

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

НЕКОТОРЫЕ КОМПОНЕНТЫ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В ГЛАЗАХ ДВУХ ВИДОВ ПРЕСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКОВ

© 2023 г. И. Н. Доминова¹, А. А. Хусенова¹, В. В. Котова¹, М. В. Сидорова¹, В. В. Жуков^{1,*}

¹Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

*e-mail: valerzhukov@mail.ru

Поступила в редакцию 31.08.2023 г.

После доработки 06.10.2023 г.

Принята к публикации 11.10.2023 г.

Выполнено маркирование 5-НТ-иммунореактивных структур на срезах глаз пресноводных моллюсков *Lymnaea stagnalis* и *Pomacea canaliculata*. В периокулярной области животных обоих видов обнаружена повышенная плотность 5-НТ-ергических волокон, образующих структурно выраженные сплетения и частично проникающих в сетчатку. В тканях глаза обнаружена транскрипция генов рецепторов серотонина: двух типов у *L. stagnalis* и трех — у *P. canaliculata*. Ее относительный уровень статистически значительно превышает этот показатель в центральных ганглиях нервной системы и щупальцах. Дополнительно в тканях *P. canaliculata* была зафиксирована транскрипция гена транспортера 5-НТ. Полученные результаты обсуждаются с позиций возможного серотонинергического механизма модуляции процессов в сетчатке у брюхоногих моллюсков.

Ключевые слова: *Lymnaea stagnalis*, *Pomacea canaliculata*, сетчатка, серотонин, иммунореактивность, транскрипция генов, рецепторы 5-НТ, транспортер серотонина

DOI: 10.31857/S0044452923060037, **EDN:** HVCSLT

ВВЕДЕНИЕ

Серотонин (5-НТ) является одним из самых распространенных медиаторов и модуляторов нервных процессов в организмах как позвоночных, так и беспозвоночных животных. Влияние серотонина проявляется в широком круге функций, начиная от базовых физиологических механизмов жизнеобеспечения, таких как локомоция и питание, до процессов обучения и памяти [1, 2]. Известно также о модулирующем влиянии 5-НТ на сенсорные [3], в том числе фоторецепторные [4, 5] процессы и связанные с ними механизмы регуляции биологических ритмов [6].

Рецепторы серотонина (5-НТР), обеспечивающее его влияние на сетчатку, идентифицированы у нескольких видов позвоночных [7]. Из нервной ткани беспозвоночных, в том числе моллюсков, также выделены и охарактеризованы несколько типов 5-НТР [1], однако сведения об их присутствии в сетчатке пока отсутствуют. При этом существование серотонинергической иннервации глаза моллюсков, указывающее на возможную физиологическую роль этого вещества, выявлено у осьминога [8], и нескольких видов брюхоногих: *Aplysia californica* [9], *Bulla gouldiana* [10] и *Lymnaea stagnalis* [11, 12].

Небольшой объем и фрагментарность сведений о серотонинергическом механизме в глазах моллюсков стимулировали данную работу. Ее целью

была определена детализация характеристики серотонинергической иннервации глаза пресноводных брюхоногих моллюсков на примере двух видов: *L. stagnalis* и *P. canaliculata*. Структурной задачей исследования стал анализ топографии серотонинергических нервных элементов с точки зрения их возможности оказывать влияние на сетчатку. Задачей молекулярной части работы были поставлены выявление и идентификация компонентов серотонинергической системы в глазу исследованных моллюсков. Для этого был предпринят поиск транскриптов генов рецепторов и транспортера серотонина, а также оценка относительного уровня их транскрипции в тканях глаза сравнительно с центральной нервной системой и щупальцами. Выбор объектов был обусловлен наличием информации о 5-НТР прудовика [13, 14] и их генов у *P. canaliculata* в базе данных Gene NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=serotonin%20pomacea>; дата обращения: 01.11.2022 г.).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Взрослые особи прудовиков *Lymnaea stagnalis* со средним размером раковины около 3 см были собраны в пресноводных водоемах Калининградской области и содержались в лабораторных условиях. Улитки *Pomacea canaliculata* (средний размер раковины около 2–3 см) были вы-

рашены в аквариумах Балтийского федерального университета им. И. Канта в аэрированной водопроводной воде при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$ и световом режиме 10 C:14T.

Подготовка материала для приготовления гистологических препаратов. Из тела животного (по 4 особи каждого вида) извлекали глаза ($n = 16$) с небольшими фрагментами окружающих тканей. Все образцы фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида в течение 48 ч при температуре 4°C . После фиксации проводили пробоподготовку глаза перед приготовлением срезов на микротомекриостате (KD-3000, KEDEE) при -20°C . Для этого образцы помещали в 30%-ный раствор сахарозы и выдерживали в нем 48 ч при температуре 4°C . Образцы нарезами толщиной 70 мкм. Полученные срезы раскладывали в 12-ти луночный планшет в раствор натрий-фосфатного буфера ($\text{pH} = 7.6$) с 0.1%-м азидом натрия.

Иммуногистохимическое окрашивание. Перед проведением окрашивания на серотонин срезы промывали в растворе фосфатного буфера ($\text{pH} = 7.6$) 3 раза по 10 мин и помещали в блокирующий раствор, который включал в себя натрий-фосфатный буфер ($\text{pH} = 7.6$), 3% бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma) и 0.3% детергента Triton X-100 (0.3% Triton X-100, Sigma), в котором оставляли на 30 мин при комнатной температуре. Далее срезы инкубировали с поликлональными первичными антителами к 5-HT (кролик, PAA808Ge01, Cloud-Clone corp.) с разведением (1:1500) и оставляли в течение 48 ч при 4°C на шейкере. По завершении инкубации с первичными антителами срезы промывали 5 раз в натрий-фосфатном буфере ($\text{pH} = 7.6$), а затем на 30 мин помещали в блокирующий раствор. После этапа блокирования срезы инкубировали со вторичными поликлональными антителами, конъюгированными с Cy3 (SAA544Rb16, Cloud-Clone corp.) с разведением (1:500) в течение 48 ч при 4°C на шейкере в темноте. По истечении этого периода перед промыванием в каждую лунку добавляли флуоресцентный маркер ДНК Hoechst 33342 (2 мкг/мл) для окрашивания ядер клеток. Через 10 мин срезы промывали по 5 раз в натрий-фосфатном буфере ($\text{pH} = 7.6$).

Окрашенные срезы раскладывали на предметные стекла толщиной 1 мм, заключали в среду Mowiol (Sigma-Aldrich) и накрывали покровным стеклом толщиной 0.17 мм.

Микроскопия. Готовые препараты предварительно изучали на флуоресцентном микроскопе (Axio Imager A2, Carl Zeiss) с использованием фильтров для Hoechst (355 нм) и Cy3 (550 нм). Наиболее удачные препараты отбирали для дальнейшей работы на конфокальном микроскопе (LSM 780, Carl Zeiss). Для получения четкого представления о расположении серотонинергических волокон в сетчатке моллюсков проводили сканирование на раз-

ных фокальных плоскостях с шагом 4.33 мкм, используя функцию Z-управление (Z-stack). Серии изображений были объединены с помощью программного обеспечения ZEN конфокального микроскопа.

Обработка изображений. Количественную оценку серотонинергических волокон проводили в программе ImageJ. Для этого на изображениях, полученных с использованием объектива 20 $\times$, выбирали по 3 зоны интереса (200 $\times$ 300 px) вблизи и на удалении от сетчатки, в которых определяли число визуализированных волокон.

Статистический анализ данных иммуногистохимического окрашивания. Обработку результатов проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим *post hoc* тестом с помощью критерия Тьюки в ПО GraphPad Prism 9. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0.05$. На графиках результаты представлены как среднее $\pm$ SD.

Подготовка материала для анализа относительных уровней транскрипции (ОУТ). Из тела животного извлекали глаза, окологлоточное кольцо ганглиев, а также шупальца. Выделенные образцы хранили при -80°C .

Дизайн праймеров. Последовательность нуклеотидов праймеров для транскриптов гена *LymHTR2* (U50080.1) *L. stagnalis* была взята из работы [15]. Для других изучаемых генов обоих видов брюхоногих моллюсков праймеры подбирали с помощью программного обеспечения NCBI Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome; дата обращения: 20.11.2022 г.). Полученные праймеры анализировали и оценивали в ПО Nucleotide BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome; дата обращения: 20.11.2022 г.) по следующим показателям:

- 1) температура отжига forward и reverse праймеров $53\text{--}63^\circ\text{C}$;
- 2) содержание GC в последовательности праймеров — 50%;
- 3) длина праймера — 17–25 нуклеотидов;
- 4) размер ампликона — 100–300 пар оснований;
- 5) комплементарность исследуемой последовательности только одной последовательности кДНК исследуемого вида;
- 6) способность формировать шпильки (hairpins) — ΔG (энергия Гиббса) 3'-конца больше -2 ккал/моль, ΔG внутреннего участка больше -3 ккал/моль;
- 7) способность формировать димеры с таким же праймером (self-dimer) — ΔG 3'-конца больше -5 ккал/моль, ΔG внутреннего участка больше -6 ккал/моль;
- 8) способность формировать димеры с другим праймером (hetero-dimer) — ΔG 3'-конца больше —

5 ккал/моль, ΔG внутреннего участка больше — 6 ккал/моль.

Все пары праймеров были подобраны таким образом, чтобы области отжига на кДНК располагались на стыках экзонов [16].

Последовательности подобранных праймеров приведены в табл. 1.

Анализ уровней транскрипции генов. Количественный анализ экспрессии генов рецепторов и транспортера серотонина проводился в трех образцах тканей моллюсков: глаза, центральных ганглиев и щупальцев. У *P. canaliculata*, использовали головные щупальца, расположенные рядом с глазами стебельками.

РНК выделяли с помощью реагента ExtractRNA (Евроген) в соответствии с инструкцией производителя с дополнительной обработкой ДНКазой. Для обработки использовали 10X ДНКазный буфер и ДНКазу I (Thermo Fisher) с последующей инкубацией при 30°C в течение 10 мин. Затем ДНКазу I нейтрализовали 0.5 М ЭДТА и инкубировали при 75°C, а очищенную РНК использовали для обратной транскрипции. Концентрацию выделенной общей РНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen) и набора Qubit RNA BR Assay Kit (Invitrogen).

Выделенная РНК использовалась для постановки реакции обратной транскрипции с использованием смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов ("Смесь dNTP (10 mM)") в эквимольных концентрациях, Oligo(dT) 15ММ праймера и набора реагентов "Обратная транскриптаза MMLV" (все Евроген) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Обратную транскрипцию проводили с использованием термоциклера для амплификации нуклеиновых кислот C1000 (Bio-Rad). На проведение реакции обратной транскрипции брали около 500 нг РНК каждого образца. В качестве контрольных реакций были выбраны следующие растворы:

- 1) отрицательный контроль (вместо РНК — вода),
- 2) контроль без обратной транскриптазы MMLV (нужен для определения загрязнения геномной ДНК),
- 3) контроль без праймеров.

Уровни транскрипции генов рецепторов и транспортера серотонина определяли методом количественной ПЦР. В качестве референсного гена был выбран ген глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (*Gapdh*), так как он является одним из наиболее стабильно экспрессирующихся генов моллюсков [17]. Для количественной ПЦР использовали следующий набор реагентов: 5X qPCRmix-HS (Евроген), 50X SYBR Green I для ПЦР-РВ (Евроген), праймеры для каждого гена (синтезированы в "Евроген", последовательности приведены в

табл. 1). Таким образом, реакционная смесь содержала:

- 1) 1X qPCRmix-HS;
- 2) праймер (0.3 mM, смесь R и F);
- 3) 1X SYBRGreenI;
- 4) кДНК, синтезированная на матрице выделенной РНК;
- 5) mQH₂O.

Суммарный объем смеси составлял 20 мкл.

Амплификацию проводили с помощью термоциклера CFX96 Thermal cycler (Bio-Rad) при следующих условиях: первичная денатурация при 95°C в течение 5 мин, затем 50 циклов: денатурация при 95°C в течение 20 с, отжиг праймеров при 57°C и 64°C в зависимости от амплифицируемой мишени в течение 30 с и элонгация цепи при 72°C в течение 20 с. Все исследуемые и контрольные образцы амплифицировали в десятикратной повторности.

ОУТ выбранных генов рассчитывали с помощью метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [18].

Статистический анализ ОУТ генов рецепторов и транспортера серотонина осуществляли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9. Обработку данных выполняли однофакторным дисперсионным анализом ANOVA с последующим *post hoc* тестом с помощью критерия Тьюки. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0.05$. На графиках результаты представлены как среднее $\pm$ SD.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммуногистохимический анализ показал присутствие у исследованных моллюсков 5-НТ-ергических волокон как вблизи глаза, так и на удалении от него (рис. 1 и 2). Плотность сети волокон, оцениваемая как их число, заключенное в равных площадях, у *L. stagnalis* ниже, чем у *P. canaliculata* (рис. 3). При этом у *L. stagnalis* плотность визуализируемых структур вблизи сетчатки выше, чем в более удаленных от нее областях тела. Распределение 5-НТ-ергических волокон у *P. canaliculata* выглядит более равномерным. Однако и у этого моллюска на срезах, сделанных во фронтальной плоскости, видно четко обособленное кольцо волокон, окружающих глазной бокал и проникающих к базальным отделам клеток сетчатки (рис. 2). Похожая концентрация волокон также выявляется на фронтальных срезах глаза прудовика, особенно в проксимальной части, начиная с вершины гребня, разделяющего два углубления в структуре сетчатки (рис. 1c и d) до основания глазного бокала (рис. 1e и f). У *L. stagnalis* окончания, содержащие 5-НТ волокна, в основном сосредоточены в базальных областях сетчатки (рис. 4a). Тем не менее небольшое их количество можно обнаружить также среди тел, составляющих сетчатку клеток (рис. 4b). По сравнению с прудови-

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованные для анализа уровней транскрипции генов рецепторов и транспортера серотонина *Lymnaea stagnalis* и *Pomacea canaliculata*

Ген	NCBI Accession #	Последовательность праймеров (5'-3')	Длина ампликона, п.н.	Температура отжига, °C
<i>Lymnaea stagnalis</i>				
<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>	MH687363.1	Forward— AGGCGC-GTCCTATGAGGATA Reverse— GCCTTGG-CATCGAAGATGGA	144	64
<i>serotonin receptor</i>	L06803.1	Forward— TGGCTA-CATTCTGACCTG-GGA Reverse— CCATTTTCCGTAAA-CAAACGGCTTC	148	64
<i>serotonin receptor 5-HT2</i>	U50080.1	Forward— ACACCTG-GAGTATTCTCATC Reverse— GAAG-TAGTTGGTCAC-GTTCT	116	64
<i>Pomacea canaliculata</i>				
<i>glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase-like</i>	XM_025226530.1	Forward— CAACCT-CAAAACCGATGCCA Reverse— GACAAAG-CGATTAGTCAGT-GGA	184	57
<i>5-hydroxytryptamine receptor 1-like</i>	XM_025238755.1	Forward— ATCTTTG-GCTGGAAGAGCCC Reverse— TTGGC-GATCTTGGAGGA-CAC	158	57
<i>5-hydroxytryptamine receptor 4-like</i>	XM_025238614.1	Forward— GCAAG-CAGGCGTAC-CAAATC Reverse— AGCCCAT-GATGATCCCCAAC	129	57
<i>5-hydroxytryptamine receptor 2C-like</i>	XM_025223758.1	Forward— AAC-GAGTTCACAGG-CAAGTGG Reverse— TGC-GCTTG-GACTTGTTCTTG	166	57
<i>sodium-dependent serotonin transporter-like</i>	XM_025237076.1	Forward— ATTCGCT-GGCAACTTCTCCT Reverse— GCAGT-GATCCAAACAG-CCTTG	104	57

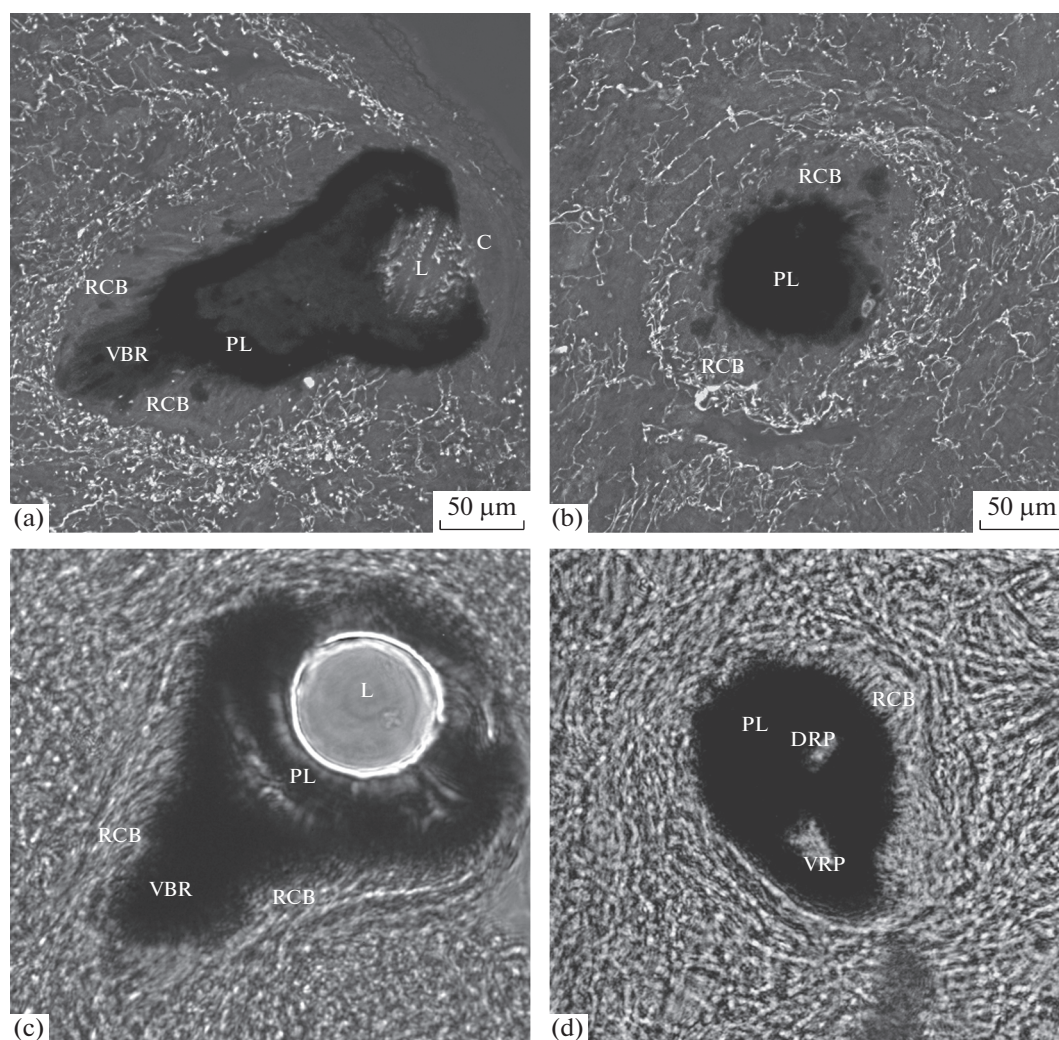


Рис. 1. Конфокальные изображения соответствующих друг другу сагиттальных (а и с) и фронтальных (b и d) срезов глаза и периоптической области *Lymnaea stagnalis*, сделанные в режиме флуоресценции (а и b) и проходящем свете (с и d). Визуализация 5-НТ-иммунореактивности на сагиттальном (а) и фронтальном (b) срезах глаза. (с) и (d) – Изображения в проходящем свете срезов, сделанные в уровнях, соответствующих конфокальным снимкам. Условные обозначения: С – роговица; L – хрусталик; PL и RCB – пигментные слои тела клеток сетчатки; VRP и DRP – ventральное и дорзальное углубление сетчатки. Калибровка – 50 мкм.

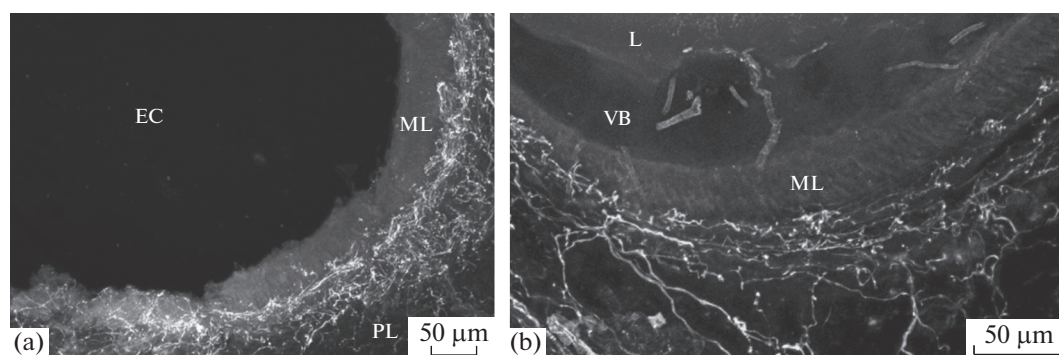


Рис. 2. 5-НТ-иммунореактивные структуры, визуализированные на срезах глаза *Pomacea canaliculata* с удаленным (а) и сохранившимся (b) хрусталиком. Условные обозначения: EC – внутриглазная полость; L – хрусталик; VB – стекловидное тело; ML и PL – микровиллярный и пигментный слои сетчатки. Калибровка – 50 мкм.

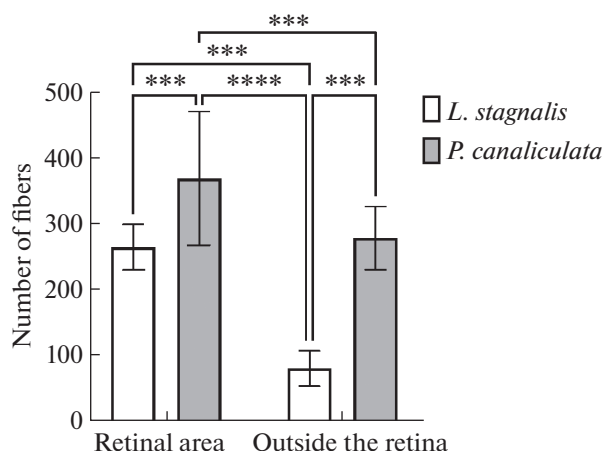


Рис. 3. Средние значения числа иммунореактивных к 5-НТ волокон, визуализированных и подсчитанных в пределах равных площадей выделенных на конфокальных микрофотографиях срезов глаз моллюсков в области сетчатки и на удалении от нее. Число проанализированных срезов: *Lymnaea stagnalis* – 20; *Pomacea canaliculata* – 11. Все результаты представлены как среднее $\pm$ SD. *** – $p < 0.001$; **** – $p < 0.0001$.

ком у *P. canaliculata* 5-НТ-ергические волокна проникают в слой тел клеток сетчатки заметно глубже (рис. 2а и б).

Маркирование ДНК выявляет у *L. stagnalis* рядом со слоем упорядоченных ядер клеток сетчатки пространственно разбросанные ядра клеток окружающих тканей (рис. 4). Однако нет оснований по-

лагать, что эти ядра принадлежат клеткам серотонинергического сплетения. Поэтому вопрос о местоположении тел клеток этого сплетения пока остается открытым.

Расчет ОУТ двух генов рецепторов серотонина *L. stagnalis* показал, что наименьший уровень транскрипции наблюдается в глазах по сравнению с центральными ганглиями и щупальцами ($p < 0.05$) (рис. 5). При этом статистически значимых различий между уровнями транскрипции в ганглиях и щупальцах нет.

Схожая картина по ОУТ генов рецепторов серотонина была получена и для образцов тканей *P. canaliculata* (рис. 6), в которых наиболее низкий ОУТ генов рецепторов серотонина также выявили в тканях глаза, а наибольший – в тканях щупальца. Исключением стал ген *5-hydroxytryptamine receptor 4-like* (рис. 6b), ОУТ которого были примерно одинаковы во всех трех проанализированных образцах тканей. Противоположный результат был получен для гена транспортера серотонина *sodium-dependent serotonin transporter-like* (рис. 6d), более высокое значение ОУТ которого было выявлено в образцах тканей глаза сравнительно с ганглиями и щупальцами ($p < 0.05$), тогда как уровни транскрипции в последних двух образцах тканей были статистически неразличимы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Серотонинергический механизм у животных является одним из базовых в системе контроля и

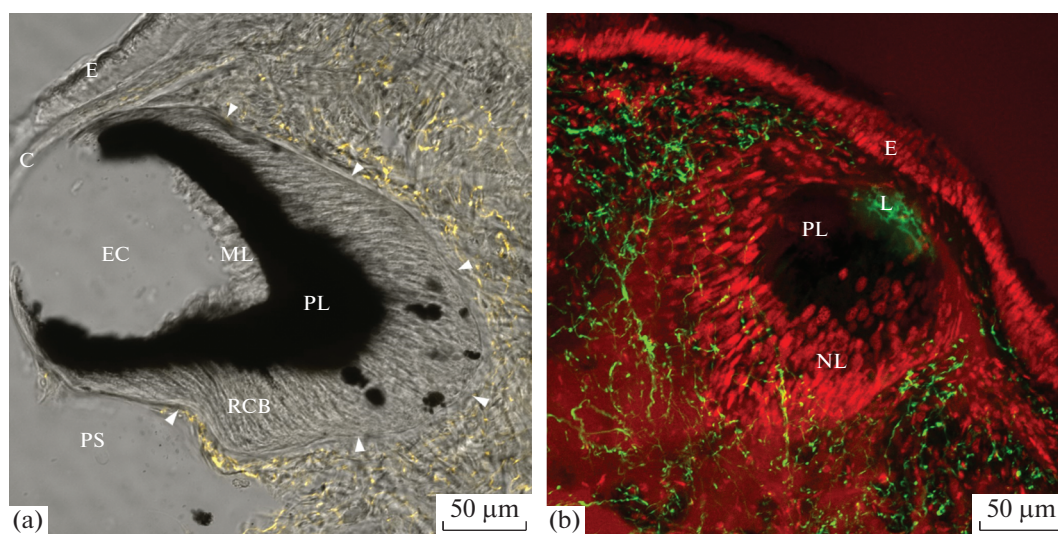


Рис. 4. 5-НТ-иммунореактивные структуры, визуализированные на срезах глаза и перипоической области *Lymnaea stagnalis*. (а) – Фотография среза, сделанного в плоскости, близкой к сагиттальной, и полученная соединением стека конфокальных оптических срезов и изображения препарата в проходящем свете. Хрусталик и стекловидное тело отсутствуют. (б) – Тангенциальный срез, окрашенный на иммунореактивность антителом к 5-НТ (зеленый) и маркером ДНК (красный). Условные обозначения: Е – эпидермис; PS – перипоический синус; С – роговица; L – хрусталик; EC – внутриглазная полость; ML и PL – микровильярный и пигментный слои сетчатки; RCB и NL – тела и ядра клеток сетчатки соответственно. Калибровка – 50 мкм.

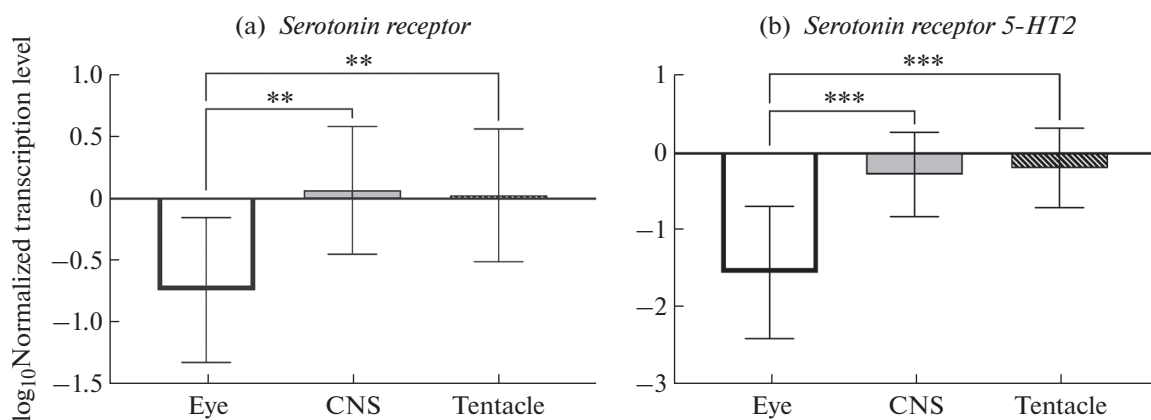


Рис. 5. Относительные уровни транскрипции генов рецепторов серотонина *Lymnaea stagnalis*, нормализованные на референсный ген (*Gapdh*) и представленные в логарифмической шкале. Все результаты представлены как среднее $\pm$ SD. ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$.

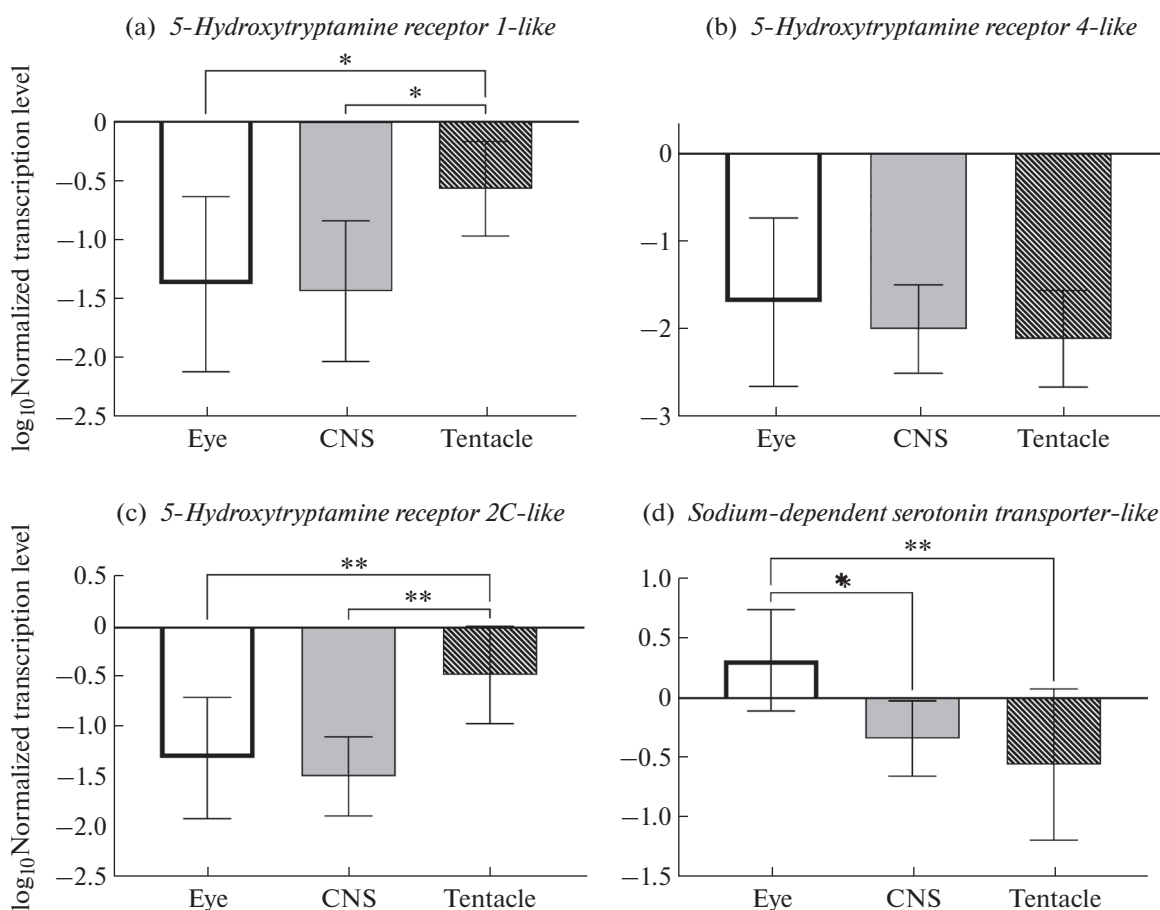


Рис. 6. Уровни транскрипции генов рецепторов и транспортера серотонина *Potamococcus canaliculatus*, нормализованные на референсный ген (*Gapdh*) и представленные в логарифмической шкале. Все результаты представлены как среднее $\pm$ SD. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$.

регуляции физиологических процессов, включая самые сложные из них. Он широко представлен в организме животных различного уровня филогенетического развития [19]. У брюхоногих моллюсков

серотонин вовлечен в управление многими функциями, начиная с регуляции мышечной активности [20] до сложных форм поведения, включая ассоциативное научение, память и принятие решений [21]. Сво-

ей работой мы продолжаем накопление свидетельств участия серотонина в контроле фоторецепторных процессов у брюхоногих моллюсков. В пользу предположения о существовании такого механизма свидетельствуют описанные выше результаты. В частности, у *L. stagnalis* наличие вокруг глазного бокала пространственно организованного сплетения волокон, содержащих 5-НТ, а также обнаружение в тканях глаза транскриптов рецепторов серотонина дополняют полученные ранее факты изменения электроретинограммы в результате аппликации этого медиатора [22]. При этом наличие у *P. canaliculata* в области глаза топографически выраженного сплетения 5-НТ-иммунореактивных волокон хорошо соответствует обнаружению там транскриптов генов не только 5-НТР, но и транспортера серотонина. Это позволяет предположить возможность модуляции серотонином электрических процессов в сетчатке этого моллюска что, несомненно, должно быть проверено в физиологическом эксперименте. Отметим, что развитая сеть серотонинергических волокон простирается у исследованных моллюсков за пределы глаза и вне структурной связи с ним. Однако повышенная плотность распределения и пространственная ориентация 5-НТ-иммунореактивных волокон в области сетчатки дают основания предполагать их специфическую роль в отношении глаза. Кроме того, наличие в тканях глаз транскриптов генов рецепторов 5-НТ свидетельствует о присутствии, скорее всего в сетчатке, клеток-мишеней серотонинергической иннервации. Наличие серотонинергических нейронов в центральных ганглиях *L. stagnalis* и высокое содержание в них 5-НТ [23] предполагают наличие там механизмов его трансмембранного транспорта, что должно стать предметом дальнейшего анализа. Развитая периферическая сеть серотонинергических волокон описана также в коже различных отделов тела [24] и репродуктивных органах *L. stagnalis* [25], что, вероятно, подчеркивает типичность такого механизма регуляции в организме моллюска.

Результаты количественной оценки ОУТ генов рецепторов 5-НТ прежде всего подтверждают распространенность серотонинергических механизмов в организме моллюсков, в том числе и периферических его отделах, конкретно в глазах и щупальцах этих животных. В первом приближении они могут быть интерпретированы как показатель количества или плотности посадки молекулярных мишеней. Однако они не дают пока оснований делать выводы об их относительной эффективности и функциональной важности 5-НТ в этих органах. Располагая на данный момент только данными о содержании серотонина в центральных ганглиях *L. stagnalis* [23], мы не можем провести корреляцию между этим показателем и ОУТ генов рецепторов.

Полученные результаты уместно рассматривать в контексте функционального значения серото-

нина в глазах животных различного уровня эволюционного развития, хотя, несмотря на широкую распространенность серотонинергических механизмов в нервной системе животных [26], об их участии в осуществлении зрительных функций известно не так много [7]. Есть свидетельства, что 5-НТ играет роль нейромодулятора в сетчатке позвоночных, амакриновые клетки которой синтезируют и выделяют 5-НТ, а биполярные, ганглиозные клетки и терминалы фоторецепторов экспрессируют несколько типов 5-НТР [7]. При этом ганглиозные клетки сетчатки также содержат 5-НТ и, возможно, могут осуществлять свое влияние на центральном уровне по серотонинергическому механизму. 5-НТ обнаружен также в структурах ретинопетальной системы позвоночных и, таким образом, возможно, опосредует модулирующее влияние мозга на функции сетчатки [27].

Среди беспозвоночных животных присутствие серотонинергических волокон, а также функциональное влияние 5-НТ на сетчатку установлено у моллюсков и членистоногих нескольких видов. У ряда изученных животных этих таксонов физиологическая активность 5-НТ проявляется в модулирующем влиянии на циркадианные ритмы и генерирующие их нейроны. Такое влияние оказывают серотонинергические клетки на световую чувствительность фоторецепторов 6-го абдоминального ганглия раков [28]. В ганглиозном слое оптической доли мозга *Procambarus clarkii* волокна с 5-НТ-подобной иммунореактивностью обнаруживаются в непосредственной близости от аксонов фоторецепторов. При этом показано, что антагонисты 5-НТ способны блокировать ретракцию гранул экранирующего пигмента в фоторецепторах в ночное время. По-видимому, 5-НТ действует как модулятор ночной фазы циркадного цикла световой чувствительности фоторецепторов сетчатки рака [29]. Суточная периодичность наблюдается и в уровне экспрессии 5-НТ-рецепторов в глазных стебельках рака [30]. В оптической доле мозга мухи *Calliphora* также присутствуют группы 5-НТ-иммунореактивных нейронов, которые получают входы от аксонов фоторецепторов. Вероятно, что эти нейроны управляют циркадианными ритмами световой чувствительности фоторецепторов глаза, что было показано в опытах с инъекцией серотонина и его антагонистов [31].

У головоногих моллюсков влияние серотонина на глаз связано с регуляцией его световой чувствительности. Так, в сетчатке осьминога *Octopus vulgaris* динамика миграции экранирующего пигмента, перемещение которого является одним из механизмов световой адаптации глаза, управляется, по крайней мере частично, серотином [32]. Имеются данные о присутствии клеток и волокон с 5-НТ-подобной иммунореактивностью в сетчатке, зрительном нерве, а также зрительной доле осьминога и даже его хрусталике [8].

Однако наиболее детальные исследования роли 5-НТ в осуществлении зависящих от света циркадианных процессов выполнены на брюхоногих моллюсках. Так, у *Hermisenda crassicornis* серотонин изменяет реакции на свет фоторецептора В, являющегося элементом нейронального механизма ассоциативного научения в виде образования окуло-вестибулярного рефлекса [33–35]. У *A. californica* [6, 9] центрифугальные влияния на циркадианный пейсмейкер глаза осуществляются при участии 5-НТ-ергической иннервации. 5-НТ-иммунореактивность выявлена в сетчатке еще одного морского брюхоногого моллюска *Bulla gouldiana* [10], в составе глаза которого также находятся клетки циркадианного пейсмейкера.

Таким образом, присутствие серотонинергических механизмов в структурах глаза является довольно типичным явлением у животных различного уровня филогенетического развития. В этом смысле исследуемые пресноводные моллюски не являются исключением. Заметим, однако, что утверждать функциональную роль серотонина в глазах можно пока только в отношении *L. stagnalis* [22]. Что касается *P. canaliculata*, то такое утверждение носит характер предположения до получения физиологических эффектов серотонина.

В настоящее время нет структурных свидетельств присутствия в структуре глаз *L. stagnalis* и *P. canaliculata* нейронов, которые могли бы выполнять функции циркадианного пейсмейкера [36, 37], подобно тому как это происходит в глазах *A. californica* и *B. gouldiana* [38]. Поэтому более правдоподобным представляется предположение о механизме модуляции световой чувствительности фоторецепторов или же регуляции миграции гранул экранирующего пигмента. Достаточно плотная сеть нервных волокон, окружающих глазной бокал, может оказывать на многочисленные фоторецепторные клетки сетчатки *L. stagnalis* и *P. canaliculata* генерализованное влияние, приводя их световую чувствительность в соответствие с уровнем освещения окружающей обстановки.

Другим остающимся пока нерешенным вопросом остается идентификация тел клеток, образующих ветвления 5-НТ-ергических волокон в периферической области глаза моллюсков. В этой работе мы не получили свидетельств колокализации окрашивания ядер с визуализацией 5-НТ-иммунореактивности у *L. stagnalis*. Также, очевидно, что 5-НТ-иммунореактивные волокна не принадлежат фоторецепторным клеткам сетчатки, аксоны которых формируют оптический нерв [11]. Кроме того, ранее было показано, что центральные нейроны, осуществляющие билатеральную иннервацию глаз *L. stagnalis*, не являются серотонинергическими и, следовательно, не могут быть источником 5-НТ-ергических волокон выявляемого периокулярного сплетения [39]. Это может означать, что тела кле-

ток, образующих указанные нервные сплетения у *L. stagnalis*, вероятно, локализируются на периферии вдали от ветвлений их отростков. У *P. canaliculata* довольно плотная сеть 5-НТ-ергических волокон похожа на ветвления в сетчатке отростков нейронов некоторых брюхоногих моллюсков [40]. Однако при этом мы также не обнаруживаем в ней тел 5-НТ-ергических нейронов. В плане понимания возможного функционального значения периокулярных сплетений серотонинергических волокон этот вопрос имеет принципиальное значение и требует дальнейшего изучения.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, проводившиеся с участием животных, соответствовали этическим нормам, утвержденным правовыми актами Российской Федерации, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтической комиссии Балтийского федерального университета им. И. Канта.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнялась за счет средств бюджета Высшей школы живых систем ОНК “Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)” Балтийского федерального университета имени Иммануила Канта.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов (И.Н.Д., В.В.Ж.), сбор данных (И.Н.Д., А.Х.Х., В.В.К., М.В.С.), обработка данных (И.Н.Д., А.Х.Х., В.В.К., М.В.С.), написание и редактирование манускрипта (И.Н.Д., В.В.Ж.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность инженеру-исследователю Центра иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта В. Малащенко за предоставленную возможность и помощь в работе с конфокальным микроскопом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tierney AJ (2018) Invertebrate serotonin receptors: a molecular perspective on classification and pharmacology. J Exp Biol 221(Pt 19): jeb184838. <https://doi.org/10.1242/jeb.184838>
2. Bacqué-Cazenave J, Bharatiya R, Barrière G, Delbecq JP, Bouguiyoud N, Di Giovanni G, Cattaert D, De Deurwaerdere P (2020) Serotonin in Animal Cognition and

- Behavior. *Int J Mol Sci* 21 (5): 1649.
<https://doi.org/10.3390/ijms21051649>
3. Sizemore TR, Hurley LM, Dacks AM (2020) Serotonergic modulation across sensory modalities. *J Neurophysiol* 123 (6): 2406–2425.
<https://doi.org/10.1152/jn.00034.2020>
 4. Yamoah EN, Crow T (1996) Protein kinase and G-protein regulation of Ca^{2+} currents in *Hermisenda* photoreceptors by 5-HT and GABA. *J Neurosci* 16 (15): 4799–4809.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-15-04799.1996>
 5. Razy-Krajka F, Brown ER, Horie T, Callebert J, Sasakura Y, Joly JS, Kusakabe TG, Vernier P. (2012) Monoaminergic modulation of photoreception in ascidian: evidence for a proto-hypothalamo-retinal territory. *BMC Biol* 10: 45.
<https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-45>
 6. Colwell CS (1990) Light and serotonin interact in affecting the circadian system of *Aplysia*. *J Comp Physiol A* 167 (6): 841–845.
<https://doi.org/10.1007/BF00189772>
 7. Masson J (2019) Serotonin in retina. *Biochimie* 161: 51–55.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.11.006>
 8. Kito-Yamashita T, Haga C, Hirai K, Uemura T, Kondo H, Kosaka K (1990) Localization of serotonin immunoreactivity in cephalopod visual system. *Brain Res* 521 (1–2): 81–88.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91527-n](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91527-n)
 9. Takahashi JS, Nelson DE, Eskin A (1989) Immunocytochemical localization of serotonergic fibers innervating the ocular circadian system of *Aplysia*. *Neuroscience* 28 (1): 139–147.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90238-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90238-8)
 10. Michel S, Schoch K, Stevenson PA (2000) Amine and amino acid transmitters in the eye of the mollusc *Bulla gouldiana*: an immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 425 (2): 244–256.
[https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20000918\)425:2](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20000918)425:2)
 11. Zhukov VV (2007) On the problem of retinal transmitters of the freshwater mollusc *Lymnaea stagnalis*. *J Evol Biochem Phys* 43: 524–532.
<https://doi.org/10.1134/S0022093007050118>
 12. Zhukov VV, Tuchina OP, Meyer-Rochow VB (2012) Serotonin immunoreactivity in the eye and optic nerve of pulmonate gastropod molluscs. *J Evol Biochem Phys* 48: 471–473.
<https://doi.org/10.1134/S0022093012040123>
 13. Sugamori KS, Sunahara RK, Guan HC, Bulloch AG, Tensen CP, Seeman P, Niznik HB, Van Tol HH (1993) Serotonin receptor cDNA cloned from *Lymnaea stagnalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1): 11–15.
<https://doi.org/10.1073/pnas.90.1.11>
 14. Gerhardt CC, Leysen JE, Planta RJ, Vreugdenhil E, Van Heerikhuizen H (1996) Functional characterisation of a 5-HT₂ receptor cDNA cloned from *Lymnaea stagnalis*. *Eur J Pharmacol* 311 (2–3): 249–258.
[https://doi.org/10.1016/0014-2999\(96\)00410-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(96)00410-4)
 15. Benatti C, Colliva C, Blom JMC, Ottaviani E, Tascetta F (2017) Transcriptional effect of serotonin in the ganglia of *Lymnaea stagnalis*. *ISJ* 14 (1): 251–258.
<https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v14i1.251-258>
 16. OligoArchitect™ Online. Glossary of Parameters.
 17. Young AP, Landry CF, Jackson DJ, Wyeth RC (2019). Tissue-specific evaluation of suitable reference genes for RT-qPCR in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *PeerJ* 7: e7888.
<https://doi.org/10.7717/peerj.7888>
 18. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4): 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
 19. Gillette R (2006) Evolution and function in serotonergic systems. *Integr Comp Biol* 46 (6): 838–846.
<https://doi.org/10.1093/icb/icl024>
 20. Longley RD, Peterman M (2013) Neuronal control of pedal sole cilia in the pond snail *Lymnaea stagnalis appressa*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 99 (1): 71–86.
<https://doi.org/10.1007/s00359-012-0770-x>
 21. Aonuma H, Mezheritskiy M, Boldyshev B, Totani Y, Vorontsov D, Zakharov I, Ito E, Dyakonova V (2020) The Role of Serotonin in the Influence of Intense Locomotion on the Behavior Under Uncertainty in the Mollusk *Lymnaea stagnalis*. *Front Physiol* 11: 221.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00221>
 22. Жуков ВВ, Кононенко НЛ, Панормов ИБ., Борисенко ИЛ (2006) Серотонин изменяет электрические реакции глаза *Lymnaea stagnalis* на световую стимуляцию. Сенсорные системы 20 (4): 270–278. [Zhukov VV, Kononenko NL, Panormov IB, Borisenko IL (2006) Serotonin изменяет электрические реакции глаза *Lymnaea stagnalis* на световую стимуляцию. Sensornye sistemy 20 (4): 270–278. (In Russ)].
 23. Aonuma H, Totani Y, Sakakibara M, Lukowiak K, Ito E (2018) Comparison of brain monoamine content in three populations of *Lymnaea* that correlates with taste-aversive learning ability. *Biophys Physicobiol* 15: 129–135.
https://doi.org/10.2142/biophysico.15.0_129
 24. Horváth R, Battonyai I, Máász G, Schmidt J, Fekete ZN, Elekes K (2020) Chemical-neuroanatomical organization of peripheral sensory-efferent systems in the pond snail (*Lymnaea stagnalis*). *Brain Struct Funct* 225 (8): 2563–2575.
<https://doi.org/10.1007/s00429-020-02145-z>
 25. Ivashkin EG, Khabarova MYu, Melnikova VI, Kharchenko OA, Voronezhskaya EE (2017) Local serotonin-immunoreactive plexus in the female reproductive system of hermaphroditic gastropod mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Invertebrate Zoology* 14 (2): 134–139.
<https://doi.org/10.15298/invertzool.14.2.06>
 26. Azmitia EC (2007) Serotonin and brain: evolution, neuroplasticity, and homeostasis. *Int Rev Neurobiol* 77: 31–56.
[https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(06\)77002-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(06)77002-7)
 27. Repérant J, Ward R, Miceli D, Rio JP, Médina M, Kenigfest NB, Vesselkin NP (2006) The centrifugal visual system of vertebrates: a comparative analysis of its functional anatomical organization. *Brain Res Rev* 52 (1): 1–57.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2005.11.00>
 28. Rodríguez-Sosa L, Calderón-Rosete G, Villalobos MGP, Mendoza Zamora E, González VA (2006) Serotonin modulation of caudal photoreceptor in crayfish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 142 (3–4): 220–230.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.10.006>

29. Aréchiga H, Bañuelos E, Frixione E, Picones A, Rodríguez-Sosa L (1990) Modulation of crayfish retinal sensitivity by 5-hydroxytryptamine. *J Exp Biol* 150: 123–143. <https://doi.org/10.1242/jeb.150.1.123>
30. Calderón-Rosete G, Flores G, Rodríguez-Sosa L (2006) Diurnal rhythm in the levels of the serotonin 5-HT_{1A} receptors in the crayfish eyestalk. *Synapse* 59 (6): 368–373. <https://doi.org/10.1002/syn.20252>
31. Chen B, Meinertzhagen IA, Shaw SR (1999) Circadian rhythms in light-evoked responses of the fly's compound eye, and the effects of neuromodulators 5-HT and the peptide PDF. *J Comp Physiol A* 185 (5): 393–404. <https://doi.org/10.1007/s003590050400>
32. Muñoz JL, López Patiño MA, Hermosilla C, Conde-Sieira M, Soengas JL, Rocha F, Míguez JM (2011) Melatonin in octopus (*Octopus vulgaris*): tissue distribution, daily changes and relation with serotonin and its acid metabolite. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 197 (8): 789–797. <https://doi.org/10.1007/s00359-011-0641-x>
33. Crow T, Bridge MS (1985) Serotonin modulates photoreponses in *Hermisenda* type-B photoreceptors. *Neurosci Lett* 60(1):83–88. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(85\)90385-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(85)90385-4)
34. Farley J, Wu R (1989) Serotonin modulation of *Hermisenda* type B photoreceptor light responses and ionic currents: implications for mechanisms underlying associative learning. *Brain Res Bull* 22 (2): 335–351. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(89\)90061-0](https://doi.org/10.1016/0361-9230(89)90061-0)
35. Grover LM, Farley J, Auerbach SB (1989) Serotonin involvement during in vitro conditioning of *Hermisenda*. *Brain Res Bull* 22 (2): 363–372. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(89\)90063-4](https://doi.org/10.1016/0361-9230(89)90063-4)
36. Seyer JO, Nilsson DE, Warrant E (1998) Spatial vision in the prosobranch gastropod *Ampularia* sp. *J Exp Biol* 201 (Pt 10): 1673–1679. <https://doi.org/10.1242/jeb.201.10.1673>
37. Zieger MV, Meyer-Rochow VB (2008) Understanding the cephalic eyes of pulmonate gastropods: A review. *Am Malac Bull* 26: 47–66. <https://doi.org/10.4003/006.026.0206>
38. Block GD, Khalsa SB, McMahon DG, Michel S, Guesz M (1993) Biological clocks in the retina: cellular mechanisms of biological timekeeping. *Int Rev Cytol* 146: 83–144. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)60381-2](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)60381-2)
39. Zhukov VV, Tuchina, OP (2008) Structure of visual pathways in the nervous system of freshwater pulmonate molluscs. *J Evol Biochem Phys* 44: 341–353. <https://doi.org/10.1134/S0022093008030113>
40. Zaitseva OV (1994) Structural organization of the sensory systems of the snail. *Neurosci Behav Physiol* 24 (1): 47–57. <https://doi.org/10.1007/BF02355652>

SOME COMPONENTS OF THE SEROTONERGIC SYSTEM IN THE EYES OF TWO SPECIES OF FRESHWATER MOLLUSCS

I. N. Dominova^a, A. A. Husenova^a, V. V. Kotova^a, M. V. Sidorova^a, and V. V. Zhukov^{a, #}

^a*Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia*

[#]*e-mail: valerzhukov@mail.ru*

Labeling of 5-HT-immunoreactive structures was performed on eye slices of freshwater molluscs *Lymnaea stagnalis* and *Pomacea canaliculata*. In the periocular region of both species an increased density of 5-HTergic fibers forming structurally distinct plexuses and partially penetrating into the retina was detected. Transcription of serotonin receptor genes was detected in eye tissues: two types in *L. stagnalis* and three in *P. canaliculata*. Its relative level is significantly upregulated compared with central ganglia of the nervous system and tentacles. Additionally transcription of the 5HT transporter gene was recorded in *P. canaliculata* tissues. The obtained results are discussed in terms of a possible serotonergic mechanism of modulation of processes in the retina of gastropods.

Keywords: *Lymnaea stagnalis*, *Pomacea canaliculata*, retina, serotonin, immunoreactivity, gene transcription, 5-HT receptors, serotonin transporter