

ЭКСПРЕССИЯ КОМПОНЕНТОВ СЕРТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В ФОЛЛИКУЛОГЕНЕЗЕ И ДОИМПЛАНТАЦИОННОМ РАЗВИТИИ МЫШИ

© 2018 г. Д. А. Никишин^{1, 2, *}, Ю. В. Храмова², Т. С. Багаева²,
М. Л. Семёнова², Ю. Б. Шмуклер¹

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
119334, Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 26

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*E-mail: denisnikishin@gmail.com

Поступила в редакцию 22.11.2016 г.

Окончательный вариант получен 10.05.2017 г.

Среди функций серотонина – регуляция процессов роста и развития женских половых клеток, а также раннего эмбрионального развития. Чтобы раскрыть конкретные механизмы этих функций, был проведен ОТ-ПЦР анализ экспрессии мРНК генов ферментов синтеза и деградации, транспортеров и рецепторов серотонина в ходе фолликулогенеза и доимплантационного развития мыши. В клетках гранулезы выявляется мРНК ферментов триптофангидроксилазы *tph1* и моноаминоксидазы *maoa*, мембранного транспортера *sert* и везикулярного транспортера *vmat2*, а также рецепторов серотонина *htr1b*, *htr1d*, *htr2a*, *htr5b* и *htr7*. В желтом теле дополнительно появляется экспрессия мРНК фермента декарбоксилазы ароматических аминокислот *ddc* и рецептора *htr2b*. В ходе доимплантационного развития наблюдается экспрессия мРНК генов ферментов *tph2*, *ddc* и *maoa*, транспортеров *sert*, *vmat1* и *vmat2*, а также целого ряда рецепторов, причем экспрессия большинства из них носит транзитный характер. Наличие экспрессии всех компонентов и ее динамика позволяют предположить, что серотонинергическая сигнальная система функционально активна в фолликулогенезе и доимплантационном развитии мыши.

Ключевые слова: фолликулогенез, гранулеза, кумулюс, желтое тело, доимплантационное развитие, мышца, ОТ-ПЦР, серотонин, синтез, деградация, транспорт, рецептор

DOI: 10.7868/S0475145018030072

ВВЕДЕНИЕ

Моноаминергические трансмисмиттеры являются универсальными сигнальными молекулами, контролирующими процессы развития (Бужников, 1967, 2007). Серотонин обладает наибольшим числом описанных функций вне нервной системы, как в эмбриональном развитии, так и во взрослых организмах. Среди них регуляция делений дробления (Buznikov et al., 1970, 2005), межблестомерных взаимодействий (Шмуклер, 1981; Shmukler et al., 2008), морфогенетических движений (Shuey et al., 1993), установления лево-правой асимметрии тела (Levin et al., 2006), а так же процессов клеточной дифференцировки и пролиферации (Azmitia, 2001). Участие серотонина в регуляции процессов роста и созревания женских половых клеток показано для широкого ряда животных – двусторчатых (Krantic et al., 1991; Wang, He, 2014) и головоногих моллюсков (Zatylny et al., 2000), ракообразных

(Tinikul et al., 2008), немертин (Stricker, Smythe, 2001), иглокожих (Buznikov et al., 1993), рыб (Cerdà et al., 1998; Lister et al., 2009), амфибий (Buznikov et al., 1993; Sheng et al., 2005) и млекопитающих (Terranova et al., 1990; Tanaka et al., 1993; Sheng et al., 2005). Сходная роль серотонина как регулятора процесса оогенеза у таких эволюционно далеких групп указывает на консервативность данного сигнального механизма.

Серотонин и другие моноаминергические трансмисмиттеры (дофамин и норадреналин) определяются в физиологических концентрациях в яйцниках млекопитающих, в частности, в ооцитах, клетках кумулюса (Amireault, Dubé, 2005b), в фолликулярной жидкости (Bòdis et al., 1992). Известно, что основным источником катехоламинов в яйцнике являются терминалы иннервирующих его вегетативных ганглиев (Mayerhofer et al., 1998), тогда как источником серотонина предполагается прежде всего кровь, а также синтез в самом яйцнике

(Dubé, Amireault, 2007). На различных моделях показано, что серотонин обладает стимулирующим действием на функцию фолликулярных клеток. У хомячков и крыс серотонин стимулирует синтез эстрадиола в преовуляторных фолликулах, культивируемых *in vitro*, а специфические антагонисты серотониновых рецепторов устраняют этот эффект (Terranova et al., 1990; Tanaka et al., 1993). Сходные результаты получены и на других модельных объектах, например, у самок костистой рыбы *Danio rerio* ингибитор обратного захвата серотонина флуоксетин приводит к уменьшению количества икры и содержания эстрадиола в яйчниках, а также к снижению уровня экспрессии мРНК овариальной ароматазы и рецепторов к гонадотропным гормонам (Lister et al., 2009). Особый интерес представляет то, что данный стимулирующий эффект серотонина наблюдается на клетках гранулезы человека (Korpan et al., 2004; Gravelleau et al., 2000), моноаминергическая регуляция которых играет роль в возникновении патологических процессов, в частности синдрома поликистозных яичников (Lara et al., 1993). Однако предполагать конкретные механизмы этого эффекта представляется затруднительным в связи с разнородностью экспериментальных моделей и использованием фармакологических агентов ограниченной специфичности.

Наряду с непосредственным влиянием овариального серотонина на функцию фолликулярных клеток и процесс созревания ооцита, существуют его отложенные эффекты, проявляющиеся в дальнейшем эмбриональном и постэмбриональном развитии. На антральных фолликулах человека, полученных при применении вспомогательных репродуктивных технологий, показано, что содержание моноаминов в фолликулярной жидкости коррелирует как с морфологическими показателями созревания ооцита, так и с успешностью последующей процедуры оплодотворения *in vitro* (Bódis et al., 1993). Мыши, нокаутные по ферменту синтеза серотонина *tph1* , остаются фертильными, но в их потомстве наблюдаются отставание в развитии и морфологические нарушения (Côté et al., 2007). Употребление ингибитора обратного захвата серотонина флуоксетина беременными самками крыс приводит к нарушениям репродуктивного цикла, изменениям фолликулярного пула, в том числе увеличению овариального апоптоза, а также к количественным изменениям экспрессии генов, регулирующих серотониновую сигнализацию и биологические ритмы у их потомства (Moore et al., 2015). Установление конкретных молекулярных механизмов влияния серотонина на фолликулогенез является крайне важным для оценки его роли как регулятора репродуктивной функции.

Серотонинергическая сигнальная система как в компонентах овариальных фолликулов, так

и в ходе доимплантационного развития млекопитающих, описана в литературе далеко не полно. В ряде работ показана экспрессия отдельных компонентов серотонинергической системы в доимплантационном развитии (Vesela et al., 2003; Ifkova et al., 2004; Amireault, Dube, 2005a, b; Hinckley et al., 2005; Basu et al., 2008). В совокупности с результатами, полученными на амфибиях (Nikishin et al., 2012) и птицах (Stępińska et al., 2015), об одновременной экспрессии сразу нескольких типов серотониновых рецепторов в период раннего развития представляла интерес аналогичная ситуация в эмбриогенезе млекопитающих. В то же время, данных о серотонинергической системе в развивающемся овариальном фолликуле фактически нет, так как большая часть работ выполнена на ооцит-кумулюсных комплексах (Amireault, Dube, 2005a, b). С целью решения этих вопросов и для устранения имеющихся пробелов, нами был выполнен полный обзор экспрессии мРНК всех компонентов серотонинергической системы в фолликулярных клетках гранулезы, кумулюса и желтого тела, а также ооцитах, дробящихся эмбрионах и бластоцистах мыши.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали мышей-гибридов F1 линий C57BL/6J и CBA/J. Получение материала проводили с использованием стандартных методик (Дыбан и др., 1975) и с соблюдением правил проведения работ с использованием экспериментальных животных. Яичники с яйцеводами выделяли из умерщвленных методом дислокации шейных позвонков самок и препарировали в среде L-15 (Sigma-Aldrich, США) под контролем стереомикроскопа. Клетки гранулезы получали из стенки антральных фолликулов посредством пункции тонкой иглой. Клетки желтого тела изолировали микрохирургически из яичников беременных самок (12,5 сут). Ооцит-кумулюсные комплексы выделяли из ампул яйцеводов через 0,5 сут после спаривания с вазэктомизированными самцами и обрабатывали раствором гиалуронидазы (Sigma-Aldrich, США), после чего отбирали зрелые МП ооциты, а клетки кумулюса осаждали центрифугированием. Дробящиеся эмбрионы на стадии 4–8 клеток получали через 2–2,5 сут после спаривания путем диссекции яйцеводов. Бластоцисты вымывали из рогов матки через 4,5 сут после спаривания.

Полученные пробы лизировали в TRI Reagent (Sigma, США), после чего хранили в –80 °С до выделения тотальной РНК. После обработки ДНКазой I (Fermentas, США) 1 мкг РНК из клеток гранулезы, кумулюса и желтого тела, а также из яичников и 18-дневных зародышей использовали для синтеза кДНК с помощью набора реактивов “MMLV RT kit” (Евроген, Россия). Тотальную

Таблица 1. Специфические олигонуклеотиды для проведения ПЦР.

GeneID название гена		
Последовательности прямых (f) и обратных (r) праймеров (5'→3')	Тотж, °С	Длина, пн
NM_009414 <i>tph1</i>		
f1 GAGTCCCGGAAATCAAAGCAAAGA r1 GGTGGTTCGGCGTCAAGTTCG	57.7	256
f2 TGCGACATCAGCCGAGAACAGT r2 GGCGCAGAAAGTCCAGGTCAGAA	57.9	162
NM_173391 <i>tph2</i>		
f1 TTGCCGGGAGTACCTGAAAAACCT r1 TCCGAAACAAAGTAAGCGTCCTGA	59.3	564
f2 CATGGCTCCGACCCCTCTACA r2 ATACGCCCAGTTCAGCCCTCTT	58.9	219
NM_001190448 <i>ddc</i>		
f1 CCCCCAGGAGCCAGAAACATAC r1 CCTGCAGCTGGCGGATAACTT	59.3	368
f2 TCCCCACGGCTAGCTCATACCC r2 TTCCCCAGCCAGTCCATCATCA	58.4	133
NM_010484 <i>sert</i>		
f1 AGTACAAGCGCTGGGGATGAAG r1 GGAGGCGATATAAAAGGCAATGAT	58.4	369
f2 GGGAGACCTGGGGCAAGAAG r2 CAGGGCGAGCTCCATGTAGAAGA	57.7	182
NM_153054 <i>vmat1</i>		
f1 GGGGACTCCACTTTTGACACT r1 CCCCTGGGACACTGAGATTC	57.2	778
f2 AGATGGGTTCGGTGGCTGTGCTC r2 CTTTCGTGGGCCTCTGGATTGTGTA	59.2	443
NM_172523 <i>vmat2</i>		
f1 TGCCCCAGTGAAGACAAAGACCT r1 CATGCCCATCCCAGCCACAG	57.1	270
f2 CCACTGTCCAGCTCCTCACCAACC r2 GGCGATCAGCAGGAAGGCATAGC	56.0	149
NM_173740 <i>maoa</i>		
f1 AACCCCTTGGCATATTTGGATTAC r1 TTGGCATACAGCTCACAGATTTTC	55.5	788
f2 GCTGAGGAATGGGACAAGATAACC r2 TACCTCCACACTGCCTCACATACC	53.2	166
NM_008308 <i>htr1a</i>		
f1 TGCCCAGCGAATCAGGAG r1 GCCAAAGACCGAGCCAATAA	56.5	374
f2 TTGGCCCGTGAGAGGAAGACAGTGAA r2 CCAGGGCGGGGATATTGAGTGAACAG	59.5	626
NM_010482 <i>htr1b</i>		
f1 CGATGCGGTGGAGTATTCTGC r1 TAGCGGCCATGAGTTTCTTCTTTT	59.2	467
f2 CACGGTGGGCGCTTTCTATTTAC r2 AGCGGCCATGAGTTTCTTCTTTTC	59.5	286
NM_001285482 <i>htr1d</i>		
f1 TCACGGGAATGTTTTGTCTGGTCA r1 AGGTGCGGGTGGTGGTGTAGG	59.2	929
f2 TTCTTCCCTGCCACGTCTTGAGTTT r2 CTGGGGTGTGGAGCTTCTTGGTGA	59.9	405
NM_008310 <i>htr1f</i>		
f1 TGCAGTTGAATACGCCAGGAAGAG r1 AGGTAACCAAGCCATGCCAAAAAG	56.7	633

Таблица 1. (окончание).

GeneID название гена		
Последовательности прямых (f) и обратных (r) праймеров (5'→3')	Тотж, °С	Длина, пн
f2 CCAAGGAACTAGCCCGTGATGATGA r2 AGGGTAGTGGCTGCTTTGCGTTCT	56.5	396
NM_172812 <i>htr2a</i>		
f1 CAAGCTCTGTGCCGTCTGGATTTA r1 ATTTGGCCCCGAGTGCTGAGGT	58.4	398
f2 GAAAATCATTGCGGTGTGGAC r2 ATGATGGTTAGGGGGATGAAAAA	54.3	168
NM_008311 <i>htr2b</i>		
f1 TGGAGGGACAGGGGCATACAGT r1 AAGGGGCACCACATAAGCAGAAA	57.6	880
f2 CCCTGTGTCCTGCCTGGTTATT r2 TAGGCGTTGAGGTGGCTTATTTT	55.8	401
NM_008312 <i>htr2c</i>		
f1 TATTTGTGCCCCGTCTGGATTTC r1 GGATTGGGGTTGGGAGCGTTCT	58.1	476
f2 GTGCTATTTTCAACTGCGTCCATC r2 AACACTTTGCTTTCGTCCCTCAG	55.1	200
NM_013561 <i>htr3a</i>		
f1 ACACCATCCAGGACATCAACATTA r1 CAGCCGCACAATGAAGATGG	57.4	449
f2 TGGCGATCACCGGAAGAAGT r2 AGGAAGATACTGGGCAGCAAGAGG	56.2	200
NM_008313 <i>htr4</i>		
f1 CTGGGCTTATGGGGAGATGT r1 ATGAGGAGAAACGGGATGTAGAA	55.7	369
f2 TACCACAGCATCGATCTTTCACCT r2 ACCCAGCAGCCTCCCAACATT	54.8	132
NM_008314 <i>htr5a</i>		
f1 TGGCCATCGGTCGCAAACATCTA r1 TGCTCCCTCCACGTATCCCTTCT	61.5	915
f2 GCAAGCGTGTCTCCAATGTGATGA r2 GGGTACGGGGGAGACGCTGTT	59.8	276
NM_010483 <i>htr5b</i>		
f1 TGCTCTCGCCCCGCTGCTTTTT r1 GCTCGGCGACGGGCTGTGAAC	62.6	276
f2 CCTCTGGCGGTGGTGTCTTTC r2 CTCGGCGACGGGCTGTGA	59.3	157
NM_021358 <i>htr6</i>		
f1 GACCGCTACCTGCTCATCCTCTCG r1 CATCCCTGGGCGTGGTGTCTCT	63.5	381
f2 AACTGGGCAAAGCTCGAACATCTG r2 CCGTAGCCGTGCCCCGTGGTGAG	61.1	192
NM_008315 <i>htr7</i>		
f1 CTGGCGCTGGCTGACCTCTCG r1 TTGTGTTTGGCTGCGCTCTTCCTG	60.9	455
f2 GCGGTCATGCCTTTCGTTAGTG r2 CTGCGGTGGAGTAGATCGTGTAGC	58.8	340
NM_013556 <i>hprt</i>		
f1 GCTGAGGCGGCGAGGGAGAG r1 GCTAATCACGACGCTGGGACTGC	61,6	148

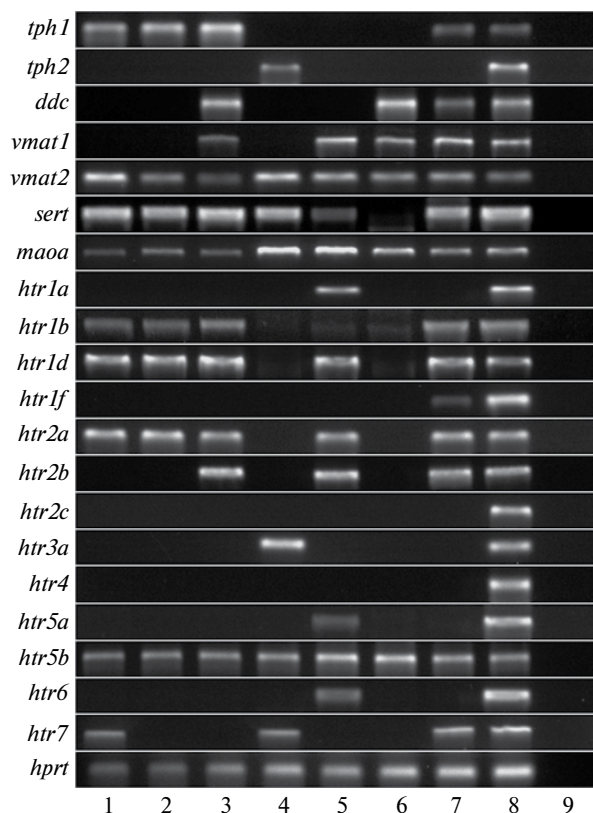


Рис. ОТ-ПЦР анализ экспрессии компонентов серотонинергической системы в фолликулогенезе и раннем эмбриогенезе мыши. 1 — клетки гранулы стенки антрального фолликула; 2 — клетки постовультарного кумулюса; 3 — желтое тело беременности (12,5 сут); 4 — зрелые МП ооциты; 5–4–8-клеточные эмбрионы (2–2,5 сут); 6 — бластоцисты (4,5 сут); 7 — яичник; 8 — 18-дневный зародыш; 9 — отрицательный контроль (ПЦР без матрицы).

РНК из 150 ооцитов или доимплантационных эмбрионов использовали для синтеза и амплификации кДНК с помощью набора реактивов “Mint” (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя, для амплификации кДНК потребовалось 19 циклов. ПЦР проводили на амплификаторе T100 (BIO RAD, США) с использованием готовой смеси для ПЦР “ScreenMix-HS” (Евроген, Россия). В ходе первого раунда гнездовой ПЦР проводили 24 цикла амплификации, в ходе второго раунда использовали 0,1 мкл ПЦР-смеси и проводили 30 циклов амплификации. Анализ продуктов проводили с помощью агарозного гель-электрофореза и системы видеорегистрации “Взгляд” (Хеликон, Россия). Для исключения ложноположительного результата проводили отрицательные контроли — ПЦР без матрицы и ПЦР без обратной транскрипции. Специфические олигонуклеотиды для проведения двух раундов “гнездовой” ПЦР (табл. 1) подбирали с помощью сервиса NCBI Primer-BLAST с учетом экзон-интронной структуры генов.

Исследовали экспрессию ферментов синтеза серотонина триптофангидроксилазы *tph1* и *tph2*, декарбоксилазы ароматических аминокислот *ddc*, везикулярных транспортеров моноаминов *vmat1*, и *vmat2*, транспортера серотонина *sert*, фермента деградации серотонина моноаминоксидазы *maoa* и серотониновых рецепторов *htr1a*, *htr1b*, *htr1d*, *htr1f*, *htr2a*, *htr2b*, *htr2c*, *htr3a*, *htr4*, *htr5a*, *htr5b*, *htr6* и *htr7*. В качестве контрольного гена использовали *hpri*. Каждый эксперимент проведен в трех повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе работы было проведено ОТ-ПЦР исследование экспрессии всех основных компонентов серотонинергической сигнальной системы в фолликулярных клетках, полученных на разных стадиях фолликулогенеза (гранулеза стенки антрального фолликула, клетки постовультарного кумулюса и желтое тело), а также в зрелых МП ооцитах и преимплантационных эмбрионах (дробление и бластоциста) мыши. Результаты ПЦР-скрининга представлены на рисунке. Экспрессия контрольного гена гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы *hpri* выявляется во всех пробах. В контрольной пробе, полученной из 18-дневного зародыша, выявляется экспрессия всех исследуемых генов, а в яичнике — за исключением *tph2*, *htr1a*, *htr2c*, *htr3a*, *htr4*, *htr5a* и *htr6*.

Экспрессия мРНК генов ферментов триптофангидроксилазы *tph1* и моноаминоксидазы *maoa*, транспортеров *vmat2* и *sert*, рецепторов *htr1b*, *htr1d*, *htr2a* и *htr5b* выявляется как в клетках гранулы и кумулюса, так и в желтом теле. Транскрипты генов фермента синтеза декарбоксилазы ароматических аминокислот *ddc*, везикулярного транспортера *vmat1* и рецептора *htr2b* не выявляются в клетках гранулы и кумулюса, но появляются в желтом теле. Рецептор *htr7* экспрессируется в клетках гранулы, но не выявляется в кумулюсе и желтом теле. Гены *tph2*, *htr1a*, *htr1f*, *htr2c*, *htr3a*, *htr4*, *htr5a* и *htr6* не экспрессируются в исследуемых пробах фолликулярных клеток.

Экспрессия *maoa*, везикулярного транспортера *vmat2*, рецептора *htr5b* выявляется как в ооцитах, так и в дробящихся эмбрионах и бластоцистах, а транспортера *sert* — только в ооцитах и дробящихся эмбрионах. Везикулярный транспортер *vmat1* отсутствует в ооцитах, но экспрессируется в доимплантационных эмбрионах. Фермент синтеза *tph2* и рецепторы *htr3a* и *htr7* экспрессируются только в ооцитах, а рецепторы *htr1a*, *htr1d*, *htr2a*, *htr2b* и *htr6* — только в дробящихся эмбрионах. Экспрессия фермента синтеза серотонина *ddc* выявляется только на стадии бластоцисты. Гены *tph1*, *htr1b*,

htr1f, *htr2c* и *htr4* не экспрессируются в исследуемых пробах ооцитов и доимплантационных эмбрионов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Гранулеза является ключевым соматическим компонентом развивающегося фолликула, опосредующим взаимодействие материнского организма с созревающей яйцеклеткой. Кумулюс является субпопуляцией клеток гранулезы, которая непосредственно окружает ооцит, остается с ним после овуляции, сопровождая его при оплодотворении. Профили экспрессии ряда генов отличаются в клетках стенки фолликула и кумулюсе (Burnik Papler et al., 2015). Однако экспрессия компонентов серотонинергической системы (за исключением *htr7*) в этих субпопуляциях фолликулярных клеток не отличается (рис).

Система деградации серотонина в фолликулярных клетках представлена экспрессией мРНК моноаминоксидазы А. В то же время, как свидетельствуют полученные нами результаты, собственный синтез серотонина в них невозможен. Как в клетках гранулезы, так и в кумулюсе экспрессируется только триптофангидроксилаза *tph1*, осуществляющая синтез 5-гидрокситриптофана, но не экспрессируется декарбоксилаза *ddc*, необходимая для синтеза серотонина. В то же время в фолликулярных клетках выявляется экспрессия мембранного транспортера *sert*, который осуществляет захват серотонина из внешней среды. Учитывая, что кровь является основным путем периферического серотонина в организме, его мембранный транспорт может играть важную роль в реализации регуляторных функций в яичнике. Наряду с этим экспрессирующийся в клетках гранулезы везикулярный транспортер *vmat2* способен осуществлять накопление серотонина и других моноаминов в секреторных гранулах, что необходимо для реализации межклеточной сигнализации. Существуют данные о негативном влиянии ингибиторов обратного захвата серотонина на функции яичника у *Danio* (Lister et al., 2009) и крыс (Moore et al., 2015), а способность захвата серотонина из внешней среды показана на клетках кумулюса мыши (Amireault, Dubé, 2005b). Следует предполагать, что нормальное функционирование данной сигнальной системы определяется серотонином, экзогенным по отношению к фолликулярным клеткам. Интересно, что отсутствие синтеза и активность мембранного и везикулярного транспорта в клетках гранулезы показаны на крысах для других моноаминергических регуляторов функции яичника, катехоламинов (Greiner et al., 2008).

Ключевым компонентом в процессе межклеточной сигнализации являются специфические мембранные рецепторы. Из множества рецепторов серотонина мРНК пяти — *htr1b*, *htr1d*, *htr2a*, *htr5b* и *htr7* — одновременно детектируются в гранулезе. Клетки

кумулюса экспрессируют те же типы рецепторов, за исключением *htr7*. Все эти рецепторы серотонина являются метаболитными семидоменными рецепторами, сопряженными с разными системами вторичных мессенджеров и могут опосредовать различные пути серотонинергической регуляции. На преовуляторных фолликулах крысы, культивируемых *in vitro*, было показано, что серотонин стимулирует синтез эстрадиола, а специфические антагонисты серотониновых рецепторов 2 типа устраняют этот эффект (Tanaka et al., 1993). В аналогичных экспериментах на хомячках была продемонстрирована активность серотониновых рецепторов 1 типа (Terranova et al., 1990). Для того чтобы установить роль каждого из экспрессирующихся рецепторов серотонина в регуляции функций клеток гранулезы мыши, требуются дальнейшие исследования.

Желтое тело, возникающее на месте овулировавшего фолликула, является временной железой внутренней секреции, основными клеточными компонентами которой являются большие и малые лютеоциты, производные клеток гранулезы и теки соответственно. Как и в гранулезе, в желтом теле выявляется экспрессия *sert*. С другой стороны, наряду с *tph1*, появляется экспрессия *ddc*, что говорит о том, что помимо захвата из межклеточного пространства, в желтом теле возможен синтез серотонина *de novo*. Здесь также выявляется экспрессия обоих типов везикулярных транспортеров моноаминов, что может быть связано с интенсивной секреторной активностью лютеоцитов. Экспрессия *taoa* в желтом теле сохраняется. Как и клетки кумулюса, клетки желтого тела экспрессируют рецепторы *htr1b*, *htr1d*, *htr2a* и *htr5b*, но не *htr7*. При этом, в отличие от клеток гранулезы, в желтом теле появляется мРНК рецептора *htr2b*. Известно, что серотонин активирует синтез прогестерона в желтом теле коровы через рецепторы 1 или 2 типа (Battista, Condon, 1986). Кроме того, рецептор HTR2B может ингибировать активность мембранного захвата серотонина через фосфорилирование SERT (Callebert et al., 2006). При этом известно, что серотонин является одним из факторов, активирующих процесс ангиогенеза путем стимуляции пролиферации, миграции и тубулогенеза эндотелиальных клеток (Zamani, Qu, 2012; Qin et al., 2016). Можно предположить, что серотонин, вновь синтезирующийся в желтом теле, индуцирует его васкуляризацию, необходимую для осуществления им секреторной функции.

Исследование экспрессии мРНК ферментов синтеза серотонина в ооцитах и доимплантационных эмбрионах показало, что триптофангидроксилаза *tph2* экспрессируется в ооцитах и исчезает к дроблению, тогда как декарбоксилаза *ddc* появляется только на стадии бластоцисты. Исходя из этого, следует полагать, что в ходе

преимплантационного развития мыши синтез серотонина становится возможен только к стадии бластоцисты, при условии сохранения активности ТРН2 или ее продукта на этой стадии. Стоит отметить, что *tph2*, которая долгое время считалась нейральной формой фермента, может служить маркером половой линии в яйцнике, так как не экспрессируется в окружающих ооцит фолликулярных клетках. Мембранный транспортер серотонина *sert* экспрессируется в ооцитах и дробящихся эмбрионах, но исчезает к стадии бластоцисты. В литературе имеются данные об экспрессии мРНК *sert* на всех стадиях доимплантационного развития, а также о наличии белка и его функциональной активности в доимплантационных эмбрионах (Amireault, Dubé, 2005b; Basu et al., 2008). Отсутствие экспрессии мРНК *sert* в бластоцисте может быть связано с используемым нами методическим подходом. Эффективность синтеза первой цепи кДНК сильно зависит от состояния исходной мРНК, в частности, от длины поли(А)-хвоста. Последующая процедура амплификации кДНК, необходимая ввиду малого количества исходного материала, способна усугубить количественные различия экспрессии между пробами. По всей вероятности, экспрессия транспортера серотонина несколько снижается к концу доимплантационного развития, на что косвенно указывает также продемонстрированное французскими коллегами уменьшение интенсивности иммуноокрашивания SERT в бластоцистах, по сравнению с дроблением (Amireault, Dubé, 2005b). Наряду с мембранным транспортером серотонина, в ходе доимплантационного развития выявляется экспрессия везикулярных транспортеров моноаминов, необходимых для осуществления межклеточной сигнальной функции, а также основного фермента деградации серотонина *taoa*.

В ооцитах выявляется экспрессия мРНК трех серотониновых рецепторов, причем *htr7* и канальный *htr3a* исчезают к дроблению, тогда как *htr5b* экспрессируется в течение всего доимплантационного развития. Стоит отметить совпадение временной транзиторной экспрессии редко встречающегося в оогенезе и раннем эмбриогенезе рецептора серотонина 3 типа в ооцитах и перепелки (Stepińska et al., 2015) и мыши, постоянная экспрессия которого у обоих видов затем наблюдается значительно позже. Интересно, что на стадии делений дробления наблюдается транзиторная экспрессия мРНК шести других рецепторов серотонина. Стоит отметить, что из выявленной экспрессии мРНК не следует экспрессия на уровне белка, и вопрос о функциональной активности этих рецепторов требует дальнейшего исследования. Однако полученный результат является хорошей иллюстрацией периода варибельности, наблюдающегося в доимплантационном развитии млекопитающих и характеризующегося временной избыточной и стохастической экспрессией разных генов в различных

клетках раннего эмбриона (Dietrich, Hiiragi, 2007). Полученные результаты имеют некоторые расхождения с литературными данными. Так, в клетках кумулюса нам не удалось выявить описанную в литературе экспрессию рецепторов *htr2b* и *htr7* (Amireault, Dubé, 2005a). При этом нами обнаружена экспрессия рецептора *htr2a* на стадии дробления, хотя в литературе есть данные об отсутствии мРНК этого гена в доимплантационном развитии (Amireault, Dubé, 2005a). В то же время, экспрессия рецептора *htr7* не выявлена нами в дробящихся эмбрионах и бластоцистах, тогда как в литературе есть данные об экспрессии этого гена до стадии 8 клеток (Amireault, Dubé, 2005a). Такие расхождения могут объясняться использованием разных линий мышей, и разных праймеров, а также, как и в случае *sert* (см. выше), могут быть связаны с особенностями используемых методических подходов. Тем не менее, данные об одновременной экспрессии мРНК серотониновых рецепторов нескольких типов в фолликулогенезе и раннем эмбриогенезе млекопитающих, показанной в данной работе, и аналогичные данные на зародышах амфибий и птиц (Nikishin et al., 2012; Stepińska et al., 2015) позволяют предположить существование нетривиального механизма, при котором к одному и тому же трансмиттеру в клетке, присутствуют рецепторы более чем одного типа, способные одновременно активировать разные сигнальные пути и, таким образом, реализовывать различные функции. Так, например, в бластомерах морских ежей серотонин одновременно вовлечен в регуляцию клеточного цикла (Бузников, 1987), жесткости кортикального цитоскелета (Григорьев, 1988), адгезии бластомеров (Бузников, Шмуклер, 1978) и прямых межклеточных взаимодействий (Шмуклер, 1981). Кроме того, серотонин, вероятно, может служить субстратом для синтеза мелатонина. Экспрессия ферментов синтеза мелатонина и его функциональная активность показана в ооцитах и преимплантационных эмбрионах крыс и свиней (Sakaguchi et al., 2013; Chen et al., 2017).

Таким образом, представленные в данной работе результаты показывают, что серотонинергическая система постоянно в той или иной форме присутствует на всех стадиях фолликулогенеза, оогенеза и последующего эмбриогенеза, выполняя одновременно и (или) последовательно целый ряд функций, конкретные детали реализации которых требуют дальнейшего глубокого изучения.

Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП ИБР им. Н.К. Кольцова РАН при финансовой поддержке гранта РФФИ 16-34-60250 мол_а_дк и гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских учёных МК-1304.2017.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бузников Г.А. Донервные трансмиттеры как регуляторы эмбриогенеза. Современное состояние проблемы // Онтогенез. 2007. Т. 38. № 4. С. 262–270.
- Бузников Г.А. Нейротрансмиттеры в эмбриогенезе / М.: Наука, 1987.
- Бузников Г.А. Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития / М.: Наука, 1967.
- Бузников Г.А., Шмуклер Ю.Б. Влияние препаратов-антимедиаторов на межклеточные связи у ранних зародышей морских ежей // Онтогенез. 1978. Т. 9. № 2. С. 173–178.
- Григорьев Н.Г. Кортикальный слой цитоплазмы – возможное место действия донервных трансмиттеров // Ж. эвол. биохим. физиолог. 1988. Т. 24. № 5. С. 625–629.
- Дыбан А.П., Пучков В.Ф., Баранов В.С. и др. Лабораторные млекопитающие: мышь *Mus musculus*, крыса *Rattus norvegicus*, кролик *Oryctolagus cuniculus*, хомячок *Cricetus griseus* / Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975. С. 505–566.
- Шмуклер Ю.Б. Межклеточные взаимодействия у ранних зародышей морских ежей. III. Влияние нейрофармакологических препаратов на тип дробления половинных зародышей *Scaphechinus mirabilis* // Онтогенез. 1981. Т. 12. № 4. С. 404–409.
- Amireault P., Dubé F. Intracellular cAMP and calcium signaling by serotonin in mouse cumulus-oocyte complexes // Mol Pharmacol. 2005a. V. 68. № 6. P. 1678–1687.
- Amireault P., Dubé F. Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos // Biol. Reprod. 2005b. V. 73. № 2. P. 358–365.
- Azmitia E.C. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis // Brain Res. Bull. 2001. V. 56. № 5. P. 413–424.
- Basu B., Desai R., Balaji J. et al. Serotonin in pre-implantation mouse embryos is localized to the mitochondria and can modulate mitochondrial potential // Reproduction. 2008. V. 135. № 5. P. 657–669.
- Battista P.J., Condon W.A. Serotonin-induced stimulation of progesterone production by cow luteal cells in vitro // J. Reprod. Fertil. 1986. P. 76. № 1. P. 231–238.
- Burnik Papler T., Vrtačnik Bokal E., Maver A. et al. Transcriptomic analysis and meta-analysis of human granulosa and cumulus cells // PloS One. 2015. V. 10. № 8. e0136473.
- Buznikov G.A., Kost A.N., Kucherova N.F. et al. The role of neurohumours in early embryogenesis III. Pharmacological analysis of the role of neurohumours in cleavage divisions // J. Embryol. Exp. Morphol. 1970. V. 23. № 3. P. 549–569.
- Buznikov G.A., Nikitina L.A., Galanov A.Y. et al. The control of oocyte maturation in the starfish and amphibians by serotonin and its antagonists // Int. J. Dev. Biol. 1993. V. 37. № 2. P. 363–364.
- Buznikov G.A., Peterson R.E., Nikitina L.A. et al. The pre-nervous serotonergic system of developing sea urchin embryos and larvae: pharmacologic and immunocytochemical evidence // Neurochem. Res. 2005. V. 30. № 6–7. P. 825–837.
- Bódis J., Bognár Z., Hartmann G. et al. Measurement of noradrenaline, dopamine and serotonin contents in follicular fluid of human graafian follicles after superovulation treatment // Gynecol. Obstet. Invest. 1992. V. 33. № 3. P. 165–167.
- Bódis J., Hartmann G., Török A. et al. Relationship between the monoamine and gonadotropin content in follicular fluid of preovulatory graafian follicles after superovulation treatment // Exp. Clin. Endocrinol. 1993. V. 101. № 3. P. 178–182.
- Buznikov G.A., Peterson R.E., Nikitina L.A. et al. The pre-nervous serotonergic system of developing sea urchin embryos and larvae: pharmacologic and immunocytochemical evidence // Neurochem. Res. 2005. V. 30. № 6–7. P. 825–837.
- Callebert J., Esteve J.M., Herve P. et al. Evidence for a control of plasma serotonin levels by 5- hydroxytryptamine 2B receptors in mice // Pharmacology. 2006. V. 317. № 2. P. 724–731.
- Cerdá J., Subhedar N., Reich G. et al. Oocyte sensitivity to serotonergic regulation during the follicular cycle of the teleost *Fundulus heteroclitus* // Biol. Reprod. 1998. V. 59. № 1. P. 53–61.
- Chen Z., Zuo X., Li H. et al. Effects of melatonin on maturation, histone acetylation, autophagy of porcine oocytes and subsequent embryonic development // Anim Sci J. 2017 Mar 27. [Epub ahead of print]
- Côté F., Fligny C., Bayard E. et al. Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007. V. 104. № 1. P. 329–334.
- Dietrich J.E., Hiragi T. Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo // Development. 2007. V. 134. № 23. P. 4219–4231.
- Dubé F., Amireault P. Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos // Life Sci. 2007. V. 81. № 25–26. P. 1627–1637.
- Graveleau C., Paust H.J., Schmidt-Grimminger D. et al. Presence of a 5-HT7 receptor positively coupled to adenylate cyclase activation in human granulosa-lutein cells // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2000. V. 85. № 3. P. 1277–1286.
- Greiner M., Paredes A., Rey-Ares V. et al. Catecholamine uptake, storage, and regulated release by ovarian granulosa cells // Endocrinology. 2008. V. 149. № 10. P. 4988–4996.
- Hinckley M., Vaccari S., Horner K. et al. The G-protein-coupled receptors GPR3 and GPR12 are involved in cAMP signaling and maintenance of meiotic arrest in rodent oocytes // Dev. Biol. 2005. V. 287. № 2. P. 249–261.
- Il'ková G., Reháč P., Veselá J. et al. Serotonin localization and its functional significance during mouse preimplantation embryo development // Zygote. 2004. V. 12. № 3. P. 205–213.
- Koppa M., Bodis J., Verzar Z. et al. Serotonin may alter the pattern of gonadotropin-induced progesterone release of human granulosa cells in superfusion system // Endocrine. 2004. V. 24. № 2. P. 155–159.
- Krantic S., Dube F., Quirion R. et al. Pharmacology of the serotonin-induced meiosis reinitiation in *Spisula solidissima* oocytes // Dev. Biol. 1991. V. 146. № 2. P. 491–498.
- Lara H.E., Ferruz J.L., Luza S. et al. Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome // Endocrinology. 1993. V. 133. P. 2690–2695.
- Levin M., Buznikov G.A., Lauder J.M. Of minds and embryos: left-right asymmetry and the serotonergic controls of pre-neural morphogenesis // Dev. Neurosci. 2006. V. 28. № 3. P. 171–185.
- Lister A., Regan C., Van Zwol J. et al. Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: A mechanistic evaluation // Aquat. Toxicol. 2009. V. 95. № 4. P. 320–329.

- Mayerhofer A., Smith G.D., Danilchik M. et al. Oocytes are a source of catecholamines in the primate ovary: evidence for a cell-cell regulatory loop // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998. V. 95. № 18. P. 10990–10995.
- Moore C.J., DeLong N.E., Chan K.A. et al. Perinatal administration of a selective serotonin reuptake inhibitor induces impairments in reproductive function and follicular dynamics in female rat offspring // *Reprod. Sci.* 2015. V. 22. № 10. P. 1297–1311.
- Nikishin D.A., Kremnyov S.V., Konduktorova V.V. et al. Expression of serotonergic system components during early *Xenopus* embryogenesis // *Int. J. Dev. Biol.* 2012. V. 56. № 5. P. 385–391.
- Qin L., Zhao D., Xu J. et al. The vascular permeabilizing factors histamine and serotonin induce angiogenesis through TR3/Nur77 and subsequently truncate it through thrombospondin-1 // *Blood*. 2013. V. 121. № 11. P. 2154–2164.
- Sakaguchi K., Itoh M.T., Takahashi N. et al. The rat oocyte synthesizes melatonin // *Reprod Fertil Dev.* 2013. V. 25. № 4. P. 674–682.
- Sheng Y., Wang L., Liu X.S.J. et al. A serotonin receptor antagonist induces oocyte maturation in both frogs and mice: evidence that the same G protein-coupled receptor is responsible for maintaining meiosis arrest in both species // *J. Cell. Physiol.* 2005. V. 202. № 3. P. 777–786.
- Shmukler Y.B., Silvestre F., Tosti, E. 5-HT-receptive structures are localized in the interblastomere cleft of *Paracentrotus lividus* early embryos // *Zygote*. 2008. V. 16. № 1. P. 79–86.
- Shuey D.L., Sadler T.W., Tamir H. et al. Serotonin and morphogenesis. Transient expression of serotonin uptake and binding protein during craniofacial morphogenesis in the mouse // *Anat. Embryol. (Berl.)* 1993. V. 187. № 1. P. 75–85.
- Stepińska U., Kuwana T., Olszańska B. Serotonin receptors are selectively expressed in the avian germ cells and early embryos // *Zygote*. 2014. V. 23. № 3. P. 1–12.
- Stricker S.A., Smythe T.L. 5-HT causes an increase in cAMP that stimulates, rather than inhibits, oocyte maturation in marine nemertean worms // *Development*. 2001. V. 128. № 8. P. 1415–1427.
- Tanaka E., Baba N., Toshida K. et al. Serotonin stimulates steroidogenesis in rat preovulatory follicles: involvement of 5-HT₂ receptor // *Life Sci.* 1993. V. 53. № 7. P. 563–570.
- Terranova P.F., Uilenbroek J.T., Saville L. et al. Serotonin enhances oestradiol production by hamster preovulatory follicles in vitro: effects of experimentally induced atresia // *J. Endocrinol.* 1990. V. 125. № 3. P. 433–438.
- Tinikul Y., Joffre Mercier A., Soonklang N. et al. Changes in the levels of serotonin and dopamine in the central nervous system and ovary, and their possible roles in the ovarian development in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2008. V. 158. № 3. P. 250–258.
- Veselá J., Reháček P., Mihalik J. et al. Expression of serotonin receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos // *Physiol. Res.* 2003. V. 52. № 2. P. 223–228.
- Wang Q., He M. Molecular characterization and analysis of a putative 5-HT receptor involved in reproduction process of the pearl oyster *Pinctada fucata* // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2014. V. 204. P. 71–79.
- Zamani A., Qu Z. Serotonin activates angiogenic phosphorylation signaling in human endothelial cells // *FEBS Lett.* 2012. V. 586. № 16. P. 2360–2365.
- Zatylny C., Durantou F., Boucaud-Camou E. et al. Evidence of 5-hydroxytryptamine synthesis in the follicles of *Sepia officinalis* and direct involvement in the control of egg-laying // *Mol. Reprod. Dev.* 2000. V. 55. № 2. P. 182–188.

Expression of Components of the Serotonergic System in Folliculogenesis and Preimplantation Development in Mice

D. A. Nikishin^{1, 2, *}, Yu. V. Khramova², T. S. Bagayeva², M. L. Semenova², and Yu. B. Shmuklera¹

¹Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

²Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

*E-mail: denisnikishin@gmail.com

Received November 22, 2016; in final form, May 10, 2017

The functions of serotonin include the growth and development regulation of female germ cells as well as early embryo development. RT-PCR analysis of mRNA expression of the genes of the enzymes for synthesis and degradation and transporters and receptors of serotonin during folliculogenesis and preimplantation development of mice was performed to discover the particular mechanisms of these functions. The mRNA of tryptophan hydroxylase *tph1* and monoaminooxidase *maoa*; membrane transporter *sert* and vesicular transporter *vmat2*; and serotonin receptors *htr1b*, *htr1d*, *htr2a*, *htr5b*, and *htr7* were revealed in granulosa cells. The expression of mRNA of the aromatic amino acid decarboxylase *ddc* and the *htr2b* receptor additionally appears in the yellow body. The expression of mRNA of the genes of the *tph2*, *ddc*, and *maoa* enzymes; the *sert*, *vmat1*, and *vmat2* transporters; and quite a number of receptors is observed during the preimplantation development, and it is transitory in most of them. The expression of all components and its dynamics suggest that the serotonergic signaling system is functionally active in mouse folliculogenesis and preimplantation development.

Keywords: folliculogenesis, granulosa, cumulus, yellow body, preimplantation development, mouse, RT-PCR, serotonin, synthesis, degradation, transport, receptor