

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Фролова Вероника Сергеевна

**Морфофункциональная организация серотонинергической системы
в ооцитах и ранних эмбрионах мыши**

Специальность 1.5.23. Биология развития, эмбриология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена на кафедре эмбриологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель – *Никишин Денис Александрович*, кандидат биологических наук.

Официальные оппоненты – *Киреев Игорь Игоревич*, доктор биологических наук, заведующий отделом электронной микроскопии Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Сайфитдинова Алсу Фаритовна, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры физиологии человека и животных Российского государственного педагогического университета имени А.И. Герцена.

Крещенко Наталья Дмитриевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов редокс-регуляции клеточных процессов Института биофизики клетки Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального исследовательского центра «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

Защита диссертации состоится «29» сентября 2026 г. в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.9 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, ул. Ленинские горы, 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М-1.

E-mail: dissovet.msu.015.9@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3977>.

Автореферат разослан «___» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета МГУ 015.9,
кандидат биологических наук

Т.В. Доронина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Серотонин (5-НТ) представляет собой многофункциональную сигнальную молекулу, первоначально описанную как сосудосуживающий фактор кишечника. Важным этапом в понимании биологической роли серотонина стало открытие Г.А. Бузниковым в начале 1960-х годов его влияния на процессы раннего эмбрионального развития. Установлено, что серотонин и компоненты серотонинергической системы вовлечены в такие фундаментальные процессы раннего эмбриогенеза, как регуляция динамики клеточного цикла, модуляция механической жесткости цитоскелета и обеспечение межбластомерных взаимодействий.

В организме млекопитающих значительная часть серотонина синтезируется энтерохромаффинными клетками желудочно-кишечного тракта, запасается в тромбоцитах и выступает в качестве регуляторного гормона практически во всех тканях. Серотонин способен транспортироваться из материнского кровотока в ткани яичника, накапливаясь как в ооцитах, так и в клетках гранулезы. Он оказывает стимулирующее воздействие на активность фолликулярных клеток, индуцируя повышение концентрации вторичных мессенджеров. Это опосредованно влияет на процессы роста и созревания ооцитов, в том числе селекцию фолликулов в яичниках. На последующих этапах развития серотонин выступает регулятором клеточного цикла, процессов пролиферации и апоптоза в эмбрионах. Несмотря на обширный массив накопленных данных, в настоящее время отсутствует целостное понимание структурно-функциональной организации серотонинергической системы в раннем эмбриогенезе.

Системный анализ компонентов серотонинергической системы способствует формированию представлений о механизмах её функционирования в донервных эмбрионах. В частности, анализа требует гипотеза о возможности одновременной функциональной активации множества типов серотониновых рецепторов в пределах одной клетки. Полученные результаты создают основу для проведения сравнительного анализа эмбриональной серотонинергической системы и аналогичных структур нервной системы и периферических тканей дефинитивного организма.

В связи с вышесказанным, данная работа направлена на комплексное морфофункциональное исследование компонентов серотонинергической системы в клетках эмбрионов мыши на доимплантационных стадиях развития. Молекулярно-биологические данные об экспрессии сопоставлялись с результатами пространственной визуализации и анализа функциональной активности компонентов серотонинергической системы.

Цель исследования – охарактеризовать состав, пространственно-временную организацию и функциональную активность компонентов серотонинергической сигнальной системы в оогенезе и раннем эмбриогенезе мыши.

Задачи исследования:

1. Определить вклад эндогенного синтеза как возможного источника серотонина в эмбрионах мыши на доимплантационных стадиях развития.
2. Выявить спектр рецепторов серотонина, транскрибируемых в период доимплантационного развития, а также установить их пространственную локализацию в ооцитах и на различных стадиях доимплантационного развития.
3. Исследовать динамику экспрессии, клеточную локализацию и функциональную активность везикулярного транспортера моноаминов VMAT2, и оценить его вклад в процесс накопления серотонина при созревании ооцита.
4. Исследовать динамику экспрессии, клеточную локализацию и функциональную активность фермента деградации серотонина моноаминоксидазы А (МАО-А) на доимплантационных стадиях развития.
5. Оценить влияние повышения уровня внутриклеточного серотонина на жизнеспособность эмбрионов, митохондриальную активность, уровень генерации активных форм кислорода, способность к имплантации *in vitro* и экспрессию маркеров плюрипотентности и спецификации клеточных линий.
6. Выявить влияние повышенной концентрации внутриклеточного серотонина в ранних эмбрионах на процессы эпигенетической модификации хроматина путем серотонилирования.

Объект исследования. Работа проводилась на самках мышей линий C57BL/6J и ICR (питомник “Столбовая”, РАН). Животных содержали в стандартных условиях с контролируемым режимом освещения. Все манипуляции с животными проводились в строгом соответствии с правилами этического обращения с лабораторными животными, утвержденными Комиссией по биоэтике Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, а также актуальными национальными и международными нормативами (протокол № 37 от 10.09.2020 г. и протокол № 44 от 24.12.2020 г.).

Научная новизна полученных результатов

В представленной работе впервые дана комплексная характеристика пространственно-временной организации компонентов серотонинергической системы в оогенезе и на стадиях доимплантационного развития мыши. Впервые установлен спектр экспрессирующихся на белковом уровне серотониновых рецепторов и продемонстрирована их специфическая локализация.

Впервые доказана функциональная активность везикулярного транспортера моноаминов VMAT2 в процессе созревания ооцитов. Показано, что именно активность VMAT2 определяет способность ооцита запасать серотонин в компактных (вероятнее всего везикулярных) структурах кортикальной зоны, а нарушение его работы ведет к критическому нарушению накопления серотонина.

Принципиально новым является выявление метаболической автономности доимплантационного эмбриона в отношении поддержания пула внутриклеточного серотонина. Впервые показано, что, наряду с захватом экзогенного серотонина,

эмбрион способен к эндогенному синтезу серотонина *de novo* из 5-НТФ при участии фермента декарбоксилазы ароматических аминокислот DDC, активность и транскрипция которого компенсаторно активируется в ответ на снижение доступности серотонина.

В работе впервые охарактеризована динамика активности фермента деградации серотонина моноаминоксидазы А (МАО-А). Установлены сроки проявления функциональной активности данного фермента, появляющейся на стадии дробления и достигающей максимума на стадии бластоцисты. При этом впервые детально исследованы последствия блокировки ферментов деградации и искусственного повышения уровня внутриклеточного серотонина.

Абсолютно новаторским результатом исследования является открытие эпигенетического эффекта серотонина в доимплантационном развитии. Впервые на развивающихся эмбрионах млекопитающих продемонстрирован феномен серотонилирования гистона H3. Показано, что повышение уровня внутриклеточного серотонина индуцирует опосредованное трансклутаминой ковалентное присоединение серотонина к гистону H3, что выступает в качестве молекулярного механизма эпигенетического «мечения», способного проявляться отсрочено в ходе дальнейшего развития.

Теоретическая и практическая значимость. Теоретическая значимость работы заключается в существенном расширении фундаментальных представлений о неклассических функциях нейротрансмиттеров в раннем эмбриогенезе млекопитающих. Полученные данные доказывают, что серотонин выступает не просто как пассивный метаболит материнского происхождения, а как ранняя сигнальная молекула, для работы с которой эмбрион формирует полнофункциональную, автономную и пространственно организованную систему еще до закладки нервной ткани. Концептуальным вкладом в биологию развития является доказательство метаболической пластичности доимплантационного эмбриона, способного гибко переключаться между мембранным захватом и эндогенным синтезом моноамина в ответ на изменения микроокружения. Особую фундаментальную ценность представляет открытие серотонилирования гистона H3 в клетках бластоцисты. Этот феномен открывает совершенно новый механизм ранней эпигенетической регуляции, демонстрируя, как колебания внутриклеточного пула серотонина могут конвертироваться в молекулярную «память» и влиять на процессы клеточной дифференцировки без непосредственного ущерба для жизнеспособности или имплантационного потенциала зародыша.

Практическая значимость работы тесно связана с вопросами репродуктивной медицины, фармакотоксикологии и эмбриологии. Доказательство функциональной активности транспортеров (SERT, VMAT2), ферментов (МАО-А) и рецепторов в ооцитах и ранних эмбрионах напрямую указывает на их высокую уязвимость перед психотропными препаратами. Выявленные механизмы реактивности

доимплантационных эмбрионов к экспериментальному изменению содержания серотонина и блокаде обратного захвата служат фундаментальной базой для оценки репродуктивной безопасности антидепрессантов групп селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (СИОЗС) и ингибиторов моноаминоксидаз (ИМАО). Результаты исследования обосновывают необходимость более тщательного подхода к подбору, дозированию и коррекции психофармакотерапии у женщин репродуктивного возраста, планирующих беременность или находящихся на ранних ее сроках. Кроме того, обнаруженный феномен серотонилирования гистонов предлагает новый потенциальный эпигенетический маркер для оценки отсроченных последствий фармакологического или стрессового воздействия. Полученные данные о параметрах выживаемости эмбрионов и поддержании митохондриального гомеостаза могут быть также использованы для оптимизации протоколов и совершенствования составов сред культивирования в клинической практике вспомогательных репродуктивных технологий.

Методология исследования. В основе данной диссертационной работы лежат современные методы биологии развития, а также методы клеточной и молекулярной биологии.

Положения, выносимые на защиту:

1. В ооцитах и доимплантационных эмбрионах мыши экспрессируется и функционирует комплексная серотонинергическая система, которая включает набор специфических рецепторов (5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{5A} и 5-HT₇), мембранный (SERT) и везикулярный (VMAT2) транспортеры, а также ферменты синтеза (DDC) и деградации (MAO-A).
2. Пространственная организация серотонинергической системы в раннем развитии отличается выраженным кортикальным (периферическим) паттерном. Накопление серотонина в компактных структурах (везикулах) периферической зоны ооцитов опосредовано функциональной активностью транспортера VMAT2. Характерная периферическая локализация самого серотонина и пула его мембранных рецепторов (5-HT_{1D}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{5A} и 5-HT₇) свидетельствует о вероятной роли серотонина как сигнальной молекулы, опосредующей межклеточные взаимодействия на начальных этапах развития.
3. Доимплантационные эмбрионы мыши способны к автономному поддержанию внутриклеточного уровня серотонина. Помимо активного мембранного захвата экзогенного медиатора посредством транспортера SERT, в эмбрионах осуществляется эндогенный синтез серотонина *de novo* при участии фермента декарбоксилазы ароматических L-аминокислот DDC. Ограничение поступления материнского серотонина активирует в клетках зародыша компенсаторный механизм, проявляющийся в увеличении активности его синтеза.
4. Внутриклеточный серотонин выполняет функцию эпигенетического модулятора в доимплантационном развитии. Экспериментальное увеличение внутриклеточного

уровня серотонина не оказывает негативного влияния на базовые параметры жизнеспособности эмбриона (митохондриальную активность, генерацию АФК, потенции к имплантации в модели *in vitro*), а также не нарушает паттерны экспрессии генов плюрипотентности (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog*) и первичной клеточной спецификации (*Cdx2*, *Gata6*). Однако повышение концентрации серотонина запускает опосредованный трансклутаминазами механизм эпигенетической модуляции хроматина – значимое усиление серотонилирования гистона H3.

Степень достоверности и апробации результатов. Степень достоверности полученных результатов обеспечивается обоснованным планированием и строгим дизайном экспериментов, а также комплексным использованием современных молекулярно-биологических, иммуноцитохимических и физиологических методов. Надежность и аргументированность выводов базируются на репрезентативном объеме проанализированных выборок, обязательном наличии релевантных контрольных групп, высокой степени воспроизводимости экспериментальных данных. Обработка полученных массивов данных проводилась с корректным применением современных методов непараметрической и параметрической статистики с использованием специализированного программного обеспечения. Все использованные экспериментальные протоколы соответствуют строгим международным стандартам и валидированы в ведущих отечественных и зарубежных рецензируемых изданиях. Основные положения, результаты и выводы диссертационной работы были представлены, доложены и обсуждены на 6 профильных научных форумах различного уровня.

Публикации. По материалам работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова по специальности и отрасли наук.

Личный вклад автора. Личный вклад автора состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования: от формирования рабочей гипотезы, постановки цели и задач до подготовки текста рукописи диссертации. Экспериментальная часть работы выполнена соискателем лично на базе кафедры эмбриологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и в группе эмбриофизиологии лаборатории проблем регенерации Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гормональная стимуляция суперовуляции и получение ооцитов и эмбрионов. Ооциты мыши получали после гормональной стимуляции суперовуляции (гонадотропин сыворотки жеребых кобыл, 5 МЕ/мышь, через 46-48 ч хорионический гонадотропин, 5 МЕ/мышь), эмбрионы – методом проверки вагинальных пробок после спаривания, извлеченные эмбрионы в последствии культивировали *in vitro* в среде

KSOM. В работе использовались ооциты на стадиях GV и MII, а также эмбрионы на стадиях зиготы (0,5 dpc), морулы (2,5 dpc) и бластоцисты (3,5 dpc). Имплантацию эмбрионов моделировали путем пролонгированного культивирования бластоцист до 8,5 дней развития.

Фармакологические процедуры. Блокаду везикулярного транспорта исследовали *in vivo* путем курсового введения ингибитора VMAT2 резерпина (1 мг/кг, ежедневно в течение 7 дней). Эффекты блокады обратного захвата серотонина оценивали у самок, получавших перорально флуоксетин (20 мг/кг/сутки, не менее 10 дней) в период развития эмбрионов до стадии бластоцисты. Внутриклеточное накопление серотонина в эмбрионах индуцировали *in vitro* добавлением в среду серотонина (1 мкМ) или его предшественника 5-НТР (10 мкМ) на фоне ингибирования моноаминоксидазы паргилином (5 мкМ). Для оценки роли транслутаминаз применяли их специфический ингибитор цистамин (10 мкМ) в условиях *in vitro*.

Обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени. Выделение тотальной РНК из исследуемых эмбрионов осуществляли гуанидинизотиоцианат-фенол-хлороформным методом. Реакцию обратной транскрипции и синтез кДНК проводили с применением случайных гексамерных праймеров и обратной транскриптазы MMLV. Относительный уровень экспрессии генов оценивали методом количественной ОТ-ПЦР (метод $2^{-\Delta C_t}$) с нормализацией по референсным генам *Rps18* и *Tbp*.

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Количественное определение эндогенного серотонина проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием электрохимического детектора Decade II, применяя в качестве внутреннего стандарта гидробромид 3,4-дигидроксibenзиламина для точной калибровки пиков.

Вестерн-блоттинг. Образцы лизировали в буфере RIPA, белки разделяли электрофорезом в 10%-м полиакриламидном геле и переносили на PVDF-мембраны. Сигнал визуализировали методом усиленной хемилюминесценции с помощью системы гель-документирования Fusion-FX Edge, а цифровой анализ проводили в ПО Image Lab.

Иммуногистохимия и окрашивание витальными красителями. Пространственное распределение серотонина и специфических белков изучали с помощью конфокальной иммуногистохимии на тотальных препаратах ооцитов и эмбрионов и на криосрезах яичников. Для комплексной визуализации дополнительно использовали окрашивание ядер флуорохромом DAPI и актинового цитоскелета фаллоидином. Физиологическое состояние интактных живых бластоцист оценивали с помощью прижизненного флуоресцентного мечения: мембранный потенциал митохондрий определяли зондом LumiTracker Mito Orange, а продукцию АФК – красителем 6-карбокси- H_2DCFDA .

Обработка и анализ изображений. Для обеспечения строгой объективности количественного сравнения флуоресценции регистрацию сигналов проводили при

идентичных аппаратных настройках микроскопа во всех экспериментальных группах. Цифровую обработку снимков и расчет средней интенсивности свечения выполняли в программной среде FIJI/ImageJ.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism 8.0.1. Для нивелирования влияния индивидуальных особенностей животных контрольные и опытные группы формировали методом рандомизации из объединенного пула эмбрионов, полученных от нескольких помётов (15–30 объектов в как минимум 3 независимых повторностях). Достоверность различий оценивали с помощью непараметрических критериев (Манна-Уитни, Вилкоксона, Краскела-Уоллиса), а при многофакторном дизайне применяли двухфакторный дисперсионный анализ (Two-Way ANOVA) с апостериорным тестом Шидака. Порог статистической значимости был установлен на уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Источники серотонина в эмбрионе на доимплантационных стадиях развития. В качестве главного источника 5-НТ для ооцитов и доимплантационных эмбрионов описан захват серотонина из межклеточной среды посредством специфического мембранного транспортера SERT, однако не исключается вероятность эндогенного синтеза 5-НТ самими эмбрионами. Для изучения возможного синтеза эмбрионом 5-НТ *de novo* был проведен следующий эксперимент: эмбрионы, начиная со стадии морулы, инкубировали в среде, содержащей предшественник серотонина 5-НТР, с последующим анализом внутриклеточной локализации 5-НТ (Рис. 1А-В). Инкубация проводилась в присутствии ИМАО паргилина для предотвращения деградации синтезируемого серотонина. Анализ выявил достоверное увеличение интенсивности сигнала серотонина в экспериментальной группе по сравнению с контрольной, как в клетках трофэктодермы, так и в клетках внутренней клеточной массы (ВКМ). Таким образом, получены свидетельства функциональной активности фермента синтеза серотонина DDC уже на доимплантационных этапах онтогенеза.

Далее изучалось влияние дефицита материнского серотонина на процессы раннего эмбриогенеза. Для этого применяли СИОЗС флуоксетин, препятствующий захвату 5-НТ клетками из окружающей среды: самки мышей получали флуоксетин перорально в течение 10 дней, после чего проводилось их спаривание с регистрацией датированной беременности; эмбрионы извлекали и анализировали на сроке 3,5 dpc (Рис. 1Г-Ж). Был зафиксирован парадоксальный результат: уровень специфической иммунореактивности у эмбрионов, полученных от матерей экспериментальной группы, оказался на 43,03% выше в клетках ВКМ и на 43,40% выше в клетках трофэктодермы по сравнению с контролем (Рис. 1Е). Для выяснения молекулярных механизмов данного эффекта был проведен количественный анализ экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты синтеза серотонина: триптофангидроксилаз *Tph1* и *Tph2* и декарбоксилазы ароматических L-аминокислот *Ddc*. В результате

статистической обработки полученных данных не было выявлено достоверных различий в уровне экспрессии мРНК *Tph1* и *Tph2*. Однако, наблюдалась выраженная тенденция к повышению уровня экспрессии мРНК гена *Ddc* у эмбрионов, полученных от самок, принимавших флуоксетин ($p = 0,0530$, Рис. 1Ж). Полученные результаты свидетельствуют о вероятном включении компенсаторного механизма. Можно полагать, что доимплантационный эмбрион, реагируя на дефицит серотонина в материнском микроокружении, активирует систему синтеза собственного серотонина, преимущественно за счет фермента заключительного этапа синтеза серотонина DDC.

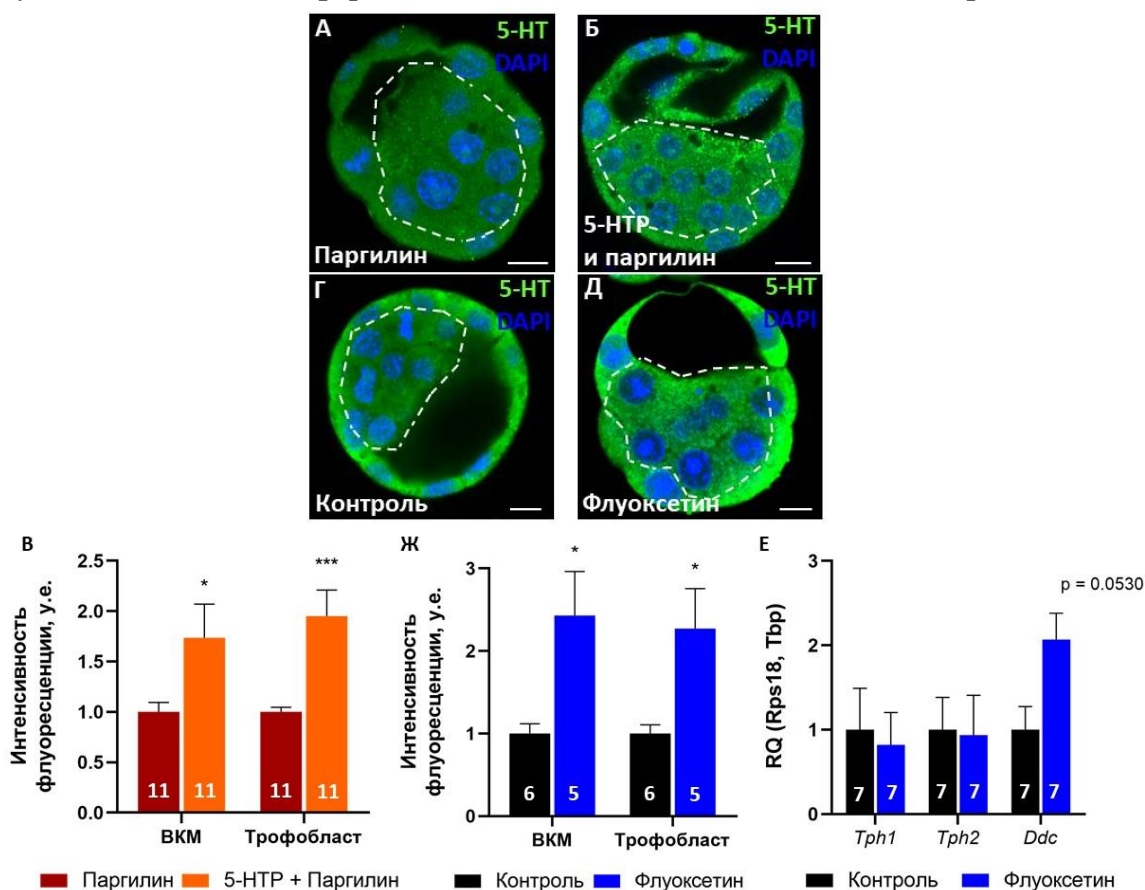


Рисунок 1. Источники серотонина в ранних эмбрионах мыши. А–Б – иммуногистохимическое выявление серотонина в бластоцистах. Пунктирная линия обозначает зону ВКМ. Масштаб: 10 мкм. В– количественный анализ иммунореактивности 5-НТ в бластоцистах, здесь и далее данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего, цифры на гистограммах указывают количество экспериментальных повторностей, учтенных при статистическом анализе. Звездочками отмечены статистически значимые различия между экспериментальными группами согласно критерию Вилкоксона (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). Г–Д – иммуногистохимическое выявление серотонина в бластоцистах. Е – количественный анализ иммунореактивности 5-НТ в бластоцистах. Звездочками отмечены статистически значимые различия между группами согласно критерию Манна–Уитни (* $p < 0,05$). Ж – экспрессия генов, кодирующих ферменты синтеза и деградации серотонина. RQ – относительный уровень экспрессии, рассчитанный методом $2^{(-\Delta Ct)}$ по отношению к референсным генам *Tbp* и *Rps18*. Статистически значимых различий не выявлено (критерий Манна–Уитни), для гена *Ddc* отмечена тенденция к значимости ($p = 0,0530$).

Анализ компонентного состава серотонинергической сигнальной системы в раннем эмбриогенезе. Распределение 5-НТ и везикулярного транспортера моноаминов VMAT2 в GV-ооцитах и ранних эмбрионах мышей было схожим: трансмиссер выявлялся повсеместно в клетках в виде мелких частиц, преимущественно в периферической области клетки (рис. 2А-2Б). На стадии бластоцисты содержание 5-НТ было выше в клетках трофобласта, чем в ВКМ (рис. 2В), аналогичная картина наблюдалась и для VMAT2 (рис. 2Г-2Е).

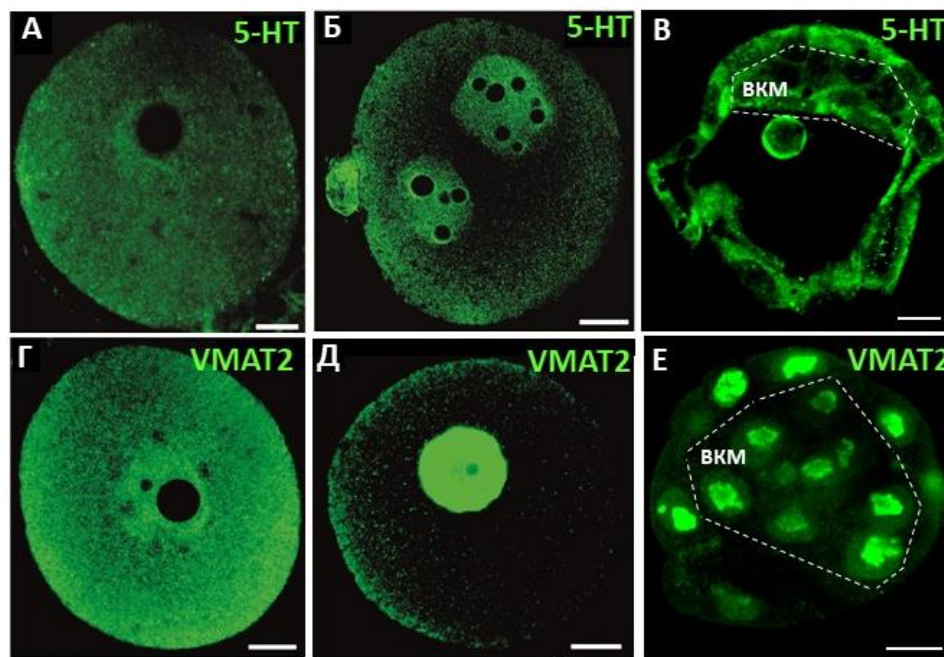


Рисунок 2. Распределение серотонина и везикулярного транспортера моноаминов VMAT2 в GV-ооцитах, зиготах и бластоцистах мышей. А – распределение 5-НТ в GV-ооцитах, Б – распределение 5-НТ в зиготах, В – распределение 5-НТ в бластоцистах. Г – распределение VMAT2 в GV-ооцитах, Д – распределение VMAT2 в зиготах, Е – распределение VMAT2 в бластоцистах. Масштаб: 10 мкм. Пунктирная линия обозначает зону ВКМ.

Также был исследован характер экспрессии 5 серотониновых рецепторов: 5-НТ_{1В}, 5-НТ_{1Д}, 5-НТ_{2В}, 5-НТ_{5А} и 5-НТ₇. Все описанные рецепторы приобретали четкий периферический паттерн иммунореактивности к стадии зиготы, кроме рецептора 5-НТ_{1В}, который визуализировался преимущественно в непериферической цитоплазме (рис. 3). К стадии бластоцисты большинство рецепторов детектировалось в основном в клетках трофобласта, тогда как в клетках ВКМ сигнал был слабый, либо вовсе отсутствовал (за исключением рецептора 5-НТ_{5А}, иммунореактивность которого в клетках ВКМ была выше, чем в клетках трофобласта).

Иммуногистохимический анализ, проведенный с использованием специфических антител против серотонина, транспортера VMAT2 и рецепторов 5-НТ_{1Д}, 5-НТ_{1В}, 5-НТ_{2В}, 5-НТ_{5А} и 5-НТ₇, выявил присутствие этих белков в оогенезе и раннем эмбриогенезе мыши. Высокий уровень иммунореактивности, различия и изменения в

их локализации в процессе развития могут указывать на функциональную активность этих рецепторов.

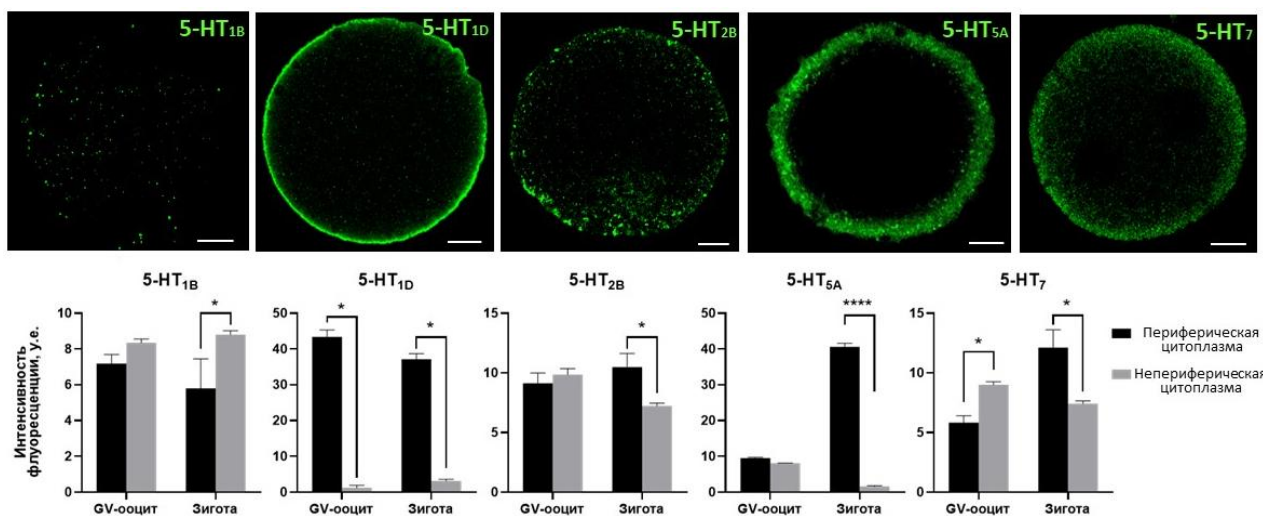


Рисунок 3. Распределение серотониновых рецепторов в ооцитах и зиготах. Масштаб: 10 мкм. Звездочками обозначены значимые различия между кортикальными и некортикальным слоями клеток с использованием двухфакторного дисперсионного анализа, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$.

Анализ функциональной активности везикулярного транспорта серотонина в ооцитах. Для оценки функциональной активности везикулярного транспортера в созревающих ооцитах была проведена серия экспериментов с использованием ингибитора VMAT2 резерпина. Количественный анализ, проведенный методом ВЭЖХ, выявил снижение содержания серотонина не только в сыворотке крови, но и в яичниках самок (на 20% по сравнению с контролем), получавших резерпин. Иммуногистохимическое окрашивание ткани яичников также продемонстрировало выраженное падение уровня серотонина в ооцитах растущих фолликулов.

Снижение иммунореактивности серотонина регистрировалось как в незрелых GV-ооцитах (Рис. 4А-В), так и в зрелых МП-ооцитах, полученных после недельной экспозиции резерпином (Рис. 4Г-Е). Полученные данные свидетельствуют о наличии в ооцитах специализированного везикулярного компартмента, в котором происходит аккумуляция серотонина, опосредованная функциональной активностью белка VMAT2.

Активность моноаминоксидазы А в раннем развитии. На стадии зиготы MAO-A визуализируется в виде мелкодисперсных точечных структур, диффузно распределенных по всей цитоплазме. К стадии морулы фермент сохраняет цитоплазматическое распределение. При этом наблюдается формирование белковых скоплений. На стадии бластоцисты MAO-A выявляется в виде скоплений как в клетках ВКМ, так и в клетках трофобласта.

Для определения способности зародышей накапливать серотонин в условиях фармакологической блокады фермента проводилось их культивирование *in vitro* от стадии зиготы до стадии бластоцисты в присутствии неселективного ИМАО паргилина (Рис. 5). Полученные данные продемонстрировали, что на стадии бластоцисты выраженное накопление серотонина в клетках происходит исключительно при инкубации эмбрионов в среде, содержащей как экзогенный серотонин, так и паргилин (Рис. 5В). Таким образом, в клетках бластоцисты осуществляется не только активный захват серотонина из окружающего пространства посредством мембранного транспортера SERT, но и его интенсивная ферментативная деградация при участии МАО-А.

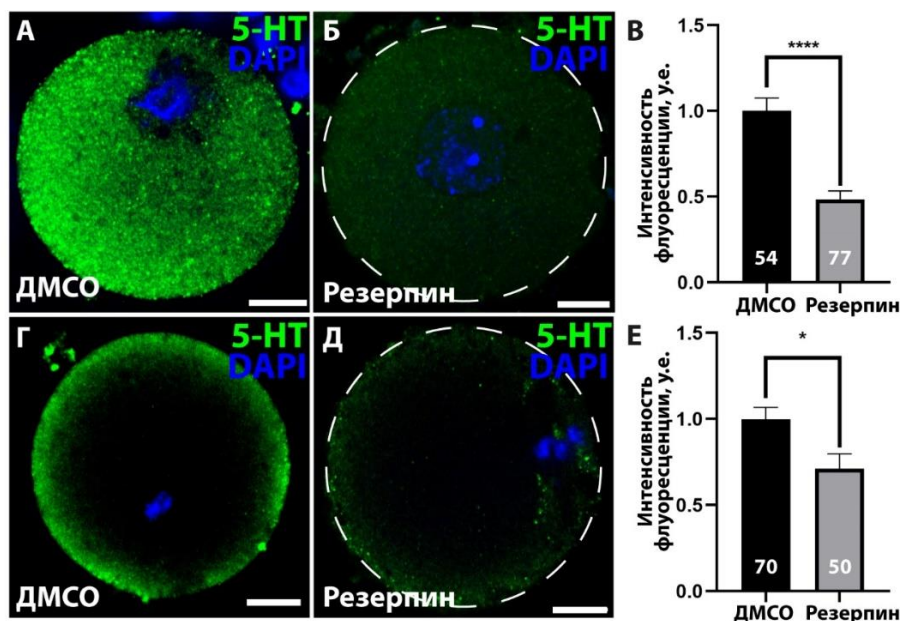


Рисунок 4. Влияние семидневного введения резерпина на содержание серотонина в ооцитах. А-Б – иммуногистохимическое выявление серотонина в GV-ооцитах контрольной (ДМСО) и экспериментальной (резерпин) групп. В – количественная оценка иммунореактивности 5-НТ в GV-ооцитах сравниваемых групп. Г-Д – иммуногистохимическое выявление серотонина в МII-ооцитах контрольной (ДМСО) и экспериментальной (резерпин) групп. Пунктирная линия обозначает границы ооцита. Е – количественная оценка иммунореактивности 5-НТ в МII-ооцитах сравниваемых групп. Данные нормализованы относительно группы ДМСО (среднее значение принято за 1). Звездочками отмечены статистически значимые различия между группами (критерий Манна-Уитни, * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$). Масштаб: 10 мкм.

Выраженная каталитическая активность МАО-А начинает проявляться на более поздних этапах дробления: аналогичный эксперимент, завершённый на стадии двух бластомеров, показал, что при совместном воздействии серотонина и паргилина происходит максимальное накопление 5-НТ, а при инкубации только с серотонином накопление также регистрируется, однако значительно менее выраженное. В то же время, при инкубации исключительно с паргилином или в стандартной культуральной

среде внутриклеточное накопление серотонина практически отсутствовало (Рис. 5Д-Ж). На основании этих данных можно заключить, что механизмы захвата и деградации серотонина функционируют уже на начальных этапах дробления, однако ферментативная активность МАО-А в данный период менее выражена по сравнению со стадией бластоцисты.

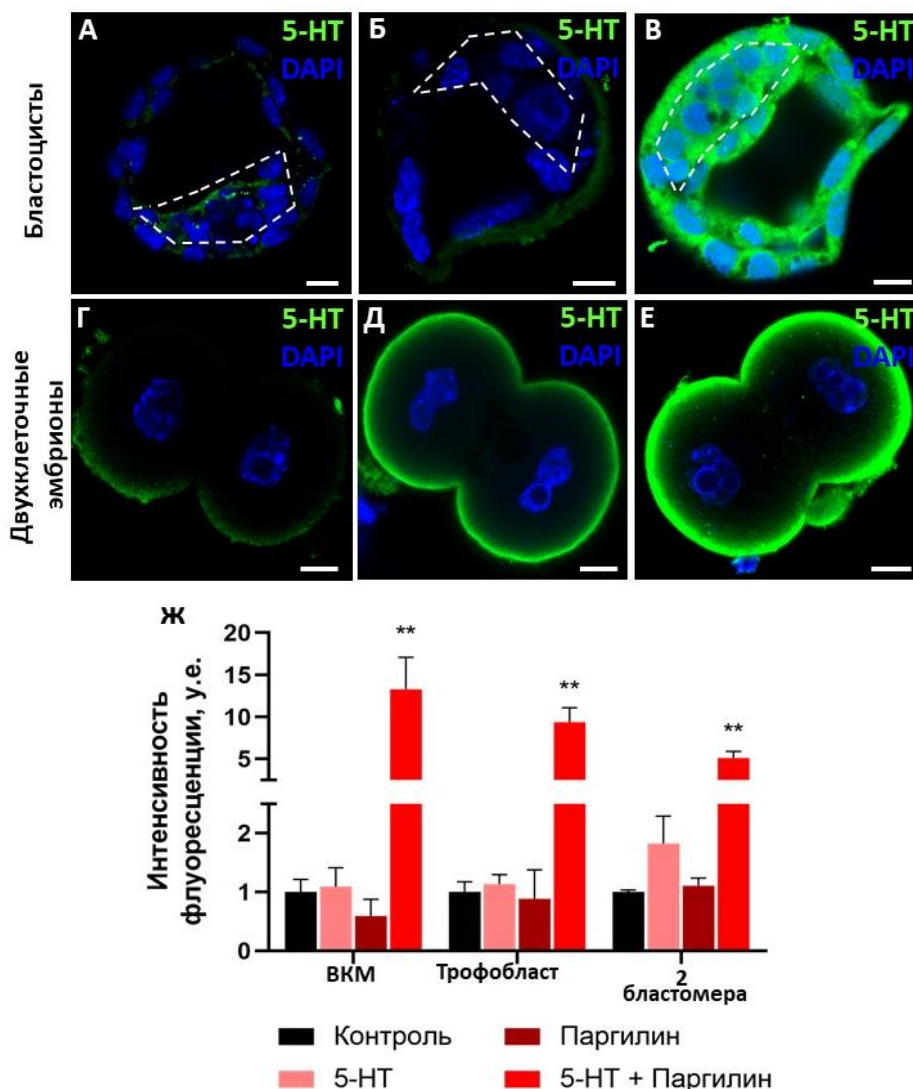


Рисунок 5. Оценка активности моноаминоксидазы А на стадиях бластоцисты и двухклеточного эмбриона. А-В, Г-Е – иммуногистохимическое выявление серотонина в бластоцистах и двухклеточных эмбрионах экспериментальных групп. А, Г – Контроль; Б, Д – 5-НТ; В, Е – 5-НТ и паргидин. Пунктирная линия обозначает зону ВКМ. Масштаб: 10 мкм. Ж – Количественная оценка иммунореактивности 5-НТ в бластоцистах и двухклеточных эмбрионах (по 13 экспериментальных повторностей). Звездочками отмечены статистически значимые различия (критерий Фридмана с апостериорным тестом Данна для множественных сравнений, ** $p < 0,01$).

Влияние повышенного уровня цитоплазматического серотонина на экспрессию маркеров плюрипотентности, спецификации клеточных линий бластоцисты, генерацию АФК и активность митохондрий. Для анализа

последствий накопления серотонина в клетках ранних эмбрионов методом количественной ПЦР в реальном времени оценивалось качество бластоцист по изменению уровня экспрессии маркеров плюрипотентности и спецификации клеточных линий бластоцисты. Полученные результаты продемонстрировали, что на фоне повышения внутриклеточного уровня серотонина (как при совместной инкубации эмбрионов в серотонине и паргилине, так и при пероральном приеме флуоксетина матерью) экспрессия генов *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Cdx2* и *Gata6* статистически значимо не изменяется.

Дополнительно исследовалось потенциальное влияние повышенного уровня внутриклеточного серотонина на функциональную активность митохондрий и уровень генерации активных форм кислорода. Прижизненное окрашивание эмбрионов флуоресцентным зондом Mito Orange (Рис. 6А-В), а также красителем 6-Carboxy-H2DCFDA (Рис. 6Г-Е), показало, что активность митохондрий и внутриклеточное содержание АФК значимо не изменяются при повышении концентрации 5-НТ в клетках.

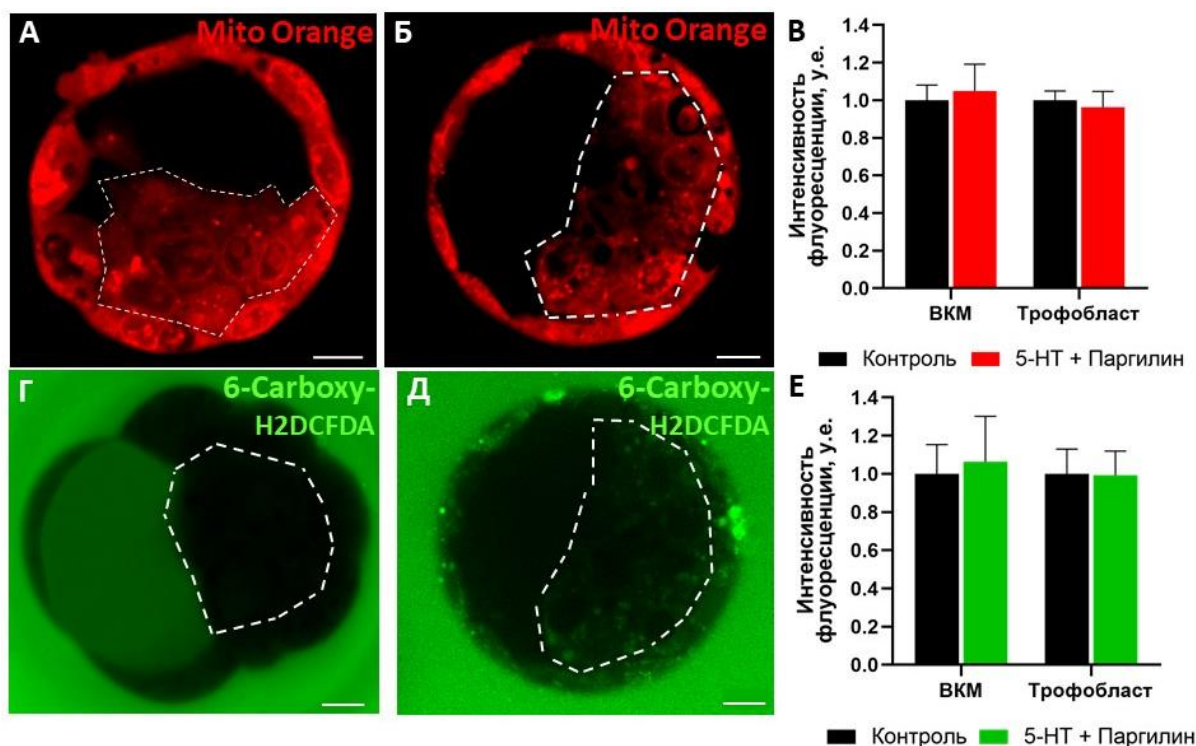


Рисунок 6. Оценка активности митохондрий и накопления активных форм кислорода (АФК) в бластоцистах с повышенным содержанием внутриклеточного серотонина. А-Б – визуализация митохондрий в эмбрионах контрольной группы (А) и после инкубации с серотонином и паргиллином (Б). В – количественное сравнение активности митохондрий в исследуемых группах (13 экспериментальных повторностей). Г-Д – визуализация АФК в эмбрионах контрольной группы (Г) и после инкубации с серотонином и паргиллином (Д). Е – количественное сравнение уровня накопления АФК в исследуемых группах (13 экспериментальных повторностей). Пунктирная линия обозначает зону ВКМ. Масштаб: 10 мкм. Статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни не обнаружено.

Следующей задачей стала оценка потенций эмбрионов с высоким уровнем внутриклеточного серотонина к дальнейшему развитию. В связи с этим была воспроизведена простейшая модель имплантации *in vitro* для анализа способности бластоцист к адгезии на пластике и последующему распластыванию. Ежедневный мониторинг, проводившийся до стадии, эквивалентной 8,5 дням эмбрионального развития (8,5 dpc), подтвердил отсутствие значимых различий в процессе имплантации *in vitro* между контрольной и экспериментальной группами (Рис. 7). Не было выявлено морфологических отличий между распластавшимися бластоцистами, а также расхождений в доле и скорости их прикрепления к субстрату или площади конечного распластывания.

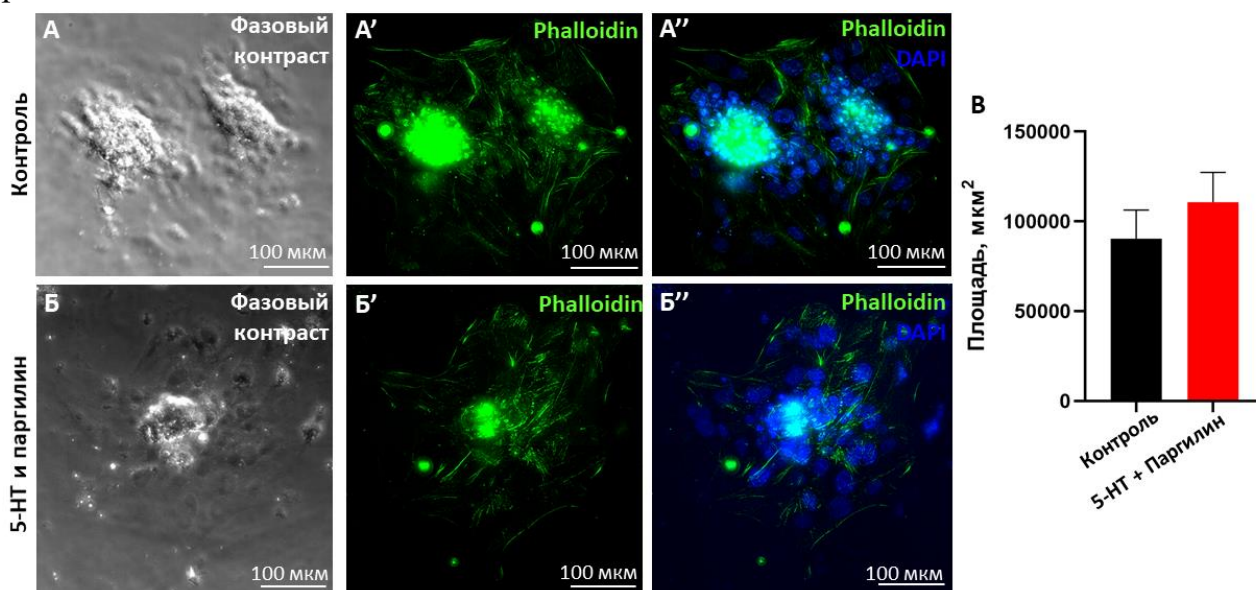


Рисунок 7. Анализ способности бластоцист с повышенным содержанием внутриклеточного серотонина к имплантации на модели *in vitro*. А-Б – распластавшиеся *in vitro* эмбрионы на сроке, эквивалентном 8,5 дням эмбрионального развития. В – Количественный анализ площади распластавшихся бластоцист (15 экспериментальных повторностей). Статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни не обнаружено.

Таким образом, полученные данные свидетельствует о том, что повышенное содержание внутриклеточного серотонина не оказывает критического влияния на процессы доимплантационного развития. Полученные данные расширяют представления о регуляции эмбрионального клеточного гомеостаза.

Влияние повышенной концентрации внутриклеточного серотонина на серотонилирование гистона H3. Для оценки возможности долгосрочных последствий повышения внутриклеточного уровня 5-НТ для развивающегося эмбриона была проведена оценка содержания серотонилированного гистона H3 в эмбрионах при их инкубации с 5-НТ и паргилином. С использованием специфических антител против серотонилированного гистона H3 было установлено, что повышение внутриклеточной

концентрации 5-НТ приводит к усилению серотонилирования гистона H3, выявляемому как в ядре, так и в цитоплазме клеток бластоцисты (Рис. 8). При этом интенсивность сигнала возрастает в клетках как ВКМ, так и трофобласта: в ядрах на 19,6 % и на 26,5 % соответственно; в цитоплазме на 14,3 % и на 18,1 % соответственно. В то время как сигнал в области ядра соответствует каноническим эпигенетическим модификациям хроматина, цитоплазматический сигнал, по-видимому, отражает серотонилирование пула свободных растворимых гистонов, характерного для быстро делящихся клеток ранних эмбрионов, либо цитозольных белковых предшественников гистона H3, выступающих мишенями для трансклутаминаз.

Для подтверждения ферментативной природы наблюдаемой модификации эмбрионы были обработаны цистамином, ингибитором трансклутаминаз широкого спектра действия. Фармакологическая блокада подавила индуцированное 5-НТ усиление сигнала H3Q5ser. Полученные данные свидетельствуют о том, что избыток внутриклеточного 5-НТ активно связывается с гистонами H3 посредством трансклутаминазозависимого механизма.

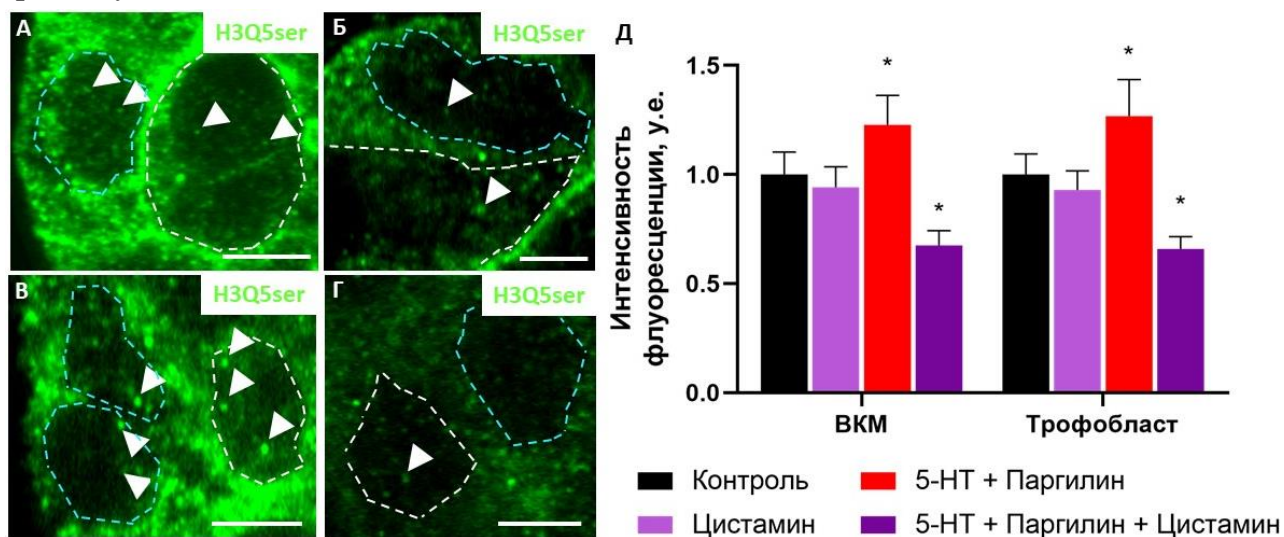


Рисунок 8. Оценка уровня серотонилирования гистона H3 в клетках бластоцисты. А-Г – иммуногистохимическое маркирование серотонилированного гистона H3 (H3Q5ser) в бластоцистах экспериментальных групп. А – Контроль. Б – Цистамин. В – Серотонин и паргилин. Г – Серотонин, паргилин и цистамин. Голубым пунктиром обозначены ядра клеток трофэктодермы, белым пунктиром – ядра клеток ВКМ, белые стрелки указывают на иммунопозитивный сигнал. Масштаб: 5 мкм. Д – Сравнительный анализ уровня серотонилирования гистона H3 в ядрах клеток четырех экспериментальных групп (18 экспериментальных повторностей); звездочками отмечены значимые различия по критерию Фридмана с апостериорным тестом Данна, * $p < 0,05$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе проведено комплексное исследование пространственно-временной организации и функциональной активности серотонинергической системы в оогенезе и на стадиях доимплантационного развития мыши. Данные

транскриптомного и иммуноцитохимического анализов указывают на то, что ранний эмбрион представляет собой автономную систему, способную не только к захвату серотонина из окружающей среды, но и к эндогенному синтезу серотонина с участием фермента DDC. Пространственная организация компонентов этой системы имеет специфический характер: везикулярный транспортер VMAT2, а также рецепторы 5-HT_{1D}, 5-HT_{5A} и 5-HT₇ концентрируются преимущественно в периферической зоне клеток, что может свидетельствовать об их участии в межклеточных взаимодействиях на ранних этапах онтогенеза.

Полученные результаты расширяют представления об адаптивных возможностях доимплантационного эмбриона в регуляции собственного метаболического гомеостаза. Защита от избытка моноаминов обеспечивается активацией их деградации с помощью MAO-A, активность которой возрастает к стадии бластоцисты. Одновременно с этим, при снижении доступности материнского 5-HT эмбрион способен компенсаторно усиливать его эндогенный биосинтез.

Показано, что экспериментально вызванное повышение внутриклеточного уровня 5-HT не приводит к нарушению базовых параметров жизнеспособности эмбриона. Показатели митохондриальной активности, уровень генерации АФК, успешность имплантации в модели *in vitro*, а также профили экспрессии ключевых маркеров плюрипотентности и ранней клеточной специализации остаются стабильными.

Значимым итогом работы стало описание способности эмбриона реагировать на изменение содержания 5-HT путем серотонилирования гистона H3, осуществляемого ферментом трансклутаминазой. Изменения уровня серотонина, в том числе на фоне фармакологического воздействия, могут, благодаря этому механизму, проявляться эпигенетически. Такие модификации, не вызывая эмбриотоксического эффекта на доимплантационных этапах, потенциально способны вызывать отсроченные эффекты в дальнейшем развитии.

ВЫВОДЫ

1. Эндогенный синтез из предшественника 5-HTP, опосредованный активностью фермента декарбоксилазы ароматических L-аминокислот, функционирует как источник серотонина в доимплантационных эмбрионах мыши. При ограничении поступления экзогенного серотонина выявлено усиление синтеза, сопровождающееся тенденцией к повышению транскрипции гена *Ddc*.
2. В период доимплантационного развития выявлена транскрипция и трансляция спектра рецепторов серотонина: 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{5A} и 5-HT₇, пространственная локализация которых характеризуется специфичностью и динамикой. К стадии зиготы распределение рецепторов 5-HT_{1D}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{5A} и 5-HT₇ приобретает кортикальный (периферический) паттерн.
3. В оогенезе и доимплантационном развитии выявлена экспрессия везикулярного транспортера моноаминов VMAT2, локализующегося преимущественно в

кортикальной (периферической) зоне клеток. Его функциональная активность обеспечивает процесс накопления серотонина в компактных структурах в периферической зоне ооцита.

4. Фермент деградации серотонина моноаминоксидаза А (МАО-А) экспрессируется и выявляется на белковом уровне начиная со стадии зиготы. Его функциональная активность выявляется со стадии дробления и усиливается к стадии бластоцисты.

5. Экспериментальное повышение уровня внутриклеточного серотонина не оказывает негативного влияния на показатели жизнеспособности эмбрионов. Активность митохондрий, уровень генерации активных форм кислорода, способность к адгезии и имплантации в модели *in vitro*, а также экспрессия маркеров плюрипотентности (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog*) и спецификации клеточных линий (*Cdx2*, *Gata6*) сохраняются на уровне контрольных значений.

6. Повышенная концентрация внутриклеточного серотонина в ранних эмбрионах оказывает влияние на процессы эпигенетической модификации хроматина, индуцируя достоверное усиление серотонилирования гистона H3, опосредованное активностью трансклутаминаз.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова по специальности и отрасли наук:

1. **Фролова В.С.**, Иванова А.Д., Конорова М.С., Шмуклер Ю.Б., Никишин Д.А. Пространственная организация компонентов серотонинергической системы в раннем развитии мыши // Биологические мембраны. – 2023. – Т. 40. – №. 6. – С. 456-462. – EDN GLJNWN. Импакт-фактор 0,391 (РИНЦ) (0,670/0,268)*
2. **Frolova V.S.**, Nikishina Y.O., Shmukler Y.B., Nikishin D.A. Serotonin Signaling in Mouse Preimplantation Development: Insights from Transcriptomic and Structural-Functional Analyses // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – vol. 25. – №. 23. – P. 12954. – EDN RDKHZU. Импакт-фактор 1,273 (Scopus) (2,079/1,455)*
3. Шмуклер Ю.Б., Алешина Н.М., Никишина Ю.О., **Фролова В.С.**, Никишин Д.А. Все трансмиттеры в одной яйцеклетке: транскриптомный анализ эмбриональных трансмиттерных систем // Онтогенез. – 2025. – Т. 56. – №. 1. – С. 3-13. – EDN KVHGQD. Импакт-фактор 0,500 (РИНЦ) (1,19/0,238)*
4. **Frolova V.S.**, Nikishin D.A. Compensatory Serotonin Synthesis and Histone H3 Serotonylation in Response to MAO-A Blockade and Maternal SSRI Exposure // Journal of Developmental Biology. – 2026. – vol. 14. – №. 2. – P. 15. – EDN IBMBQJ. Импакт-фактор 0,854 (Scopus) (1,964/1,375)*

В скобках приведён объём публикации в условных печатных листах и вклада автора в условных печатных листах.