всему зародышевому пузырьку, за исключением ядрышкоподобного тельца. Частицы, выявляемые антителами к транспортеру VMAT2, локализованы в кортикальном слое цитоплазмы ооцитов (рис. 2*ж*) и поверхностном компартменте бластомеров двух- (рис. 2*з*), четырех- (рис. 2*и*), восьмиклеточных эмбрионов (рис. 2*й*) и морул (рис. 2*к*), а у бластоцист выявляется некоторое количество VMAT2-иммунопозитивных частиц в клетках трофобласта, и практически отсутствует маркирование в клетках внутренней клеточной массы (рис. 2*л*). Измерение размеров частиц, выявляемых антителами к транспортеру VMAT2, на разных стадиях показало, что он остается неизменным и составляет 0.370 ± 0.105 мкм (рис. 3*д*).

Рецептор серотонина 5-HT_{1D} иммуногистохимически выявляется в цитоплазме GV-ооцитов преимущественно в узком примембранном слое (рис. 2*м*). У доимплантационных эмбрионов рецептор 5-HT_{1D} маркирует примембранную область внешних поверхностей бластомеров (рис. 2*н*–2*р*, 3*в*), в бластоцисте наблюдается иммунореактивность слоя клеток трофобласта (рис. 2*с*), а во внутренней клеточной массе иммунореактивность рецептора не выявлена. Размер частиц, выявляемых антителами к рецептору 5-HT_{1D}, на разных стадиях составляют 0.243 ± 0.048 мкм (рис. 3*д*).

Рецептор серотонина 5-HT_{2A} выявляется в ооцитах (рис. 2*т*) в виде крупных округлых везикул, распределенных по всей цитоплазме. Аналогичная картина наблюдалась у доимплантационных зародышей (рис. 2*у*–2*ц*, 3*г*). В бластоцистах рецептор 5-HT_{2A} выявляется как в клетках трофобласта, так и во внутренней клеточной массе (рис. 2*ч*). Средний диаметр везикул, выявляемых антителами к данному рецептору, составляет 1.226 ± 0.097 мкм (рис. 3*д*).

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ внутриклеточного распределения иммунореактивности компонентов серотонинергической системы показал, что как сам серотонин, так и его везикулярный транспортер VMAT2 локализуются в большей степени в кортикальном слое ооцитов и ранних эмбрионов, выявляясь в виде мелких гранул, встроенных в клеточную мембрану. Ранее был описан диффузный равномерный характер распределения серотонина в цитоплазме на доимплантационных стадиях развития мыши [16], однако мы наблюдали отчетливый кортикальный паттерн распределения (рис. 3*а*). Мы проанализировали выборки размеров частиц серотонина и VMAT2, используя критерий Краскела–Уоллиса, и обнаружили отсутствие статически значимых различий между ними, что также свидетельствует о том, что выявляемые частицы действительно могут быть везикулами, в которых серотонин накоплен с помощью VMAT2. Это может свидетельствовать об активности серотонина как посредника межклеточной сигнализации на поздних стадиях оогенеза [17] и в процессе межбластомерного взаимодействия на ранних стадиях развития [18].

Паттерн распределения 5-HT_{1D}- и 5-HT_{2A}-иммунопозитивных частиц существенно различается: 5-HT_{1D} выявляется в примембранном слое ооцитов и бластомеров, занимая гораздо более узкий слой, чем серотонин и VMAT2, тогда как 5-HT_{2A} выявляется по всей цитоплазме в составе очень крупных гранул. Известно, что оба рецептора функционально активны в раннем развитии мыши [11]. Эти данные могут свидетельствовать о том, что рецепторы выполняют различные функции: рецептор 5-HT_{1D} может быть связан с межклеточной коммуникацией на ранних стадиях развития, а 5-HT_{2A} – с метаболическими процессами во внутриклеточных структурах [13]. В связи с тем, что эмбриональное развитие активно регулируется аутокринными и паракринными факторами, можно предположить, что серотонин и

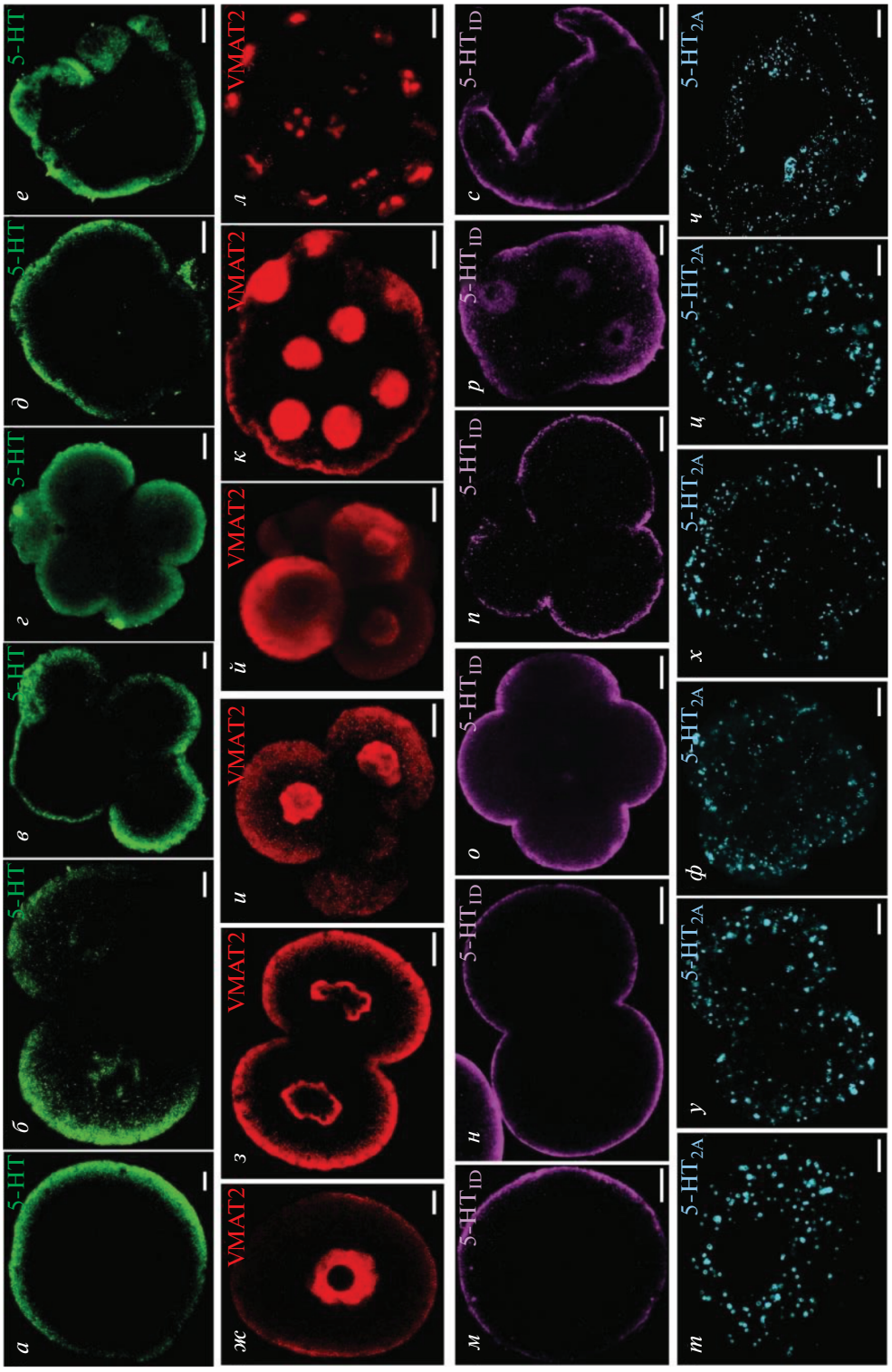

Рис. 2. Компоненты серотонинергической системы в доимплантационных эмбрионах мыши. (*а–е*) – распределение серотонина в GV-ооците (*а*), двухклеточном эмбрионе (*б*), четырехклеточном эмбрионе (*в*), восьмиклеточном эмбрионе (*г*), моруле (*д*) и бластоцисте (*е*); (*ж–л*) – распределение везикулярного транспортера моноаминов VMAT2 в GV-ооците (*ж*), двухклеточном эмбрионе (*з*), четырехклеточном эмбрионе (*и*), восьмиклеточном эмбрионе (*й*), моруле (*к*) и бластоцисте (*л*); (*м–с*) – распределение рецептора 5-HT_{1D} в GV-ооците (*м*), двухклеточном эмбрионе (*н*), четырехклеточном эмбрионе (*о*), восьмиклеточном эмбрионе (*п*), моруле (*р*) и бластоцисте (*с*); (*т–ч*) – распределение рецептора 5-HT_{2A} в GV-ооците (*т*), двухклеточном эмбрионе (*у*), четырехклеточном эмбрионе (*ф*), восьмиклеточном эмбрионе (*х*), моруле (*ц*) и бластоцисте (*ч*). Масштаб 10 мкм.

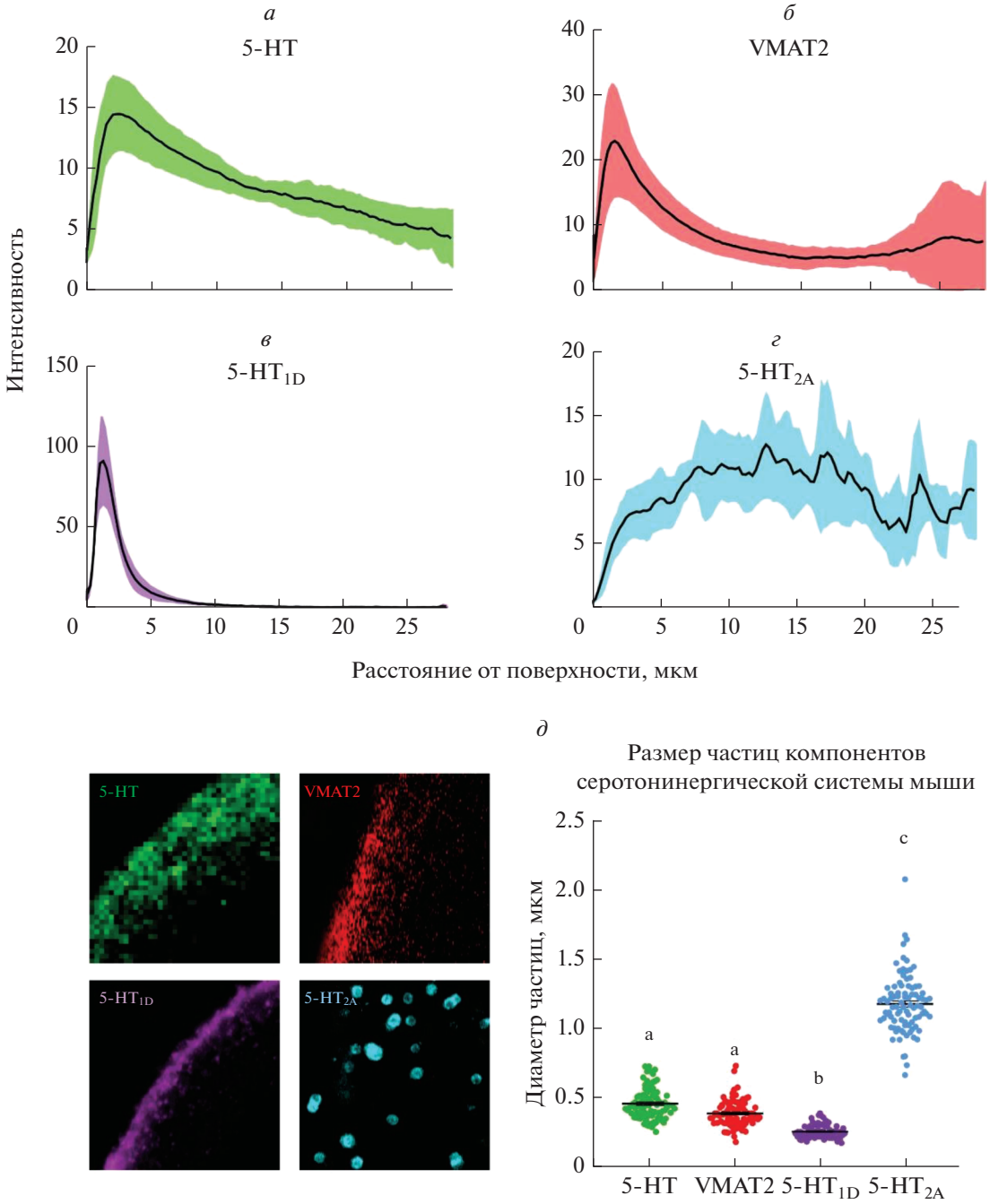

Рис. 3. Сравнение распределения и размеров компонентов серотонинергической системы в ооцитах и ранних эмбрионах млекопитающих. *а* – Распределение серотонина в GV-ооцитах и доимплантационных эмбрионах мыши; *б* – распределение транспортера VMAT2 в GV-ооцитах и доимплантационных эмбрионах мыши; *в* – распределение рецептора 5-HT_{1D} в GV-ооцитах и доимплантационных эмбрионах мыши; *г* – распределение рецептора 5-HT_{2A} в GV-ооцитах и доимплантационных эмбрионах мыши; *д* – диаметр частиц компонентов серотонинергической системы.

компоненты серотонинергической системы в раннем развитии млекопитающих могут осуществлять модуляцию действия других сигнальных молекул через механизмы взаимодействия сигнальных путей. Так, хорошо известно, что G-белок-сопряженные рецепторы образуют в клетке гомо- и гетеродимеры, от компонентного состава которых зависит их активность и механизмы трансдукции сигнала [19]. Одним из внутриклеточных механизмов регуляции раннего развития может выступать серотонилирование белков, вовлеченных в различные молекулярные каскады [20]. Однако эти гипотезы требуют дальнейшего исследования и подтверждения.

На стадии бластоцисты серотонин, везикулярный транспортер моноаминов VMAT2 и рецептор 5-HT_{1D} в большей степени выявляются в клетках трофобласта, а в клетках внутренней клеточной массы (эмбриобласта) их иммунореактивность выражена в гораздо меньшей степени. Этот результат говорит в пользу того, что серотонинергическая сигнализация может быть вовлечена в процесс первой клеточной дифференцировки в бластоцисте и может оказывать влияние на плюрипотентный статус клеток внутренней клеточной массы.

Полученные нами результаты показывают, что серотонин, транспортер VMAT2 и рецепторы 5-HT_{1D} и 5-HT_{2A} присутствуют как в GV-ооцитах, так и в доимплантационных эмбрионах и пространственно неоднородно распределены в соответствии с выполнением различных функций в эмбриональных клетках. Одновременная экспрессия двух подтипов серотониновых рецепторов (5-HT_{1D} и 5-HT_{2A}) в пределах одной эмбриональной клетки была продемонстрирована впервые, что является существенным дополнением к нашим представлениям о регуляции раннего развития. В раннем эмбриогенезе наблюдается одновременная или последовательная активность разных трансмиттерных систем – холинергической, дофаминергической и серотонинергической, которые участвуют в целом ряде процессов. Результаты данной работы указывают на то, что пространственно изолированные серотониновые рецепторы разных типов могут реагировать на один и тот же трансмиттер и реализовывать различные эффекты в разных эмбриональных механизмах/ структурах.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа В.Ф., А.И., М.К. и Д.Н. выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-10009, https://rscf.ru/project/22-74-10009/. Работа Ю.Ш. и Д.Н. выполнялась с использованием оборудования ЦКП ИБР им. Н.К. Кольцова РАН в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН № 0108-2019-0003 в 2023 г.

Соответствие принципам этики. При выполнении данного исследования все манипуляции, проводившиеся с экспериментальными животными, методы обезболивания, эвтаназии и ухода за животными до и после экспериментальных вмешательств соответствовали нормам, одобренным биоэтической комиссией ИБР РАН (Протокол № 40 от 17.09.2021).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L. 2000. *Molecular cell biology: Neurotransmitters, synapses, and impulse transmission* (4th ed.). New York: W. H. Freeman. 1184 p.
2. Torres G., Gainetdinov R., Caron M. 2003. Plasma membrane monoamine transporters: Structure, regulation and function. *Nat. Rev. Neurosci*. **4**, 13–25.
3. Xing L., Huttner W.B. 2020. Neurotransmitters as modulators of neural progenitor cell proliferation during mammalian neocortex development. *Front. Cell Dev. Biol*. **8**, 391.
4. Yamamoto K., Vernier P. 2011. The evolution of dopamine systems in chordates. *Front. Neuroanat*. **5**, 21.
5. Buznikov G.A., Chudakova I.V., Zvezdina N.D. 1964. The role of neurohumours in early embryogenesis. I. Serotonin content of developing embryos of sea urchin and loach. *Development*. **12** (4), 563–573.
6. Бузников Г.А. 1967. *Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития*. М.: Наука. 265 с.
7. Бузников Г.А. 1987. *Нейротрансмиттеры в эмбриогенезе*. М.: Наука. 232 с.
8. Бузников Г.А. 2007. Донервные трансмиттеры как регуляторы эмбриогенеза. Современное состояние проблемы. *Онтогенез*. **38**(4), 262–270.
9. Shmukler Y.B., Nikishin D.A. 2022. Non-neuronal transmitter systems in bacteria, non-nervous eukaryotes, and invertebrate embryos. *Biomolecules*. **12** (2), 271.
10. Dubé F., Amireault P. 2007. Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos. *Life Sci*. **81** (25–26), 1627–1637.
11. Buznikov G.A., Shmukler Y.B., Lauder J.M. 1996. From oocyte to neuron: Do neurotransmitters function in the same way throughout development? *Cell. Mol. Neurobiol*. **16**, 533–559.
12. Amireault P., Dubé F. 2005. Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos. *Biol. Reprod*. **73** (2), 358–365.
13. Basu B., Desai R., Balaji J., Chaerkady R., Sriram V., Maiti S., Panicker M.M. 2008. Serotonin in pre-implantation mouse embryos is localized to the mitochondria and can modulate mitochondrial potential. *Reproduction*. **135** (5), 657.
14. Amireault P., Dube F. 2005. Intracellular cAMP and calcium signaling by serotonin in mouse cumulus–oocyte complexes. *Mol. Pharmacol*. **68** (6), 1678–1687.
15. Никишин Д.А., Храмова Ю.В., Багаева Т.С., Семёнова М.Л., Шмуклер Ю.Б. 2018. Экспрессия компонентов серотонинергической системы в фолликулогенезе и доимплантационном развитии мыши. *Онтогенез*. **49** (3), 208–216.
16. Il'kova G., Rehak P., Vesela J., Čikoš S., Fabian D., Czikková S., Koppel J. 2004. Serotonin localization and its functional significance during mouse preimplantation embryo development. *Zygote*. **12**, 205–213.
17. Никишин Д.А., Храмова Ю.В., Алешина Н.М., Мальченко Л.А., Шмуклер Ю.Б. 2021. Опосредованное ооцитом влияние серотонина на функциональный статус клеток гранулезы. *Онтогенез*. **52** (2), 120–128.
18. Shmukler Y., Nikishin D. 2012. Transmitters in blastomere interactions. *Cell Interactions*. 31–65.
19. Kamal M., Jockers R. 2011. Biological significance of GPCR heteromerization in the neuro-endocrine system. *Front. Endocrinol*. **2**, 2.
20. Bader M. 2019. Serotonylation: Serotonin signaling and epigenetics. *Front. Mol. Neurosci*. **12**, 288.

Spatial Organization of the Components of the Serotonergic System in the Early Mouse Development

V. S. Frolova[1, *], A. D. Ivanova[1], M. S. Konorova[1], Yu. B. Shmukler[2], D. A. Nikishin[1, 2]

[1]Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

[2]Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

**e-mail: frolova.veronika.2014@post.bio.msu.ru*

Serotonin is a regulator of early embryonic development and has a fully functional system in preimplantation mammalian embryos. In this work, we described the spatial distribution of serotonin, the vesicular monoamine transporter VMAT2, and the serotonin receptors 5-HT_{1D} and 5-HT_{2A} at different stages of early mouse embryonic development. Serotonin, the VMAT2 transporter, and the 5-HT_{1D} receptor are visualized in the cortical compartment of cells, whereas the 5-HT_{2A} receptor has a more uniform distribution throughout the cytoplasm. Comparison of the sizes of the immunoreactive particles showed that there are no statistically significant differences between serotonin and the VMAT2 transporter, which may indicate the presence of specific vesicles containing serotonin. In addition, the two serotonin receptors, 5-HT_{1D} and 5-HT_{2A}, showed a markedly different pattern of immunoreactivity, which may indicate that they simultaneously serve different functions in early embryogenesis.

Keywords: neurotransmitters, serotonin, serotonergic system, preimplantation embryos, mouse