

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова  
Биологический факультет**

---

---

**На правах рукописи**

**ФРОЛОВА ВЕРОНИКА СЕРГЕЕВНА**

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ  
СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В ООЦИТАХ И РАННИХ  
ЭМБРИОНАХ МЫШИ**

**1.5.23 – биология развития, эмбриология**

**Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:  
кандидат биологических наук  
Денис Александрович Никишин**

**Москва  
2026**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ</b> .....	<b>5</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	<b>8</b>
<b>Актуальность исследования и современное состояние проблемы</b> .....	<b>8</b>
<b>Цель и задачи работы</b> .....	<b>11</b>
<b>Научная новизна полученных результатов</b> .....	<b>12</b>
<b>Теоретическая и практическая значимость</b> .....	<b>13</b>
<b>Положения, выносимые на защиту</b> .....	<b>15</b>
<b>Степень достоверности и апробация результатов</b> .....	<b>16</b>
<b>Личное участие автора</b> .....	<b>17</b>
<b>Публикации</b> .....	<b>17</b>
<b>Финансовая поддержка</b> .....	<b>18</b>
<b>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	<b>19</b>
<b>Общие сведения о нейротрансмиттерах</b> .....	<b>19</b>
<b>Серотонин и серотонинергическая система</b> .....	<b>20</b>
Синтез и метаболизм серотонина.....	21
Рецепторы и транспортеры серотонина.....	22
<b>Физиологические функции серотонина в ЦНС и периферических тканях</b> .....	<b>24</b>
<b>Серотонин в процессах дифференцировки и онкогенеза клеток</b> .....	<b>26</b>
<b>Серотонин в физиологии женской репродуктивной системы</b> .....	<b>31</b>
<b>Серотонинергическая система в эмбриональном развитии животных</b> .....	<b>34</b>
Серотонинергическая система в оогенезе и созревании ооцитов.....	35
Серотонинергическая система в процессах дробления и межбластомерного взаимодействия.....	36
Серотонинергическая система в бластоцисте млекопитающих.....	39
Серотонинергическая система в процессах гаструляции, морфогенеза и органогенеза.....	41
<b>МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	<b>46</b>
<b>Реактивы</b> .....	<b>46</b>

<b>Оборудование.....</b>	<b>46</b>
<b>Животные и экспериментальные процедуры.....</b>	<b>47</b>
Гормональная стимуляция суперовуляции и получение ооцитов и эмбрионов.....	47
Блокада везикулярного транспорта серотонина .....	48
Блокада обратного захвата серотонина .....	50
Блокада фермента деградации серотонина.....	51
Оценка эндогенного синтеза серотонина на доимплантационных стадиях.....	53
Оценка опосредованного трансклутаминазами механизма серотонилирования на доимплантационных стадиях .....	54
Моделирование имплантации эмбрионов <i>in vitro</i> .....	56
<b>Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени.....</b>	<b>56</b>
<b>Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).....</b>	<b>58</b>
<b>Вестерн-блоттинг .....</b>	<b>60</b>
<b>Иммуногистохимия .....</b>	<b>61</b>
<b>Прижизненная визуализация функциональной активности митохондрий и уровня генерации активных форм кислорода (АФК).....</b>	<b>63</b>
<b>Обработка и анализ изображений .....</b>	<b>64</b>
<b>Статистический анализ .....</b>	<b>66</b>
<b>РЕЗУЛЬТАТЫ .....</b>	<b>68</b>
<b>Источники серотонина в ранних эмбрионах.....</b>	<b>68</b>
<b>Анализ компонентного состава серотонинергической сигнальной системы в раннем эмбриогенезе.....</b>	<b>71</b>
<b>Анализ функциональной активности везикулярного транспорта серотонина в ооцитах.....</b>	<b>81</b>
<b>Выявление и оценка активности моноаминоксидазы в раннем эмбриональном развитии .....</b>	<b>85</b>
<b>Влияние повышенного уровня цитоплазматического серотонина на экспрессию маркеров плюрипотентности, спецификации клеточных линий бластоцисты, генерацию АФК и активность митохондрий.....</b>	<b>88</b>

Влияние повышенной концентрации внутриклеточного серотонина на серотонилирование гистона H3 .....	92
<b>ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>95</b>
Состав серотонинергической системы в доимплантационном развитии .....	95
Роль моноаминоксидазы А в раннем эмбриональном развитии .....	100
Источники серотонина и его влияние на жизнеспособность эмбрионов.....	102
Серотонилирование гистона H3 как предпосылка возможных отсроченных эффектов эпигенетической регуляции .....	104
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>106</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>108</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>110</b>
<b>БЛАГОДАРНОСТИ .....</b>	<b>143</b>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВКМ – внутренняя клеточная масса

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГСЖК – гонадотропин сыворотки жеребой кобылы

ДМСО – диметилсульфоксид

мкм – микрометр

мкМ – микромоль

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

СИОЗС – селективные ингибиторы обратного захвата серотонина

ХГЧ – хорионический гонадотропин человека

ЦНС – центральная нервная система

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

5-НИАА – 5-гидроксииндолуксусная кислота

5-НТ – 5-гидрокситриптамиин, серотонин

5-НТР – 5-гидрокситриптофан

АААD (DDC)– декарбоксилаза ароматических L-аминокислот

АНР – Aryl hydrocarbon receptor, рецептор ароматических углеводородов

Акт – протеинкиназа В

АМРК – AMP activated protein kinase, АМФ-активируемая протеинкиназа

ВLC – B-Lymphocyte Chemoattractant, хемоаттрактант В-лимфоцитов

ВТИС – brain tumor initiating cells, клетки, провоцирующие опухоли головного мозга

сАМР (цАМФ) – циклический аденозинмонофосфат

DAG – диацилглицерол

dpc – days post-coitum, дней после оплодотворения

eNOS – nitric oxide synthase, эндотелиальная синтаза оксида азота

ERK – extracellular signal-regulated kinase, киназа, регулируемая внеклеточными сигналами

FOXO – Forkhead Box, семейство факторов транскрипции

GDF9 – Growth Differentiation Factor, Фактор роста и дифференцировки

GDNF – Glial cell line-derived neurotrophic factor, нейротрофический фактор, полученный из глиальных клеток

GPCR – рецептор, сопряженный с G-белком

GV – geminal vesicle, стадия созревания ооцита, на которой наблюдается зародышевый пузырек

HTR – рецептор к серотонину

IL-1 $\beta$  – interleukin-1 $\beta$ , интерлейкин-1 $\beta$

JAK – Janus kinase

MAO-A – моноаминоксидаза А

МАРК – mitogen-activated protein kinase, митоген-активируемая протеинкиназа

МЕК – Mitogen-activated protein kinase kinase, митоген-активируемая протеинкиназа киназа

МII-ооцит – стадия созревания ооцита, на которой он проходит метафазу второго деления мейоза

ММР – матриксная металлопротеиназа

mTOR – mammalian target of rapamycin, мишень рапамицина у млекопитающих

Nur77 (TR3) – ядерный рецептор 4A1

PBS – фосфатно-солевой буфер

PFA – параформальдегид

PI<sub>3</sub>K – фосфоинозитид-3-киназа

PIP<sub>2</sub> – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат

PIP<sub>3</sub> – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат

PKA – протеинкиназа A

PKC – протеинкиназа C

PLC – фосфолипаза C

Rac – Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, внутриклеточный белок из семейства Ras

Ras – Rat sarcoma virus, семейство малых ГТФаз

SERT (SLC6A4) – трансмембранный транспортер серотонина

STAT3 - signal transducer and activator of transcription 3, сигнальный белок и активатор транскрипции 3

TG2 – трансглутаминаза 2

TNF- $\alpha$  – tumor necrosis factor-  $\alpha$ , фактор некроза опухоли  $\alpha$

TRH, Trh – триптофангидроксилаза

VEGF – vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов

VEGFR – рецептор, активируемый VEGF

VMAT – везикулярный транспортер моноаминов

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность исследования и современное состояние проблемы**

Серотонин (5-НТ) представляет собой многофункциональную сигнальную молекулу, первоначально описанную как сосудосуживающий фактор кишечника (Rapport et al., 1948). Несмотря на то, что после выявления серотонина в ткани головного мозга, подавляющее большинство исследований было сфокусировано на его нейромедиаторных свойствах, что является лишь одним из аспектов его биологической роли (Folk, Long, 1988). 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 (Walther et al., 2003). Важным этапом в понимании биологической роли серотонина стало открытие Г.А. Бузниковым в начале 1960-х годов его влияния на процессы раннего эмбрионального развития (Buznikov et al., 1964).

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 (Buznikov et al., 1970; Nikishin et al., 2017; Shmukler, Nikishin, 2022). Присутствие и функциональная активность серотонина, специфических белков его транспорта и рецепции продемонстрированы на ранних стадиях развития у широкого спектра видов беспозвоночных и позвоночных животных, включая млекопитающих (Krantic et al., 1991; Cerdà et al., 1998; Amireault, Dube, 2005b; Sheng et al., 2005; Basu et al., 2008; Lister et al., 2009; Wang, He, 2014).

Специфической особенностью развития млекопитающих является то, что эмбриогенез протекает в материнском организме. Серотонин способен транспортироваться из материнского кровотока в ткани яичника, накапливаясь как в ооцитах, так и в клетках гранулезы (Pl'kova et al., 2004). Серотонин оказывает стимулирующее воздействие на активность

фолликулярных клеток, индуцирует повышение концентрации вторичных мессенджеров в клетках кумулюса (Čikos et al., 2011). Это опосредованно влияет на процессы роста и созревания ооцитов, в том числе селекцию фолликулов в яичниках (Alyoshina et al., 2022, 2023). На последующих этапах развития серотонин выступает регулятором клеточного цикла, процессов пролиферации и апоптоза в эмбрионах (Amireault, Dubé, 2005a; Shmukler, Nikishin, 2012; Shmukler et al., 2022).

Несмотря на обширный массив накопленных данных, в настоящее время отсутствует целостное понимание структурно-функциональной организации серотонинергической системы в раннем эмбриогенезе. Остаются не до конца изученными вопросы внутриклеточной структурной организации серотониновой системы, регуляции механизмов его эндогенного синтеза, а также организации функционирования спектра серотониновых рецепторов, вовлеченных в регуляцию оо- и эмбриогенеза. Требуется существенного исследования механизма участия серотонина в процессах межбластомерных взаимодействий, а также воздействия изменения его внутриклеточной концентрации на клеточный метаболизм, процессы развития и клеточной дифференцировки.

В связи с вышесказанным, данное исследование направлено на комплексное морфофункциональное исследование компонентного состава серотонинергической системы в клетках эмбрионов мыши на доимплантационных стадиях развития. Основное внимание в работе уделено анализу профиля экспрессии ключевых белковых компонентов, обеспечивающих сигнальную функцию серотонина, включая его рецепторы и транспортеры. Молекулярно-биологические данные об экспрессии сопоставлялись с результатами пространственной визуализации и анализа функциональной активности компонентов серотонинергической системы.

Отдельное внимание в работе уделено везикулярному транспортеру моноаминов VMAT2, выступающему важным звеном серотонинергической системы. В современной литературе достаточно подробно охарактеризован

механизм накопления серотонина во внутриклеточных везикулах с участием VMAT2 в дифференцированных тканях (Kayabaşı et al., 2021; Baronio et al., 2022; Wang et al., 2024), однако его роль в процессах доимплантационного развития остается неисследованной. Для проверки гипотезы о межклеточной сигнальной функции эмбрионального серотонина необходима оценка функциональной активности VMAT2 с применением селективных фармакологических ингибиторов. В качестве специфического инструмента в исследовании использован резерпин – индольный алкалоид, блокирующий активность транспортера VMAT2 и препятствующий везикулярному накоплению моноаминов (Pidathala et al., 2023).

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.

Клиническая и практическая актуальность исследования связана с необходимостью анализа эффектов, которые вызываются колебаниями уровня серотонина в микроокружении развивающегося эмбриона. Важность данного направления возрастает на фоне повсеместного увеличения широты применения антидепрессантов и других фармакологических препаратов, модулирующих концентрацию биогенных аминов в организме. Вопрос безопасности применения лекарственных средств данной группы женщинами репродуктивного возраста, в том числе при планировании беременности, остается дискуссионным и требует проведения углубленных экспериментальных исследований. В рамках настоящей работы проведена оценка эффектов препаратов двух различных фармакологических групп:

селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (СИОЗС) на примере флуоксетина и ингибиторов моноаминоксидазы (ИМАО) на примере паргилина. Избранный методологический подход позволил смоделировать условия как дефицита, так и избыточного накопления серотонина в среде, окружающей развивающийся эмбрион, и оценить биологические последствия этих сдвигов.

### **Цель и задачи работы**

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

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить вклад эндогенного синтеза как возможного источника серотонина в эмбрионах мышцы 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.

б. Выявить влияние повышенной концентрации внутриклеточного серотонина в ранних эмбрионах на процессы эпигенетической модификации хроматина путем серотонилирования.

### **Научная новизна полученных результатов**

В представленной диссертационной 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 (5-НТ<sub>1В</sub>, 5-НТ<sub>1D</sub>, 5-НТ<sub>2В</sub>, 5-НТ<sub>5А</sub> и 5-НТ<sub>7</sub>) и продемонстрирована их специфическая локализация, кортикальный (периферический) характер которой указывает на их участие в межклеточной сигнализации с самых ранних этапов эмбриогенеза.

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-НТР 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: доказано, что избыток нейромедиатора не нарушает базовые параметры жизнедеятельности эмбриона, такие как активность митохондрий, уровень генерации активных форм кислорода и экспрессия ключевых генов плюрипотентности (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog*) и клеточной спецификации (*Cdx2*, *Gata6*).

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 трансклутаминазой ковалентное присоединение серотонина к гистону H3, что выступает в качестве молекулярного механизма эпигенетического «мечения», способного проявляться отсроченно в ходе дальнейшего развития.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Теоретическая значимость работы заключается в существенном расширении фундаментальных представлений о неклассических (несинаптических) 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 трансклутаминаза-опосредованного

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 (MAO-A) 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 (в частности, эффекты флуоксетина) служат фундаментальной базой для оценки репродуктивной безопасности антидепрессантов группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (СИОЗС) и ингибиторов MAO. 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.

## Положения, выносимые на защиту

1. В ооцитах и доимплантационных эмбрионах мыши экспрессируется и функционирует комплексная серотонинергическая система, которая включает набор специфических рецепторов (5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>5A</sub> и 5-HT<sub>7</sub>), 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<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>5A</sub> и 5-HT<sub>7</sub>) 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

трансглутаминазами механизм эпигенетической модуляции хроматина – значимое усиление серотонилирования гистона H3.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Степень достоверности полученных результатов обеспечивается обоснованным планированием и строгим дизайном экспериментов, а также комплексным использованием современных высокотехнологичных молекулярно-биологических, иммуноцитохимических и физиологических методов, адекватных поставленным цели и задачам исследования. 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 профильных научных форумах различного уровня, включая: Юбилейную научную конференцию «Николай Константинович Кольцов и биология XXI века» (Москва, 2022); XXX Международную научную конференцию студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2023» (Москва, 2023); 12-ю и 13-ю Международные конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2023, 2025); Всероссийскую научную конференцию с международным участием, посвященную юбилею академика Б.Л. Астаурова «Генетика и индивидуальное развитие» (Москва, 2024); а также на XI Всероссийской конференции с международным участием «Физиология и биохимия медиаторных процессов» (Москва, 2025).

## **Личное участие 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 ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» и в группе эмбриофизиологии лаборатории проблем регенерации ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Автором самостоятельно проведен критический анализ отечественной и зарубежной литературы, разработан дизайн исследований и полностью выполнен весь заявленный объем экспериментов. Соискателем лично осуществлены статистическая обработка, систематизация и интерпретация полученных данных, на основе которых сформулированы научные положения и выводы диссертации. Подготовка научных публикаций по теме работы, написание текста диссертации и автореферата, а также публичная апробация результатов на научно-практических конференциях осуществлялись при непосредственном и определяющем участии автора.

## **Публикации**

По теме диссертации опубликованы четыре статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и RSCI (РИНЦ):

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. ИФ (РИНЦ) = 0,391 (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. – V. 25. – №. 23. – P. 12954. IF (Scopus) = 1,273 (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. – Т. 56. – №. 1. – С. 3-13. ИФ (WoS) = 0,744 (1,19/0,238)\*

4. **Frolova V.S.**, Nikishin D.A. Compensatory Serotonin Synthesis and Histone H3 Seronylation in Response to MAO-A Blockade and Maternal SSRI Exposure // Journal of Developmental Biology. – 2026. – V. 14. – №. 2. – 15. IF (Scopus) = 0,854 (1,964/1,375)\*

\* В скобках приведён объём публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах.

#### **Финансовая поддержка**

Диссертационное исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-74-10009), Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-00303), а также в рамках гранта поддержки научных школ Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (проект № 23-Ш04-20).

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### Общие сведения о нейротрансмиттерах

Нейротрансмиттеры (нейромедиаторы, трансмиттеры) представляют собой биологически активные вещества, играющие ключевую роль в направленной передаче электрохимического импульса между нейронами, а также от нервных окончаний к клеткам мышечной или железистой ткани (Lodish et al., 2000). Исторически первым открытым нейромедиатором стал ацетилхолин: в 1926 году Отто Леви экспериментально доказал его участие в химической передаче сигнала от блуждающего нерва, что замедляет сердечный ритм (Hutman, 2005). В последующие десятилетия было установлено, что в процессах синаптической передачи задействовано более сотни химических соединений и значительно большее количество специфических мембранных рецепторов.

В биохимическом отношении среди медиаторов выделяют ряд аминокислот, гистамин, индоламины и катехоламины, представляющие собой эволюционно консервативные молекулы, выполняющие функции модуляторов долговременных морфофункциональных изменений в клетках (Torres et al., 2003). Регуляторное действие данных соединений продемонстрировано как для организмов, лишенных нервной системы, включая одноклеточных эукариот, так и для высших многоклеточных животных со сложно организованной нервной системой (Yamamoto, Vernier, 2011; Xing, Nuttner, 2020).

Эволюционно первичной функцией медиаторных молекул считается внутриклеточная сигнализация, а также реализация эффектов, аналогичных действию факторов роста и гормонов (Torres et al., 2003; Shin et al., 2019). На более поздних этапах филогенеза трансмиттеры приобрели функцию межклеточных мессенджеров, воздействующих на мембранные рецепторы, что в конечном итоге привело к формированию специализированной передающей системы между нервными клетками в пределах синаптической щели (Eroglu, Barres, 2015). В классической модели экзоцитоз

нейротрансмиттеров инициируется потенциалом действия, который вызывает открытие потенциалзависимых кальциевых каналов и приток ионов  $Ca^{2+}$  внутрь пресинаптической терминали (Shin et al., 2019). Высвобожденные молекулы медиатора связываются со специфическими рецепторами на постсинаптической мембране, генерируя физиологический ответ клетки-мишени (Eroglu, Barres, 2015; Shin et al., 2019). При этом ауторецепторы, локализованные на пресинаптической мембране, обеспечивают механизм отрицательной обратной связи, регулируя процесс последующего высвобождения нейромедиатора (Shin et al., 2019).

Элиминация нейротрансмиттеров из синаптической щели осуществляется посредством их активного захвата специфическими транспортерами или путем пассивной диффузии (Südhof, 2012). Наряду с направленной синаптической передачей между клетками функционирует механизм непрямой, так называемой объемной передачи, при которой молекулы медиатора диффундируют во внеклеточное пространство и воздействуют на удаленные клетки-мишени (Shin et al., 2019). Выделяют два основных механизма объемной передачи: синаптический «избыток», при котором трансмисмиттер покидает пределы синаптической щели при достижении высокой пороговой концентрации, и внесинаптический экзоцитоз, характеризующийся высвобождением медиаторных везикул вне активных зон синапса (Rossi, Hamann, 1998; Trueta et al., 2003; Ford et al., 2010). Такая внесинаптическая диффузия имеет важное значение для функционирования моноаминов, таких как дофамин и серотонин, которые часто классифицируются как нейромодуляторы благодаря их способности к пространственно-временному распространению сигнала.

### **Серотонин и серотонинергическая система**

Серотонин (5-гидрокситриптамин, 5-НТ) – моноамин, относящийся к классу индоламинов, представляет собой один из классических нейромедиаторов и гормонов, функционирующих как в центральной нервной

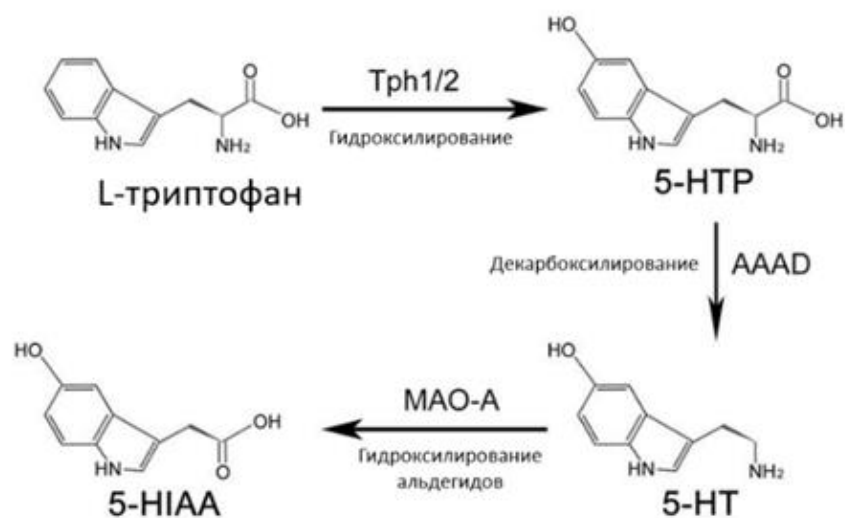
системе, так и в периферических тканях. Впервые данное соединение было выделено и очищено из сыворотки крови в 1948 году, что и обусловило его историческое название (Rapport et al., 1948).

Биологическая активность серотонина обеспечивается комплексной молекулярной системой, включающей специфические белки-транспортёры, рецепторы, а также ферментативные цепочки синтеза и деградации. Ниже организация серотонинергической системы рассмотрена на примере наиболее изученной модели – нервной ткани.

### Синтез и метаболизм серотонина

В структурах ЦНС и периферических тканях биосинтез серотонина осуществляется из аминокислоты L-триптофана в ходе двух последовательных ферментативных реакций. На первом этапе происходит гидроксирование L-триптофана под действием фермента триптофангидроксилазы (ТРН), что приводит к образованию 5-гидрокситриптофана (5-НТР) (Рис. 1). Выделяют две изоформы данного фермента: ТРН1, экспрессия которой преобладает в периферических тканях и в незначительных количествах встречается в ЦНС (Zill et al., 2009), и ТРН2, специфичную преимущественно для нервной ткани (Walther et al., 2003; Walther, Bader, 2003; Côté et al., 2003). На втором этапе 5-НТР подвергается декарбоксилированию при участии декарбоксилазы ароматических L-аминокислот (АААД) до конечного продукта – 5-НТ (Boadle-Biber, 1993).

Катаболизм серотонина осуществляется преимущественно ферментом моноаминоксидазой А (МАО-А) (Tsugeno, Ito, 1997), катализирующим его превращение в 5-гидроксииндолуксусную кислоту (5-НИАА) (Shih et al., 1999; Singh et al., 1999; Conn, 2008). МАО-А осуществляет окислительное дезаминирование моноаминов и структурно ассоциирована с внешней мембраной митохондрий (Greenawalt, Schnaitman, 1970; Riley et al., 1989; Shader, 2023).



**Рисунок 1.** Синтез и метаболизм серотонина в ЦНС и периферических тканях (по Lv, Liu, 2017, с изменениями).

### Рецепторы и транспортеры серотонина

В связи с тем, что молекула серотонина не способна к пассивной диффузии через липидный бислой плазматической мембраны, функционирование серотонинергической системы обеспечивается тремя типами транспортеров: мембранным транспортером SERT и везикулярными транспортерами VMAT1 и VMAT2.

В цитоплазматическом компартменте 5-НТ депонируется в везикулы при участии везикулярного транспортера моноаминов VMAT (семейство SLC18). Данное семейство представлено изоформами VMAT1 и VMAT2, обеспечивающими транспорт различных моноаминов, включая дофамин, серотонин и норадреналин (Jones et al., 2020). Транспортная функция белков VMAT энергетически сопряжена с трансмембранным протонным градиентом по механизму антипорта: перенос одной молекулы субстрата обменивается на выход двух протонов (Parsons, 2000; Eiden et al., 2004). Установлено, что сродство серотонина, как и большинства моноаминов, к изоформе VMAT2 значительно выше, чем к VMAT1 (Kayabaşı et al., 2021).

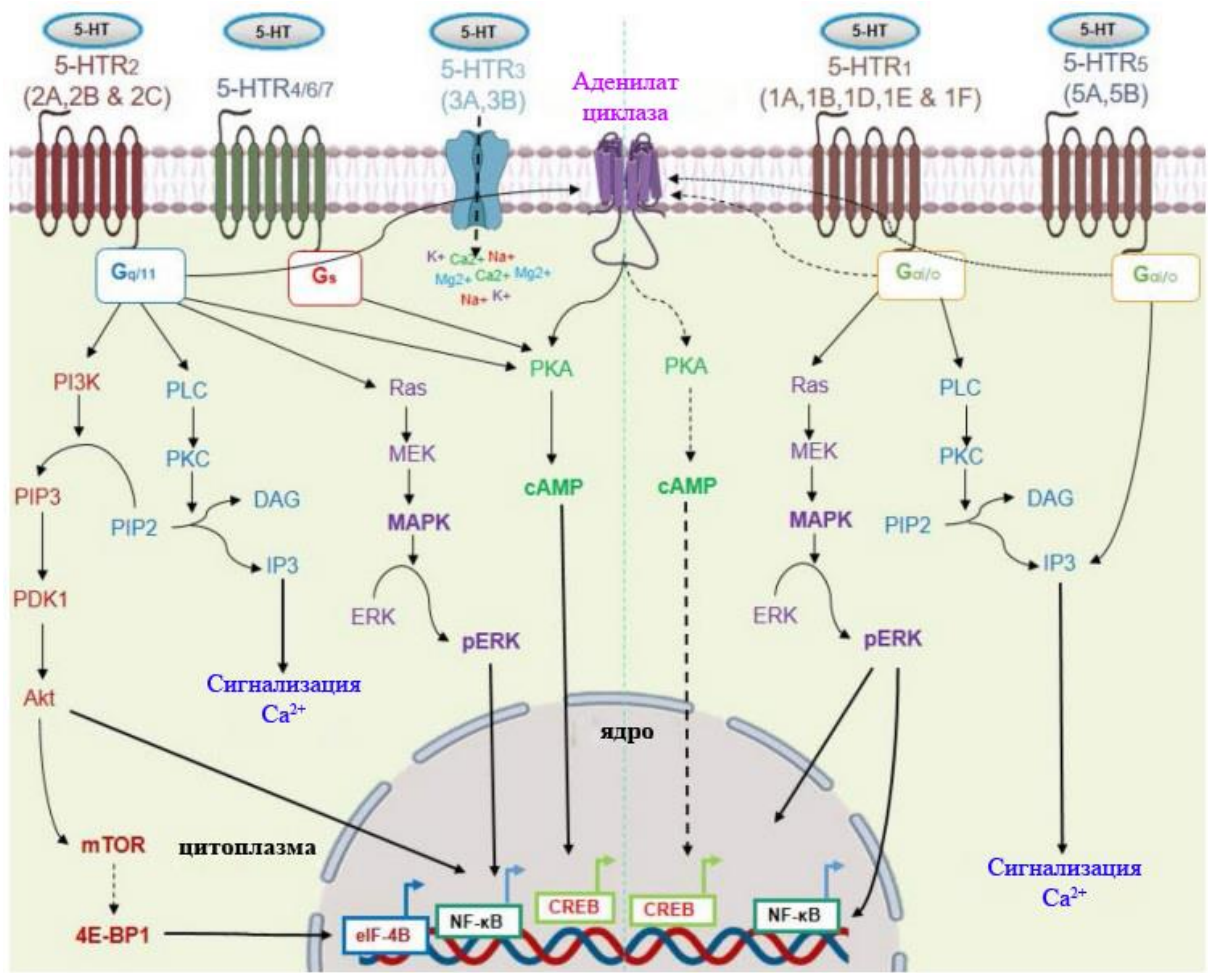
Специфический для серотонина мембранный транспортер SERT локализован на плазматической мембране и представляет собой симпортер, сопряженный с градиентом ионов  $\text{Na}^+$  (Murphy et al., 2004). Высвобожденный

во внеклеточное пространство серотонин может подвергаться обратному клеточному захвату посредством SERT (Rudnick, Clark, 1993; Choi et al., 2006; Johnson et al., 2019).

В современной номенклатуре рецепторы серотонина подразделяются на 7 семейств, объединяющих в совокупности 15 подтипов (табл. 1, Рис. 2). рецепторы 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub> и 5-HT<sub>7</sub> являются метаботропными рецепторами, сопряженными с G-белками (GPCR), тогда как рецепторы подтипа 5-HT<sub>3</sub> представляют собой ионотропные лиганд-зависимые катионные каналы для ионов Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> (Hannon, Noyer, 2002; Berger et al., 2009). Активация рецепторов 5-HT<sub>1</sub> и 5-HT<sub>5</sub> приводит к ингибированию аденилатциклазы и снижению внутриклеточного уровня цАМФ, в то время как рецепторы 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> и 5-HT<sub>7</sub> стимулируют аденилатциклазный каскад (Pytliak et al., 2011). Семейство 5-HT<sub>2</sub> опосредует повышение концентрации вторичных мессенджеров посредством активации фосфолипазы C и инозитолтрифосфатного сигнального пути (Salvan et al., 2023). Активация рецепторов 5-HT<sub>3</sub> индуцирует кратковременную деполяризацию плазматической мембраны (Pytliak et al., 2011).

**Таблица 1.** Классификация рецепторов серотонина (по Karmakar, Lal, 2021; Sourbron, Lagae, 2022; Salvan et al., 2023).

<b>Семейство рецепторов</b>	<b>Подтипы</b>	<b>Механизм передачи сигнала</b>
5-HT <sub>1</sub>	5-HT <sub>1A</sub> , 5-HT <sub>1B</sub> , 5-HT <sub>1D</sub> , 5-HT <sub>1E</sub> , 5-HT <sub>1F</sub>	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> – белки
5-HT <sub>2</sub>	5-HT <sub>2A</sub> , 5-HT <sub>2B</sub> , 5-HT <sub>2C</sub>	G <sub>q/11</sub> -белок
5-HT <sub>3</sub>	5-HT <sub>3A</sub> , 5-HT <sub>3B</sub>	Лиганд-зависимый катионный канал
5-HT <sub>4</sub>	-	G <sub>s</sub> -белок
5-HT <sub>5</sub>	5-HT <sub>5A</sub> , 5-HT <sub>5B</sub>	G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub> – белки
5-HT <sub>6</sub>	-	G <sub>s</sub> -белок
5-HT <sub>7</sub>	-	G <sub>s</sub> -белок



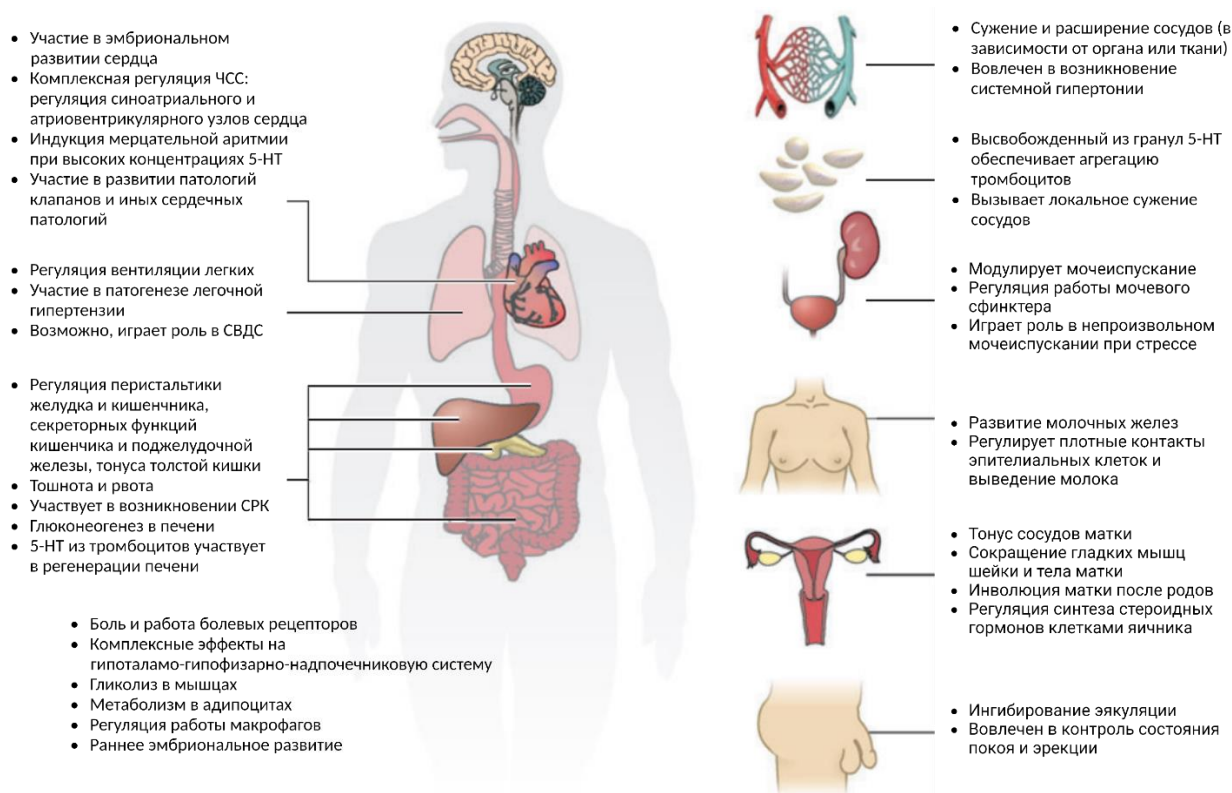
**Рисунок 2.** Сигнальные пути серотониновых рецепторов (по Karimakar, Lal, 2021, с изменениями). Серотонин передает сигналы через 15 подтипов рецепторов (5-НТR). Большинство из них относятся к рецепторам, сопряжённым с G-белком, за исключением подсемейства 5-НТ3. Эти рецепторы активируют четыре основные взаимосвязанные сигнальные сети: PI3K/Akt, PKC/Ca<sup>2+</sup>, MAPK, PKA-цАМФ. Akt – протеинкиназа B, сАМФ – циклический аденозинмонофосфат, DAG – диацилглицерол, PI3K – фосфоинозитид-3-киназа, PIP2 – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат, PIP3 – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат, PKA – протеинкиназа А, PKC – протеинкиназа С, PLC – фосфолипаза С. Черные стрелки обозначают активацию пути, черные пунктирные стрелки – его ингибирование

### **Физиологические функции серотонина в ЦНС и периферических тканях**

В структурах ЦНС серотонинергическая нейротрансмиссия участвует в регуляции широкого спектра физиологических и когнитивных процессов, включая модуляцию эмоционального фона (Lv, Liu, 2017), купирование

тревожных состояний (Gershon, Tack, 2007), регуляцию циркадных ритмов и пищевого поведения (Martin et al., 2017), а также болевую чувствительность, половое поведение и механизмы памяти (Lucki, 1998). Нарушения серотонинергической передачи лежат в основе патогенеза ряда тяжелых психических и нейродегенеративных заболеваний (Mohammad-Zadeh et al., 2008).

Несмотря на обширную историю изучения центральных эффектов серотонина, на долю ЦНС приходится лишь около 5% от общего пула данного моноамина в организме млекопитающих. Оставшиеся 95% локализованы на периферии (Рис. 3), при этом основным источником их синтеза выступают энтерохромаффинные клетки слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта (Gershon, Tack, 2007; Berger et al., 2009). В ответ на механическое растяжение стенок кишечника происходит экзоцитоз серотонина, который паракринно регулирует моторику и перистальтическую активность пищеварительного тракта (Kendig, Grider, 2015).



**Рисунок 3.** Функции серотонина за пределами ЦНС (по Berger et al., 2009, с изменениями).

Периферический серотонин также выступает в качестве гуморального регулятора функций сердечно-сосудистой и иммунной систем (El-Merahbi et al., 2015). Продемонстрирована способность свободного серотонина индуцировать хемотаксис нейтрофилов к очагам воспаления (Duerschmied et al., 2013). Наблюдается прямая корреляция между высвобождением серотонина из активированных тромбоцитов и патогенезом инфаркта миокарда (Shimizu et al., 2002). При этом серотонин осуществляет не только модулирование противомикробной защиты, но и проявляет выраженную антиоксидантную активность (Shajib, Khan, 2015; Herr et al., 2017).

В дыхательной системе серотонин выступает фактором легочной вазоконстрикции и участвует в регуляции ритма дыхания (Berger et al., 2009; Hilaire et al., 2010). Патологическое повышение концентрации свободного серотонина в плазме крови ассоциировано с развитием легочной артериальной гипертензии, что опосредовано гиперактивацией рецепторов 5-НТ<sub>2В</sub> на поверхности эндотелиоцитов легочных артерий (Kereveur et al., 2000) и последующим увеличением сосудистого сопротивления (Esteve et al., 2007).

Таким образом, серотонин представляет собой универсальный регулятор, физиологические мишени которого широко представлены в большинстве систем органов животных. Особый интерес представляет участие компонентов серотонинергической системы в процессах клеточной дифференцировки, эмбрионального развития, и функционировании женской репродуктивной системы, что составляет фокус данной работы.

### **Серотонин в процессах дифференцировки и онкогенеза клеток**

В современной научной литературе приводятся данные о том, что высокий уровень экспрессии 5-НТ и его специфических рецепторов сопряжен с прогрессированием некоторых типов злокачественных новообразований, поскольку данные молекулы способны проявлять выраженные митогенные и антиапоптотические свойства (Ye et al., 2021). Повышенная экспрессия серотониновых рецепторов верифицирована при многих типах карцином,

включая колоректальный рак (Sakita et al., 2019), рак поджелудочной железы (Jiang et al., 2017), гепатоцеллюлярную карциному и аденокарциному легких (Liu et al., 2019), рак молочной железы (Hallett et al., 2016), а также рак предстательной железы (Nakamura et al., 2017). Более высокие концентрации 5-НТ, регистрируемые в опухолевых тканях, коррелируют с риском рецидивировов и высокими показателями смертности (Fröbe et al., 2014; Xia et al., 2018).

Опухолевые и интактные клетки демонстрируют разный физиологический ответ на стимуляцию серотонином. Предполагается, что данное различие обусловлено утратой злокачественными клетками механизмов контроля со стороны нервной системы при частичном сохранении эндокринной регуляции. В частности, показано, что серотонин избирательно стимулирует пролиферативную активность клеток колоректального рака, не оказывая аналогичного воздействия на деление здоровых клеток (Tutton, Barkla, 1978, 1980). В тканях холангиокарциномы человека патологическое накопление серотонина, вызванное гиперэкспрессией TRH1 на фоне сниженной активности MAO-A, может быть нивелировано путем фармакологического ингибирования TRH1 или специфических рецепторов 5-НТ<sub>1A</sub>, 5-НТ<sub>2A</sub>, 5-НТ<sub>2B</sub>, 5-НТ<sub>4</sub> и 5-НТ<sub>6</sub> (Alpini et al., 2008).

Серотонин также выступает в роли проангиогенного фактора, стимулирующего васкуляризацию опухолевой ткани (Ye et al., 2021). В условиях *in vitro* низкие концентрации 5-НТ индуцируют пролиферацию, миграцию и формирование капиллярподобных структур эндотелиальными клетками. В исследованиях *in vivo* аналогичный эффект опосредуется серотониновыми рецепторами через активацию орфанного ядерного рецептора и транскрипционного фактора TR3 (мышинный гомолог Nur77) (Qin et al., 2013). Агрегация тромбоцитов в микроокружении опухоли сопровождается массивным высвобождением серотонина, что критически важно для формирования микрососудистого русла (Zamani, Qi, 2012). Присутствие 5-НТ-позитивных клеток положительно коррелирует с

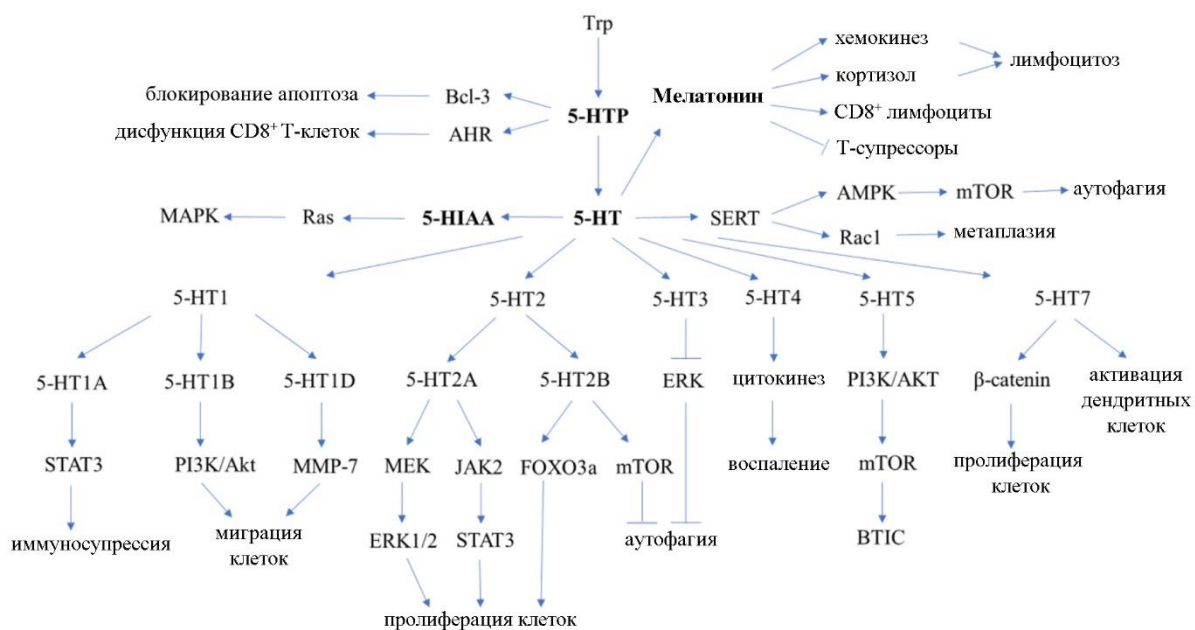
плотностью микрососудов и уровнем экспрессии сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF (Gulubova, Vlaykova, 2008).

Эксперименты на мышинных моделях аллотрансплантатов рака толстой кишки выявили, что дефицит TRH ассоциирован со сниженной плотностью микрососудистой сети по сравнению с животными дикого типа. При сопоставимых уровнях экспрессии VEGF и VEGFR2, у мышей с дефицитом TRH отмечалась повышенная экспрессия матричной металлопротеиназы 12 (MMP-12) и ангиостатина (Nocito et al., 2008). Фермент MMP-12 катализирует расщепление плазминогена с образованием ангиостатина, являющегося мощным эндогенным ингибитором ангиогенеза (Cornelius et al., 1998). Размеры аллотрансплантатов рака легких и меланомы у мышей с генетическим нокаутом SERT также были достоверно меньше, что может объясняться снижением концентрации эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), обеспечивающей вазодилатацию, и недостаточным кровоснабжением растущего новообразования (Asada et al., 2009). В противовес этому имеются данные о способности серотонина выступать в качестве вазоконстриктора, уменьшающего просвет опухолевых сосудов и подавляющего тем самым рост опухолевой массы в кишечнике (Lübbe, Huhnt, 1994).

Последние клинико-экспериментальные трансляционные исследования свидетельствуют о функциональной связи между 5-НТ и инфильтрирующими опухоль клетками иммунной системы (Herr et al., 2017). Посредством специфических рецепторов серотонин ингибирует секрецию провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$ . В макрофагах трансмиттер модулирует профиль секретлируемых интерлейкинов, а также опосредует рекрутирование нейтрофилов и антигензависимую активацию Т-клеток (Molina-Cerrillo et al., 2019). Отмечается, что у пациентов с аденокарциномой легких, которая сопровождается депрессивными расстройствами, серотонинергическая сигнализация способна вызывать иммуносупрессию посредством активации сигнальной оси 5-НТ<sub>1A</sub>/аутофагия/p-STAT3 (Liu et al., 2019).

Значительное внимание уделяется роли серотонина в регуляции клеточной дифференцировки через сигнальный каскад Wnt. Исследования *in vitro* на мезенхимных стволовых клетках (МСК) жировой ткани продемонстрировали, что повышенные концентрации серотонина усиливают экспрессию транскриптов *Wnt2* и *AXIN*, стимулируя тем самым пролиферативную активность МСК (Semerci Sevimli et al., 2023). Серотонин способен активировать путь Wnt/ $\beta$ -катенин посредством стимуляции рецептора 5-НТ<sub>7</sub>, направляя дифференцировку стволовых клеток кишечника в эпителиоциты слизистой оболочки, что замыкает петлю положительной обратной связи, индуцируя дополнительную паракринную секрецию 5-НТ (Yu et al., 2025). Известно также, что ядерная транслокация  $\beta$ -катенина запускает активацию сигнального пути NF- $\kappa$ B и повышает экспрессию провоспалительных цитокинов (George, 2008). Использование антагонистов 5-НТ позволяет подавить воспалительные процессы в ЖКТ лабораторных мышей (Yu et al., 2025). При травматических и ишемических повреждениях энтеральной нервной системы описан феномен трансдифференцировки клеток глиии и шванновских клеток в функциональные нейроны, который реализуется при совместном участии серотонина и глиального нейротрофического фактора GDNF (Jonscher, Belkind-Gerson, 2019). Дополнительно установлено, что молекула 5-НТ способна в дозозависимой манере модулировать экспрессию транскрипционного фактора Nkx6.1, индуцируя трансдифференцировку  $\alpha$ -клеток островков Лангерганса в инсулинпродуцирующие  $\beta$ -клетки поджелудочной железы (Liu et al., 2025).

В процессах злокачественной трансформации, дифференцировки и миграции активно задействованы не только сам серотонин, но и его предшественник 5-НТР, а также ключевые метаболиты – 5-НИАА и гормон мелатонин (Рис. 4). Экспериментально подтверждено, что 5-НТР подавляет апоптотическую гибель эпителиоцитов молочной железы посредством активации пути MAPK/ERK/Vcl-3, параллельно способствуя функциональному истощению Т-клеточного иммунитета (Zhao et al., 2021).



**Рисунок 4.** Роль 5-НТ и его метаболитов в пролиферации и онкогенезе (по Ye et al., 2021, с изменениями).

Интерлейкин-2 приводит к активации фактора STAT5 в CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах, что усиливает транскрипцию TRH1 и интенсифицирует продукцию 5-НТР. Внутриклеточное накопление 5-НТР стимулирует ядерную транслокацию арилгидрокарбонового рецептора (AHR), усугубляя дисфункцию Т-клеток в микроокружении солидной опухоли (Liu et al., 2021). Продукт деградации серотонина 5-НИАА идентифицирован как эндогенная малая молекула, обладающая способностью ингибировать митоген-активируемый протеинкиназный каскад RAS/MAPK (Schmid et al., 2015), активация которого способствует злокачественному перерождению. В свою очередь, противоопухолевый потенциал мелатонина реализуется через плейотропные механизмы: усиление антиоксидантного потенциала, модуляцию иммунного ответа, индукцию апоптотических каскадов, а также за счет прямого ингибирования клеточного цикла и процессов ангиогенеза (Ye et al., 2021). Влияя на тканевое микроокружение, мелатонин оптимизирует соотношение субпопуляций лимфоцитов, достоверно увеличивая фракцию цитотоксических CD8<sup>+</sup>-клеток и снижая иммуносупрессивный потенциал регуляторных Т-клеток (Baghban Rahimi et al., 2018). Обобщенные

клинические данные свидетельствуют, что терапия препаратами мелатонина в сочетании с традиционными химиолучевыми протоколами многократно увеличивает чувствительность новообразований к иммунотерапии интерлейкином-2, обеспечивая статистически значимое повышение частоты клинического ответа и общей выживаемости (Lissoni et al., 1994; Lissoni et al., 2008).

### **Серотонин в физиологии женской репродуктивной системы**

Серотонин и структурные компоненты серотонинергической системы идентифицированы в тканях яичников, яйцеводов, матки, а также в плаценте млекопитающих (Amenta et al., 1992). Присутствие данного биогенного амина и его специфических рецепторов в структурах репродуктивного тракта является критически важным фактором для обеспечения адекватной гормональной регуляции, поддержания процессов направленной клеточной дифференцировки и нормального физиологического развития плода.

Серотонин принимает непосредственное участие в модуляции биосинтеза стероидных гормонов, в первую очередь эстрадиола (Terranova et al., 1990). В исследованиях на свиньях установлено, что высокие концентрации данного моноамина опосредуют угнетение синтеза эстрадиола, что функционально приводит к ингибированию наступления овуляции (Zhang et al., 2024). Напротив, в изолированной культуре фолликулярных клеток гранулезы человека экзогенный серотонин выступает стимулятором продукции как эстрадиола, так и прогестерона (Bódis et al., 1993). Захват серотонина ооцитами внутри растущих фолликулов яичника индуцирует синтез и последующую секрецию фактора дифференцировки роста 9 (GDF9), который паракринно модулирует функциональный статус клеток гранулезы (Nikishin et al., 2021). Системное применение селективных ингибиторов обратного захвата серотонина у самок крыс оказывает выраженное негативное воздействие на репродуктивную функцию, что проявляется в достоверном снижении пула

овулирующих ооцитов и нарушении нормальной физиологии яичников (Romero-Reyes et al., 2016; Achary, Rohini, 2021).

Наивысшие тканевые концентрации серотонина зарегистрированы в интактных яйцеводах крыс (Amenta et al., 1992). Несмотря на ограниченность исчерпывающих данных относительно функциональной роли моноамина в данном отделе, клинико-экспериментальные наблюдения свидетельствуют о том, что резкое снижение уровня серотонина в репродуктивных тканях на ранних сроках беременности ассоциировано с повышенным риском спонтанного прерывания беременности (Acharya et al., 1989). В исследованиях на ряде модельных объектов, в частности на пресноводном моллюске *Lymnaea stagnalis*, показано, что уровень серотонина в репродуктивном тракте материнского организма способен эпигенетически модулировать отсроченные эффекты, включая формирование долгосрочных поведенческих паттернов у потомства (Voronezhskaya, 2021).

В тканях матки грызунов и человека значительный пул серотонина депонируется в тучных клетках, плотность популяции которых подвержена циклическим колебаниям в зависимости от фазы эстрального или менструального цикла, а также от наличия беременности (Mori et al., 1997; Bytautiene et al., 2002; Nakamura et al., 2008). Основываясь на этих фактах, выдвинута гипотеза о том, что локальные флуктуации концентрации серотонина, высвобождаемого из мастоцитов, выступают мощным паракринным регулятором сократительной активности маточной мускулатуры. Следует отметить выраженную межвидовую специфичность данного рецепторного механизма. У кроликов аккумуляция моноамина стимулирует сократимость миометрия посредством активации рецепторов 5-НТ<sub>2</sub>, 5-НТ<sub>3</sub> и 5-НТ<sub>4</sub> (Lychkova et al., 2014). В миометрии свиней рецептор 5-НТ<sub>2A</sub> опосредует тонический эффект, тогда как стимуляция рецептора 5-НТ<sub>7</sub>, напротив, приводит к релаксации (Nakamura et al., 2008). В изолированных миоцитах матки человека доминирующую возбуждающую функцию выполняет рецептор 5-НТ<sub>2B</sub> (Kelly, Sharif, 2006); у мышей идентичный

молекулярный субстрат пока не верифицирован, хотя сам факт участия серотонина в сократимости матки показан (Rudolph et al., 1992). Помимо модуляции сократимости, у крыс выявлена функциональная способность серотонина индуцировать экспрессию фермента коллагеназы в клетках миометрия (Rydelek-Fitzgerald et al., 1993). Важным физиологическим аспектом является также дозозависимое влияние серотонинергической сигнализации на гемодинамику маточного кровотока (Clark et al., 1980).

На фоне глобального увеличения числа женщин репродуктивного возраста, принимающих антидепрессанты групп СИОЗС и ингибиторов моноаминоксидазы, пристального внимания исследователей заслуживает статус плаценты и специфическая роль серотонина в ее функционировании. Достоверно установлено, что плацентарные ткани мышей и человека обладают автономной способностью синтезировать серотонин (Huang et al., 1998; Vonnin et al., 2011; Tuteja et al., 2016; Muller et al., 2017). В плаценте человека серотонин локализуется преимущественно в структурах синцитиотрофобласта, эндотелии фетоплацентарных сосудов и стромальных клетках (Pavličev et al., 2017). Гомеостаз серотонина влияет на процессы пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток трофобласта (Mercado et al., 2013; Kim et al., 2015). На моделях изолированных плацентарных эксплантов продемонстрировано, что экзогенный серотонин вызывает мощную вазоконстрикцию пупочной вены и плацентарной капиллярной сети (Reviriego et al., 1990; Ugun-Klusek et al., 2011). Нарушения в функционировании транспортера SERT в трофобласте эмбриологически ассоциированы с множественными врожденными пороками развития, включая дефекты смыкания нервной трубки, сердечно-сосудистые аномалии, а также с риском формирования расстройств аутистического спектра (Hadden et al., 2017). Сбои в серотониновой сигнализации рассматриваются как один из триггеров преэклампсии – синдрома полиорганной недостаточности, осложненного гиперкоагуляцией и системным воспалительным ответом (Perić et al., 2022). При данной гестационной патологии отмечается снижение

активности фермента деградации серотонина МАО-А, следствием чего становится патологическое повышение концентрации свободного серотонина в крови (Carrasco et al., 2000). Снижение синтеза МАО-А, в свою очередь, выступает доказанным этиологическим фактором предродовой депрессии (Blakeley et al., 2013). Эпигенетические модификации, в частности гиперметилирование гена рецептора 5-НТ<sub>2А</sub>, сопутствующее снижению его экспрессии, является одним из факторов развития гестационного сахарного диабета, сопровождающегося нарушением глюкозного обмена и увеличением массы тела матери (Viau et al., 2009; Horvatiček et al., 2022). Также существует риск задержки внутриутробного роста плода и преждевременного прерывания беременности, функционально обусловленный нарушениями экспрессии транспортера SERT, фермента TPH2, а также специфических рецепторов 5-НТ<sub>1D</sub> и 5-НТ<sub>5А</sub> (Ranzil et al., 2019).

### **Серотонинергическая система в эмбриональном развитии животных**

Присутствие серотонина описано в эмбрионах широкого спектра видов животных (Markova et al., 1985; Buznikov, 1989; Buznikov et al., 2003; Amireault & Dube, 2005; Nikishin et al., 2016). На ранних этапах эмбриогенеза медиаторные системы, в том числе серотонинергическая, участвуют в регуляции делений дробления (Buznikov et al., 1970, 1996, 2005), межбластомерных взаимодействий (Шмуклер, 1981; Бузников, 2007; Shmukler, Nikishin, 2012) и морфогенетических движений (Shuey et al., 1993). Кроме того, они задействованы в установлении лево-правой асимметрии тела (Levin et al., 2006), а также в процессах клеточной пролиферации и дифференцировки (Azmitia, 2001), что приобретает критическое значение в период личиночного метаморфоза (McCauley, 1997; Pires et al., 2000; Falugi et al., 2002; Dobretsov, Qian, 2003; Leise et al., 2004; Clark et al., 2005) и при формировании элементов нервной системы (Yamamoto, Vernier, 2011; Xing, Nuttner, 2020).

## Серотонинергическая система в оогенезе и созревании ооцитов

Серотонинергическая система осуществляет комплексную регуляцию клеток уже на стадии оогенеза. В ооцит-кумулюсных комплексах мышей идентифицированы сам серотонин, его специфический транспортер SERT, а также ферменты синтеза TPH1 и TPH2 (Amireault, Dube, 2005a). При этом доказано, что по отношению к ооциту серотонин является экзогенным фактором, поскольку эндогенный синтез осуществляется исключительно клетками кумулюса, окружающими клетку (Dubé, Amireault, 2007). Локализация SERT на поверхностной мембране ооцита обеспечивает захват медиатора из микроокружения как *in vivo*, так и в условиях *in vitro* (Amireault, Dube, 2005a). Важнейшей функцией серотониновой сигнализации выступает стимуляция выхода из метафазного блока мейоза II, что функционально обусловлено высвобождением депонированных ионов  $Ca^{2+}$  из эндоплазматического ретикулума в ответ на повышение внутриклеточной концентрации 5-НТ (Amireault, Dube, 2005b; Tanabe et al., 2006). Накопление серотонина и его интеграция во внутриклеточные сигнальные каскады рассматривается в качестве потенциального маркера доминантного фолликула (Alyoshina et al., 2023). Воздействие селективными ингибиторами обратного захвата серотонина на мышинных моделях индуцирует нарушение эстрального цикла, снижает пул антральных фолликулов и способствует их преждевременной дегенерации (Mansoriyan et al., 2018; Domingues et al., 2023), сопровождаясь повреждением блестящей оболочки ооцита. Более того, экспозиция флуоксетином достоверно снижает частоту овуляции вследствие задержки созревания половых клеток (Tkachenko et al., 2025).

Влияние серотонина на качество половых клеток подтверждено и у других животных. У нематоды *Caenorhabditis elegans* медиатор модулирует пролиферацию клеток зародышевой линии (Aprison et al., 2024), а у немертин *Cerebratulus lacteus* и *Micrura alaskensis* 5-НТ стимулирует активацию ооцитов путем повышения уровня внутриклеточного цАМФ (Stricker, Smythe, 2001). Серотониновая сигнализация также играет определяющую роль в созревании

ооцитов двустворчатого моллюска *Pinctada fucata* (Wang, He, 2014) и креветки *Penaeus indicus* (Tomy et al., 2016), а фармакологическая блокада 5-HT<sub>1D</sub>-рецептора у моллюска *Tridacna crocea* прямо ингибирует оогенез (Yang et al., 2024). У *Spisula solidissima* серотонин-индуцированный кальциевый ответ запускает мейотическое созревание и нерест (Hirai et al., 1988; Krantic et al., 1991). У хомяков экзогенный серотонин генерирует всплеск ионов Ca<sup>2+</sup> в МП-ооцитах (Fujiwara et al., 1993), тогда как у свиней выявлен строгий дозозависимый паттерн: низкие концентрации вещества стимулируют овуляцию, а высокие подавляют ее (Zhang et al., 2024). С другой стороны, у морских звезд, ежей и амфибий (*Xenopus laevis*), несмотря на наличие матричных РНК специфических рецепторов, для нормального созревания, напротив, требуется ингибирование 5-HT-сигнальных путей (Buznikov et al., 1993; Nikishin et al., 2016). У некоторых видов рыб применение СИОЗС снижает нерестовую продуктивность (Prasad et al., 2015), а у японского перепела *Coturnix japonica* детальный механизм функционирования рецепторов ооцитов пока остается не до конца выясненным (Stepińska et al., 2015).

#### Серотонинергическая система в процессах дробления и межбластомерного взаимодействия

Серотонин, его специфические рецепторы, а также ферменты синтеза и деградации детектируются в эмбрионах различных видов животных на ранних стадиях дробления (Buznikov et al., 1970, 2003; Vesela et al., 2003; Il'kova et al., 2004; Amireault, Dube, 2005b; Basu et al., 2008; Sikos et al., 2011). Эксперименты на мышинных моделях продемонстрировали, что экзогенный серотонин в концентрации 1 мкМ способен ингибировать деления дробления и индуцировать апоптоз бластомеров (Il'kova et al., 2004). Нарушение эндогенного синтеза медиатора путем инъекций беременным самкам ингибитора триптофангидроксилазы фенклонина приводит к остановке цитокинеза на ранних этапах развития (Khozhai et al., 1995). У других

модельных объектов фармакологическая блокада серотониновой сигнализации также вызывает выраженные эмбриотоксические эффекты: антагонисты нарушают процессы дробления у морских ежей (Shmukler, 2010), а также полностью ингибируют первые деления у моллюска *Tritonia diomedea* и полихеты *Ophryotrocha labronica* (Emanuelsson, 1974; Emanuelsson, 1992; Buznikov et al., 2003). Предшественник серотонина 5-НТР нарушает нормальный паттерн спирального дробления у *Lymnaea stagnalis* (Bogomolov, Voronezhskaya, 2022). Кроме того, применение антагонистов рецепторов серотонина подавляет асимметричное деление у моллюска *Tritia obsoleta*, а нарушение серотониновой рецепции провоцирует смещение локализации белков, детерминирующих клеточную полярность (Nakamoto, Nagy, 2025).

Фундаментальный вклад в понимание роли серотонина в регуляции раннего эмбриогенеза внес Г.А. Бузников в классических исследованиях на морских ежах. Было установлено, что хотя экзогенный серотонин сам по себе не вызывает радикальных морфологических сдвигов, применение ингибиторов его эндогенного синтеза неминуемо ведет к аресту делений дробления (Бузников, 1967; Бузников, 1987). Использование антагонистов серотонина грамина и метерголина вызывает транзиторное снижение внутриклеточной концентрации ионов  $Ca^{2+}$  и цАМФ, что реализуется в виде выраженного цитостатического эффекта. Данная блокада носит обратимый характер и нивелируется добавлением в среду серотонина или 5-гидрокситриптофана (Renaud et al., 1983). Примечательно, что мишенью выступает не столько сам клеточный цикл, сколько процесс цитотомии, что указывает на специфическое влияние серотонина на элементы цитоскелета. На зиготах морских ежей было доказано, что антагонисты рецепторов вызывают дестабилизацию цитоскелетного кортекса (Григорьев, 1988) и угнетают сократительную активность микрофиламентов (Бузников, Григорьев, 1990). У амфибий серотонинергическая регуляция сопряжена непосредственно с клеточным циклом: при смене его фаз в ходе делений дробления наблюдаются строгие колебания активности протеинкиназы А (Grieco et al., 1994).

Поскольку в регуляцию активности РКА вовлечены рецепторы 5-НТ<sub>2</sub>, 5-НТ<sub>4</sub>, 5-НТ<sub>6</sub> и 5-НТ<sub>7</sub>, их фармакологическая блокада может нарушать динамику клеточного цикла дробления blastomeres. В частности, применение ципрогептадина (антагониста 5-НТ<sub>2</sub>-рецепторов) индуцирует повышение степени полимеризации актина в цитоплазме с одновременной деполимеризацией тубулина в зиготе, что приводит к необратимой блокаде первого деления дробления (Nikishin et al., 2020).

Основываясь на феноменах серотонинергической регуляции межblastomерных коммуникаций, Ю.Б. Шмуклером была сформулирована концепция «протосинапса» (Shmukler et al., 2008). В серии экспериментов на двухклеточных эмбрионах морских ежей проводилось механическое разделение blastomeres до и после их клеточной адгезии с последующим мониторингом обособления микромеров (Шмуклер и др., 1981а). В результате формировались как физиологически нормальные, так и «половинчатые» эмбрионы (Шмуклер и др., 1981б). Использование микромерной модели позволило выявить следующие закономерности: добавление серотонина к изолированным до адгезии blastomерам приводит к неравномерным делениям дробления, а добавление антагонистов серотонина к разделенным blastomерам после адгезии способствует их дальнейшему нормальному развитию (Shmukler, 2010). В контексте межblastomерных взаимодействий у морских ежей в качестве основного медиаторного модулятора рассматривался функциональный аналог 5-НТ<sub>3</sub>-рецептора (Shmukler et al., 2008). Параллельно было выдвинуто предположение о том, что эффекты агонистов могут быть также опосредованы 5-НТ<sub>4</sub>-рецептором, сопряженным с активацией аденилатциклазы (Peroutka, 1988). Применение дибутирил-цАМФ и ингибитора фосфодиэстеразы папаверина инициирует в микромерной модели каскады, аналогичные или превосходящие действие серотонина, что подтверждает вовлеченность цАМФ-зависимого пути. Было показано, что серотонин активирует аденилатциклазу, локализованную на мембранах эндоплазматического ретикулума и непосредственно в зоне контакта

бластомеров у эмбрионов морских ежей (Shmukler, Nikishin, 2012). Идентичные механизмы компартиментализации сигналов были описаны и для эмбрионов млекопитающих (Vorbrodt et al., 1977).

Уникальность концепции протосинапса заключается в ее фундаментальной применимости к различным медиаторным системам на донервных этапах онтогенеза до формирования специализированной нервной ткани (Шмуклер, 1992). В рамках этой парадигмы каждый из двух взаимодействующих бластомеров является одновременно источником сигнала и его преемником благодаря диффузии транмиттера в узкое межбластомерное пространство. Присутствие специализированных адгезионных контактов (Vacquier, Mazia, 1968) препятствует оттоку медиатора во внеклеточное пространство, тем самым повышая вероятность его связывания с рецепторами на мембране соседнего бластомера (Shmukler, 1993; Shmukler et al., 1999; Shmukler, Tosti, 2002). Таким образом, посредством паракринной секреции дробящиеся эмбрионы осуществляют взаимную модуляцию, детерминирующую пути их дальнейшего развития.

#### Серотонинергическая система в бластоцисте млекопитающих

Ранний эмбриогенез млекопитающих характеризуется уникальной стадией, предшествующей процессам гастрюляции, – формированием бластоцисты (Albert, Peters, 2009; Fujimori, 2010). Этому этапу предшествует морула, претерпевающая критическое морфогенетическое событие – компактизацию (Hur et al., 2023). В ходе компактизации инициируется первичная клеточная дифференцировка с сегрегацией бластомеров на две обособленные функциональные субпопуляции (Sozen et al., 2014). Наружные клетки объединяются посредством специализированных плотных контактов и в составе будущей бластоцисты дифференцируются в клетки трофобласта (трофэктодермы), тогда как внутренние клетки формируют внутреннюю клеточную массу (ВКМ). На стадии кавитации – формирования внутренней полости – клеточная специализация углубляется: активируется экспрессия

белков плотных контактов, E-кадгерина и  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы (Watson, Barcroft, 2001; Houghton, 2005). Благодаря направленному активному транспорту, опосредованному  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой на мембране клеток трофэктодермы, создается трансэпителиальный осмотический градиент, обеспечивающий направленный ток воды и формирование единой полости (Bell, Watson, 2013).

В бластоцисте млекопитающих показано присутствие серотонина, а также его специфических рецепторов, мембранных транспортеров и ключевых ферментов метаболизма (Přková et al., 2004; Qiao et al., 2020). Экспрессия изоформ триптофангидроксилазы (TRH1 и TRH2) и декарбоксилазы ароматических L-аминокислот (AAAD) подтверждена на доимплантационных стадиях развития у мыши и человека (Côté et al., 2007; Bonnin et al., 2011). Мембранный транспортер серотонина SERT также демонстрирует высокую функциональную активность как в клетках трофэктодермы, так и в ВКМ (Perić et al., 2022).

Серотонин выступает модулятором баланса между пролиферацией и апоптозом в эмбриональных тканях. Экспозиция дробящихся эмбрионов в среде с экзогенным серотонином или его функциональными аналогами индуцирует формирование бластоцист с достоверно уменьшенным количеством клеток (Vesela et al., 2003; Přková et al., 2004; Dubé, Amireault, 2007). Фармакологическая стимуляция рецепторов 5-HT<sub>1A</sub> и 5-HT<sub>2A</sub> усиливает митотическую активность бластомеров, тогда как угнетение экспрессии данных рецепторов приводит к интенсификации апоптотических процессов, что опосредуется активацией сигнальных каскадов JAK-STAT и/или MAPK (Azmitia, 2001; Oufkir et al., 2010). Специфическое ингибирование транспортера SERT с использованием антидепрессантов группы СИОЗС достоверно снижает долю формирующихся жизнеспособных бластоцист на 17,5% относительно контрольных значений (Tkachenko et al., 2025).

Серотонинергическая сигнализация также модулирует экспрессию фундаментальных транскрипционных факторов плюрипотентности (Sinenko et al., 2023). На экспериментальной модели эмбриональных фибробластов

мышь было продемонстрировано, что TRH2-зависимый синтез серотонина выступает в роли физиологического блокатора репрограммирования соматических клеток в индуцированное плюрипотентное состояние. Опыты *in vitro* на линиях эмбриональных стволовых клеток показали, что применение флуоксетина подавляет последующую трансдифференцировку клеток по мезодермальному пути (Kusakawa et al., 2008).

Помимо регуляции внутриклеточных процессов, серотонин влияет на профиль экспрессии молекул клеточной адгезии, тем самым напрямую определяя успешность имплантации эмбриона (Azmitia, 2001). Установлено, что системное введение избыточных доз серотонина беременным самкам мышей и крыс нарушает децидуальную реакцию эндометрия, что клинически проявляется выкидышами (Lindsay et al., 1961; Mitchell et al., 1983). У женщин с высокой долей полиморфизма в гене транспортера серотонина SERT или рецептора 5-HT<sub>1A</sub>, статистически чаще регистрируются эпизоды потери беременности, ассоциированные с нарушениями имплантации (Palomares et al., 2013). Кроме того, серотонин обладает паракринным влиянием на спектр секреции провоспалительных цитокинов и простагландинов в микроокружении, комплексно воздействуя на рецептивность эндометрия и качество физиологического взаимодействия клеток трофобласта с материнскими тканями (Han et al., 2022).

### Серотонинергическая система в процессах гастрюляции, морфогенеза и органогенеза

Участие серотониновой сигнализации детально описано также для процессов гастрюляции. На модели *Drosophila melanogaster* показано, что экспрессия 5-HT<sub>2A</sub>-подобного рецептора достигает максимума в начале формирования зародышевой полоски (Colas et al., 1995; Colas et al., 1999a). У мутантов, лишенных данного пика экспрессии вследствие нарушения синтеза серотонина или снижения транскрипции рецептора, формируются так называемые кутикулярные эмбрионы, что приводит к летальному исходу

(Colas et al., 1999b). У моллюска *Lymnaea stagnalis* введение в инкубационную среду предшественника серотонина 5-НТР на этапе дробления вызывает необратимые дефекты гастрюляции, приводящие к формированию экзогаструл (Voronezhskaya et al., 2012; Bogomolov, Voronezhskaya, 2022). Эксперименты на морских ежах свидетельствуют о том, что блокада серотониновой сигнализации влечет за собой формирование примитивного архентерона без последующей вторичной инвагинации (Buznikov et al., 2001; Karki et al., 2023).

Роль серотонинергической системы в гастрюляции амфибий освещена в научной литературе в меньшей степени. Установлено, что на стадии ранней гастрюлы у *Xenopus laevis* активируется экспрессия мРНК рецептора 5-НТ<sub>7</sub>, везикулярного моноаминового транспортера VMAT2 и декарбоксилазы AAAD (Nikishin et al., 2012). Хотя экспрессия рецептора 5-НТ<sub>2B</sub> непосредственно на стадии гастрюляции не описана, его направленное ингибирование антисмысловыми олигонуклеотидами на этапе 2–4 бластомеров приводит к недоразвитию первой жаберной дуги (Reisoli et al., 2010). У эмбрионов лягушки *Rana nigromaculata* зафиксировано резкое повышение концентрации 5-НТ и 5-НТР при переходе от бластулы к нейруле, что послужило основанием для гипотезы о критической роли серотонина в закладке зародышевых листков и обеспечении последующего метаморфоза (Takeda, 1997). Исследования на лягушках *Eleutherodactylus coqui* выявили, что воздействие высоких концентраций флуоксетина подавляет хондро- и остеогенез в краниальных отделах зародыша (Calibuso-Salazar, Ten Eyck, 2015). Блокада сигнального пути 5-НТ/Wnt путем гиперэкспрессии лигандсвязывающего домена субъединицы 5-НТ<sub>3</sub>-рецептора нарушает формирование лево-правой асимметрии у эмбрионов *Xenopus* (Beyer et al., 2012).

Принципиально важные данные получены на куриных эмбрионах: применение антагонистов серотонина блокирует образование ворсинок на границе зародышевого диска и темного поля (*area opaca*), следствием чего является замедленное или полностью отсутствующее формирование

нормальной бластодермы (Palén et al., 1979). Использование уретанов для подавления эндогенного синтеза серотонина приводило к нарушению закладки первичной полоски – ключевого морфогенетического события гаструляции птиц (Palén et al., 1979). Как следствие абберрантной гаструляции, развивался комплекс тяжелых пороков органогенеза: дефекты нейруляции (несмыкание нервной трубки), аномалии развития головного мозга, сердечно-сосудистой системы и сомитогенеза (Wallace, 1982). Активная экспрессия транспортеров SERT и VMAT сопровождает процесс краниального удлинения первичной полоски (Fukumoto et al., 2005). Ингибирование данных переносчиков нарушает становление лево-правой асимметрии: у эмбрионов амфибий – за счет альтерации экспрессии *Xnr*, а у птиц – вследствие нарушения сигналинга *Shh* (Romero-Reyes et al., 2021). Фармакологическая стимуляция 5-HT<sub>2B</sub>-рецепторов на поздних стадиях гаструляции и органогенеза приводила к снижению двигательной активности эмбрионов птиц и препятствовала нормальному вылуплению (Sparber et al., 1996).

У асцидии *Phallusia mammillata* инкубация личинок с препаратами, связывающимися с 5-HT<sub>3</sub>-рецептором, блокирует процесс вылупления из-за нарушения кранио-каудального морфогенеза, формируя сферический фенотип с редуцированным хвостом (Pennati et al., 2001). Специфическое ингибирование 5-HT<sub>2B</sub>-рецептора ритансерином вызывает аналогичный морфологический дефект, однако дополнительно индуцирует тяжелые аномалии кровеносной системы: отсутствие циркуляции, нарушение сердечных сокращений и секвестрацию форменных элементов крови в полости сердца (Pennati et al., 2001). Сопоставимые эффекты описаны и для позвоночных: воздействие ритансерином на эмбрионы мышей в период сомитогенеза провоцирует врожденные пороки сердца и нарушает дифференцировку саркомерных миофиламентов (Choi et al., 1997). Нокаут гена 5-HT<sub>2B</sub> у мышей приводит к выраженной гипоплазии желудочков сердца на фоне резкой потери пролиферативного потенциала кардиомиоцитов (Nebigil et al., 2000). Данные выводы согласуются с результатами,

полученными на личинках *Xenopus laevis*: эмбрионы, подвергнутые воздействию ритансерина, демонстрировали дилатацию камер сердца и выраженную аритмию (Ori et al., 2013). Нарушение паттернов экспрессии рецепторов 5-HT<sub>2B</sub> и 5-HT<sub>2C</sub> ведет к отклонению путей миграции клеток нервного гребня у куриных эмбрионов, что критически сказывается на развитии сердечной мезодермы (Wells, 2022; Garramone, 2024).

Критически важная роль отводится серотонину в процессах спецификации клеток нейроэктодермы. Этот биогенный амин координирует миграцию производных нервного гребня, развитие зрительного анализатора, формирование структур краниофасциального отдела и нейрональную спецификацию (Bérard et al., 2019). Показано, что серотонин, секретируемый в составе внеклеточных везикул клетками трофобласта мыши, абсолютно необходим для адекватного развития головного мозга плода (Kinkade et al., 2024). Установлено, что фермент деградации MAO-A проявляет высокую активность еще на этапе гастрюляции-нейруляции, инициируя необходимый уровень апоптоза в ходе раннего нейрогенеза (Wang et al., 2011). Эксперименты с применением СИОЗС и ингибиторов MAO на личинках *Danio rerio* продемонстрировали, что искусственно индуцированный избыток серотонина в раннем развитии влечет за собой сенсорные дисфункции при зрительной гиперстимуляции (нарушение защитного поведения) и торможение локомоторики (Faria et al., 2021).

Хотя в дефинитивном мозге взрослого организма лишь узкая популяция нейронов дифференцируется в серотонинергические, эндогенный серотонин и его рецепторы играют роль глобального морфогена в эмбриогенезе. В развивающейся ЦНС транскрипционный фактор Nkx2.2 вместе с GATA3 детерминирует формирование предшественников 5-HT-продуцирующих клеток в постериорных отделах (van Doorninck et al., 1999). Последующее функциональное созревание требует экспрессии факторов Lmx1 и Pet1, запускающих синтез специфических ферментов серотонинового каскада (Hendricks et al., 1999; Pfaar et al., 2002). Исследования линий нокаутных

мышей по генам MAO-A, SERT и VMAT однозначно свидетельствуют о необходимости жесткого паттернирования градиентов серотонина в период закладки нейронных цепей. Динамика этих градиентов определяет путь развития первичной соматосенсорной коры, проекций сетчатки и спинномозговых дыхательных центров (Gaspar et al., 2003). Моделирование *in vivo* подтверждает, что колебания концентрации серотонина управляют ремоделированием аксонального и дендритного деревьев, балансом выживаемости нейронов и общими темпами нейрогенеза.

Анализ фенотипов животных с полными и условными нокаутами генов различных подтипов 5-HT-рецепторов доказывает строгую функциональную специализацию рецепторного аппарата в развитии. Так, 5-HT<sub>1B</sub>-рецепторы управляют ремоделированием аксональных трактов (Rebsam et al., 2002), 5-HT<sub>2B</sub>-рецепторы отвечают за выживаемость клеточных популяций (Nebigil et al., 2000; Nebigil et al., 2003), а 5-HT<sub>1A</sub>-рецепторы играют ведущую роль во взрослом нейрогенезе (Yan et al., 1997). Нарушение этих процессов в перинатальном периоде имеет весомые последствия для поведения и нормальной жизнедеятельности у взрослых организмов.

Подводя итог всему вышесказанному, можно заключить, что серотонинергическая система представляет собой эволюционно консервативный и фундаментально значимый регуляторный механизм, вовлеченный в управление важнейшими процессами клеточной дифференцировки, пролиферации и морфогенеза на всех этапах раннего онтогенеза – от первых делений дробления до тонкой спецификации тканей и органов зародыша.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Реактивы

В работе использовались следующие реактивы: гонадотропин сыворотки жеребой кобылы (ГСЖК, Фоллимаг©, Мосагроген, Россия, либо Сергон©, Bioveta, Чехия), хорионический гонадотропин человека (ХГЧ, Хорулон©, MSD, Россия), фосфатно-солевой буфер (PBS), фосфатно-солевой буфер Дульбекко (Dulbecco's phosphate-buffered saline, dPBS, Biosera, Франция), среда EmbryoMax® KSOM Mouse Embryo Media (Merck KGaA, Германия), резерпин (Sigma-Aldrich, США), флуоксетина гидрохлорид (Macklin Inc., Китай), 5-НТ-креатинин сульфат (Merck KGaA, Германия), паргилина гидрохлорид (Merck KGaA, Германия), 5-гидрокси-L-триптофан (5-НТР, Merck KGaA, Германия), цистамина дигидрохлорид (Merck KGaA, Германия), 0,1 М цитратно-фосфатный буфер (Sigma-Aldrich, США), 0,3 мМ октансульфонат натрия (Sigma-Aldrich, США), 0,1 мМ ЭДТА (Sigma-Aldrich, США), 8% ацетонитрил (Sigma-Aldrich, США), параформальдегид (Paraformaldehyde, PFA, ICN Biochemicals, США), флуоксетин (Sigma-Aldrich, США), сахароза (Диаэм, Россия), додецил сульфат натрия (Sigma-Aldrich, США), эмбриональная телячья сыворотка (Biosera, Франция), буфер Хэнкса (Biosera, Франция), фосфатно-солевой буфер (PBS, Панэко, Россия), Tween-20 (Sigma-Aldrich, США), Triton X-100 (AppliChem, Германия), Mowiol (Sigma-Aldrich, США), бычий сывороточный альбумин (БСА, Sigma-Aldrich, США), азид натрия (Sigma-Aldrich, США), заливочная среда Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura, США), гексан (Астра, Россия), изопропанол (Литех, Россия), этанол (Ferain, Россия).

### Оборудование

В работе использовалось следующее оборудование: CO<sub>2</sub>-инкубатор Eppendorf Galaxy 170R (Eppendorf, Германия), термостат Redline RI 115 (Binder, Германия), 4-луночные планшеты (Nunc, Дания), колонка ReproSil-Pur, ODS-3, 4,6 × 150 мм, с диаметром пор 3 мкм (Dr. Majsch, Аммербух,

Германия), жидкостный хроматограф 1260 Infinity II (Agilent, США), электрохимический детектор Decade II (Antec Leyden, Alphen a/d Rijn, Нидерланды), лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Zeiss LSM 880 (Zeiss, Германия), лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Olympus FV10i (Olympus, Япония), лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Leica TCS SP5 (Leica, Германия), флуоресцентный микроскоп Leica Thunder (Leica, Германия), криостат Leica CM1900 (Leica, Германия).

### **Животные и экспериментальные процедуры**

Работа выполнена на самках мышей линий C57BL/6J и ICR (питомник «Столбовая», РАН). Животных содержали в стандартных условиях вивария при контролируемом световом режиме. Для получения самок с датированным сроком беременности использовали метод определения вагинальных пробок. Для этого к половозрелым самкам в вечернее время (после 18:00) подсаживали самцов, а на следующее утро (в 10:00) визуально оценивали наличие вагинальных пробок. Учитывая, что спаривание у мышей происходит преимущественно в темное время суток (в интервале 1:00–2:00 ночи), возраст эмбрионов в день обнаружения пробки оценивали приблизительно в 12 часов. Этот день принимали за первые сутки эмбрионального развития (0,5 суток после оплодотворения, *days post coitum*, dpc).

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.).

### **Гормональная стимуляция суперовуляции и получение ооцитов и эмбрионов**

Для проведения гормональной стимуляции использовали половозрелых самок мышей в возрасте от 2 месяцев. Введение гонадотропина сыворотки

жеребых кобыл (ГСЖК) осуществляли подкожно в дозе 5 МЕ на животное в интервале с 15:00 до 16:00. Спустя 46–48 часов производили инъекцию хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) в дозе 5 МЕ на животное. Органы репродуктивного тракта (яичники, яйцеводы и рога матки) извлекали через 20 часов после введения ХГЧ, очищали от крови и жировой ткани в фосфатно-солевом буфере Дульбекко (dPBS) и охлаждали до температуры 4 °С.

Очищенные яичники и яйцеводы переносили в свежую среду dPBS. Ооциты на стадии зародышевого пузырька (*germinal vesicle*, GV) выделяли путем механического разрушения антральных фолликулов яичника с использованием инъекционной иглы 29G. Зиготы извлекали посредством вскрытия ампулярной части яйцеводов, а бластоцисты получали путем вымывания из просвета маточных труб.

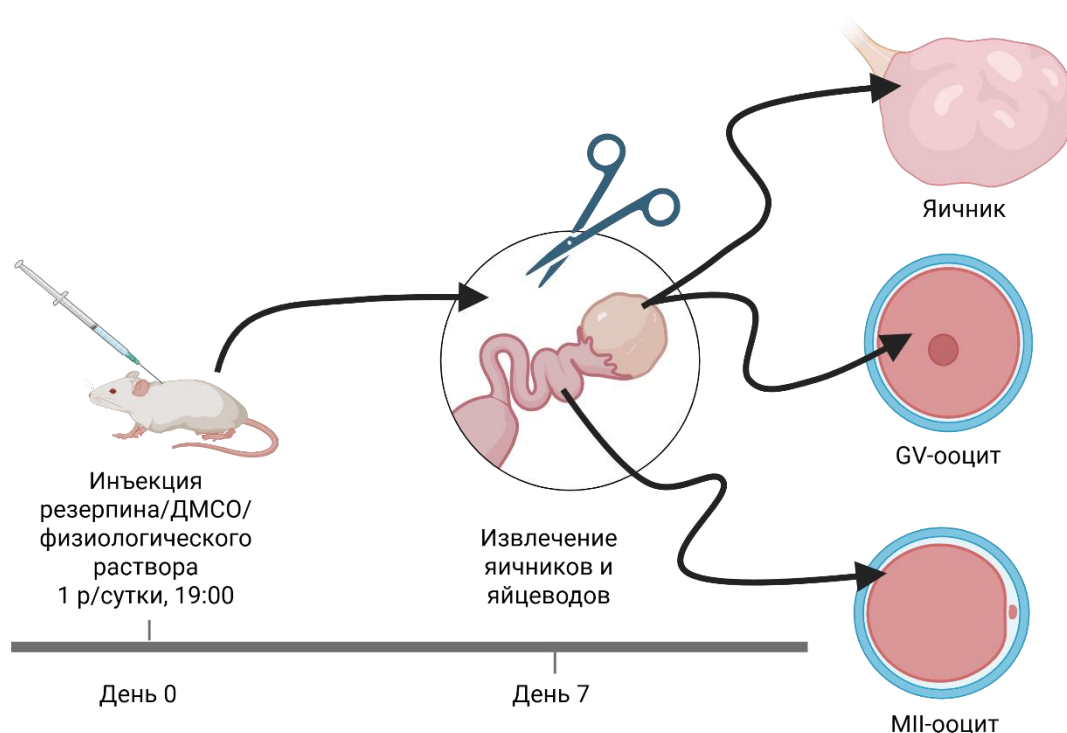
Полученные ооциты на стадиях GV и метафазы II (MII), находящиеся в составе ооцит-кумулясных комплексов, собирали с помощью стриппера и переносили в четырехлуночные планшеты со средой dPBS или KSOM. Для удаления клеток кумулюса (денудации) к культуре добавляли раствор гиалуронидазы (80 МЕ/мл) с последующей инкубацией при 37 °С в течение одной минуты. После очистки ооциты подвергали трехкратной отмывке в dPBS или KSOM и переносили в свежую культуральную среду KSOM.

Для получения эмбрионов *in vivo* стимулированных самок ссаживали с самцами на ночь. При обнаружении вагинальной пробки на следующее утро срок развития принимался за 0,5 дpc. Сбор эмбрионов на контрольных стадиях доимплантационного развития осуществляли на сроках 0,5 дpc (зигота), 2,5 дpc (морула) и 3,5 дpc (бластоциста).

#### Блокада везикулярного транспорта серотонина

Для оценки уровня накопления серотонина в условиях функциональной блокады везикулярного транспортера моноаминов VMAT2 животным экспериментальной группы ежедневно в течение 7 суток подкожно вводили

резерпин в дозе 1 мг/кг массы тела (Рис. 5). Выбор данной дозировки обоснован результатами предшествующих исследований, продемонстрировавших ее высокую эффективность (de Freitas et al., 2015). Кроме того, выбранная продолжительность фармакологического воздействия является достаточной для формирования пула ооцитов, прошедших полноценный цикл созревания (de Freitas et al., 2015). Животным контрольной группы вводили эквивалентный объем диметилсульфоксида (ДМСО), который применялся в качестве мышечного растворителя ввиду нерастворимости резерпина в физиологическом растворе.



**Рисунок 5.** Схема проведения эксперимента по фармакологической блокаде везикулярного транспортера моноаминов VMAT2.

По окончании экспериментального воздействия у самок каждой группы извлекали яичники: один яичник отбирали для количественного анализа моноаминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, а второй (контралатеральный) подвергали фиксации для изготовления криосрезов и последующего иммуногистохимического исследования. Для определения влияния резерпина на созревание половых клеток из яичников

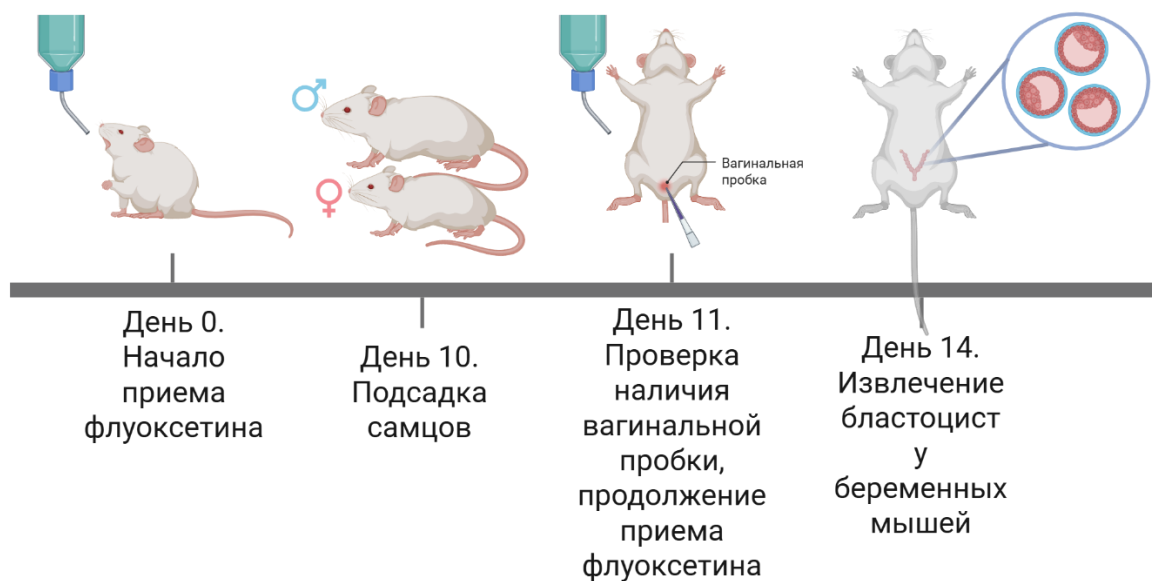
выделяли ооциты на стадии зародышевого пузырька (GV-ооциты), а из яйцеводов – зрелые ооциты на стадии метафазы II (MII-ооциты), после чего их фиксировали для иммуногистохимического анализа.

Эксперимент был проведен в 4 независимых повторностях. В итоговый анализ вошли данные, полученные от 24 животных (по 12 самок в контрольной и экспериментальной группах). Проанализировано 58 GV-ооцитов и 74 MII-ооцита контрольной группы, а также 81 GV-ооцит и 54 MII-ооцита экспериментальной группы. Количественный анализ заключался в измерении интенсивности иммунофлуоресцентного сигнала по параметру «Mean grey value» для каждого отдельного ооцита на медианном оптическом срезе. Полученные количественные данные были нормализованы и представлены на графиках в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего.

#### Блокада обратного захвата серотонина

Для проведения фармакологической блокады обратного захвата серотонина, опосредованного транспортером SERT, самкам мышей экспериментальной группы перорально вместе с питьевой водой вводили флуоксетина гидрохлорид в концентрации 0,13 мг/мл, что соответствует дозировке 20 мг/кг/сутки (Рис. 6). Выбранная концентрация находится в пределах терапевтического диапазона доз и применялась в соответствии с ранее описанными протоколами (Zha et al., 2019; Tkachenko et al., 2025). Животные контрольной группы получали чистую питьевую воду. В эксперименте были задействованы половозрелые самки мышей линии ICR в возрасте 2–2,5 месяцев (по 20 животных в каждой группе).

Потребление препарата или интактной воды животными осуществлялось на протяжении не менее 10 суток, после чего самок ссаживали с самцами для спаривания. При подтверждении оплодотворения по наличию вагинальной пробки, введение флуоксетина продолжали вплоть до стадии 3,5 dpc, на которой производилось извлечение бластоцист из маточных труб для последующей обработки и анализа.



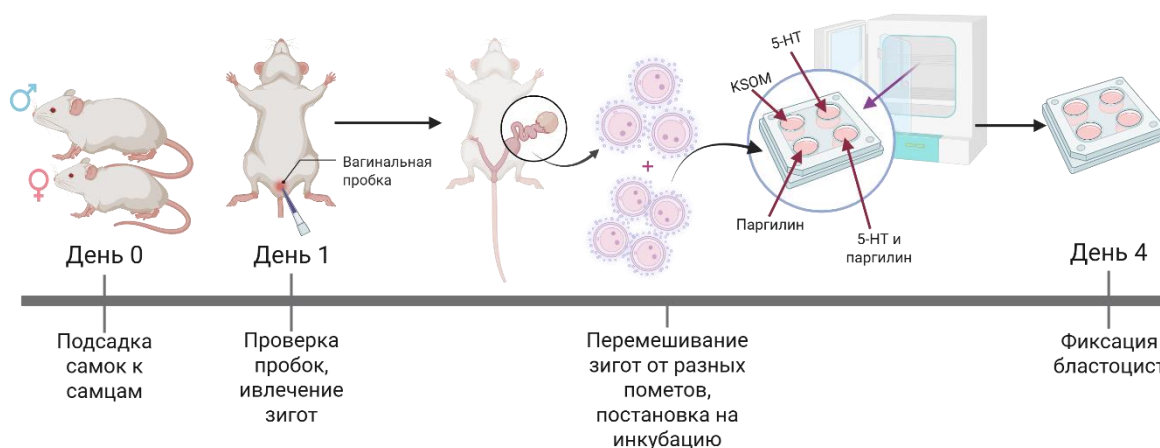
**Рисунок 6.** Схема проведения эксперимента по фармакологической блокаде транспортера обратного захвата серотонина SERT.

Эксперимент был выполнен в 3 независимых повторностях. В итоговый статистический анализ вошли результаты исследования 43 контрольных бластоцист (выделенных из 6 пометов) и 30 экспериментальных бластоцист (полученных из 5 пометов). Количественный анализ заключался в измерении интенсивности иммунофлуоресцентного сигнала по параметру «Mean grey value» для каждого отдельного эмбриона на медианном оптическом срезе. Полученные данные подвергались нормализации и представлены на графиках в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Дополнительные эксперименты по валидации эффективности ингибирования обратного захвата серотонина транспортером SERT в рамках данного исследования не проводились, поскольку фармакологическое действие применяемого препарата в аналогичных условиях было надежно подтверждено в предшествующих работах лаборатории.

#### Блокада фермента деградации серотонина

После выделения зигот и их очистки от клеток кумулюса эмбрионы культивировали *in vitro* в 4-луночных планшетах в стандартной среде KSOM

до достижения стадии двух бластомеров (1,5 дрс) или стадии бластоцисты (3,5 дрс) (Рис. 7).



**Рисунок 7.** Схема проведения эксперимента по фармакологической блокаде фермента деградации серотонина MAO-A.

Для индукции внутриклеточного накопления серотонина в культуральную среду вносили экзогенный серотонин (5-HT) в концентрации 1 мкМ и неселективный ингибитор моноаминоксидаз паргилин в концентрации 5 мкМ. Выбор данных концентраций обоснован результатами анализа литературных данных (Russell, Mayer, 1983; Nikishin et al., 2019) как оптимальных для достижения выраженного фармакологического эффекта. Контрольные группы составили эмбрионы, культивируемые исключительно в базовой среде KSOM, а также в среде KSOM с изолированным добавлением 1 мкМ 5-HT или 5 мкМ паргилина. По достижении целевой стадии развития эмбрионы подвергали фиксации для последующего иммуногистохимического анализа.

Эксперименты с доведением до стадии бластоцисты были выполнены в 11 независимых повторностях, а до стадии двух клеток – в 3 независимых повторностях. Для нивелирования эффекта помета перед началом культивирования зиготы, полученные от разных самок, объединяли в единый пул и рандомизировали. В итоговый статистический анализ вошли результаты исследования 87 бластоцист и 108 двухклеточных эмбрионов, полученных в общей сложности из 13 пометов. Количественный анализ заключался в

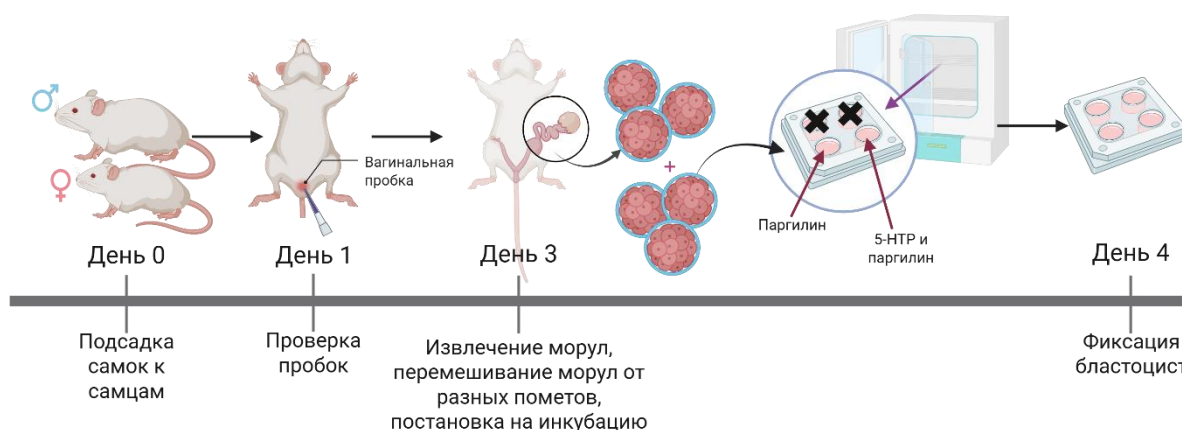
измерении интенсивности иммунофлуоресцентного сигнала по параметру «Mean grey value» для каждого отдельного эмбриона на медианном оптическом срезе. Полученные данные подвергались нормализации и представлены на графиках в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Фармакологическую блокаду MAO-A расценивали как успешную в том случае, если интенсивность флуоресценции в эмбрионах, инкубированных при сочетанном воздействии серотонина и паргилина, превышала аналогичный показатель в группах, подвергшейся воздействию исключительно экзогенного серотонина или паргилина, а также в группе, инкубировавшейся исключительно в среде KSOM.

#### Оценка эндогенного синтеза серотонина на доимплантационных стадиях

Для оценки способности эмбрионов к эндогенному синтезу серотонина (*de novo*) предварительно извлеченные из яйцеводов морулы (стадия 2,5 дрс) культивировали *in vitro* в среде с добавлением предшественника серотонина – 5-гидрокси-L-триптофана в концентрации 10 мкМ, а также ингибитора моноаминоксидаз паргилина в концентрации 5 мкМ (Рис. 8). Эффективность применения данных концентраций препаратов была показана в более ранних исследованиях (Nikishin et al., 2019). В качестве контрольных образцов использовали эмбрионы, инкубированные исключительно в присутствии 5 мкМ паргилина. По достижении стадии бластоцисты (3,5 дрс) эмбрионы подвергали фиксации для проведения последующего иммуногистохимического анализа.

Эксперимент был выполнен в 5 независимых повторностях. Для нивелирования эффекта помета перед началом культивирования морулы, полученные от разных самок, объединяли в единый пул и рандомизировали. В итоговый статистический анализ были включены данные по 73 эмбрионам, полученным в общей сложности из 11 пометов. Количественный анализ заключался в измерении интенсивности иммунофлуоресцентного сигнала по

параметру «Mean grey value» для каждого отдельного эмбриона на медианном оптическом срезе. Полученные данные подвергались математической нормализации и представлены на графиках в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Активацию эндогенного синтеза расценивали как успешную в том случае, если интенсивность флуоресценции в образцах, инкубированных при совместном воздействии предшественника серотонина 5-НТР и паргилина, превышала аналогичный показатель в группе, где инкубация проходила только в присутствии паргилина.



**Рисунок 8.** Схема эксперимента по исследованию эндогенного синтеза серотонина.

### Оценка опосредованного трансглутаминазами механизма серотонилирования на доимплантационных стадиях

В рамках исследования уровня серотонилирования гистона H3 была проведена отдельная серия экспериментов для подтверждения ферментативной, опосредованной трансглутаминазами, природы наблюдаемой модификации с использованием ингибитора широкого спектра действия цистамина. После выделения зигот и их очистки от клеток кумулюса эмбрионы культивировали *in vitro* в 4-луночных планшетах в стандартной среде KSOM до достижения стадии бластоцисты (3,5 дрс). Для оценки активности трансглутаминаз в культуральную среду вносили 1 мкМ серотонина (5-НТ), 5 мкМ паргилина и 10 мкМ цистамина. Контрольные

группы составили эмбрионы, культивируемые исключительно в базовой среде KSOM, а также в среде KSOM с добавлением комбинации 1 мкМ 5-НТ и 5 мкМ паргилина или с изолированным внесением 10 мкМ цистамина. Выбор применяемой концентрации цистамина основывался на литературных данных (Ivashkin et al., 2019) и был обусловлен достижением выраженного и стабильного ингибирующего эффекта. Поскольку цистамин выступает неселективным ингибитором трансглутаминаз, использование обработанных им образцов позволило провести качественную оценку функциональной активности ферментативного аппарата, осуществляющего процесс серотонилирования. По достижении стадии бластоцисты эмбрионы фиксировали для последующего иммуногистохимического анализа с применением специфических антител против H3Q5ser.

Эксперимент был выполнен в 3 независимых повторностях. Для нивелирования эффекта помета перед началом культивирования зиготы, полученные от разных самок, объединяли в единый пул и рандомизировали. В итоговый статистический анализ вошли результаты исследования 134 бластоцист, полученных в общей сложности из 18 пометов. Количественный анализ заключался в измерении интенсивности иммунофлуоресцентного сигнала по параметру «Mean grey value» для каждого отдельного эмбриона на медианном оптическом срезе. Полученные данные подвергались нормализации и представлены на графиках в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Ферментативную активность трансглутаминаз расценивали как надежно подтвержденную в том случае, если интенсивность флуоресценции в образцах, инкубированных при сочетанном воздействии серотонина и паргилина, достоверно превышала аналогичные показатели в группах, подвергшихся воздействию только цистамина, а также комбинации серотонина, паргилина и цистамина.

### Моделирование имплантации эмбрионов *in vitro*

Для оценки способности эмбрионов к имплантации в условиях *in vitro* выделенные зиготы первоначально культивировали до стадии бластоцисты (4,5 dpc) в базовой среде KSOM (контрольная группа) или в среде KSOM с сочетанным добавлением 1 мкМ серотонина (5-НТ) и 5 мкМ паргилина (экспериментальная группа). Впоследствии эмбрионы переносили в специализированную культуральную среду, индуцирующую процесс имплантации (Shahbazi et al., 2016). Дальнейшую инкубацию проводили в течение 4 суток до достижения стадии, эквивалентной 8,5 дням эмбрионального развития (8,5 dpc). По завершении этапа культивирования распластавшиеся эмбрионы фиксировали для последующего морфометрического исследования.

Эксперимент был выполнен в 3 независимых повторностях. С целью нивелирования эффекта помета перед началом культивирования зиготы, полученные от разных самок, объединяли в единый пул и рандомизировали. В итоговый статистический анализ вошли результаты исследования 81 имплантировавшейся бластоцисты, полученной в общей сложности из 15 пометов. Количественная оценка функциональной полноценности имплантации заключалась в измерении конечной площади распластывания для каждой бластоцисты. Полученные данные подвергались математической обработке, нормализации и представлены на графиках в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего.

### **Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени**

Выделение тотальной РНК из исследуемых эмбрионов осуществляли гуанидинизотиоцианат-фенол-хлороформным методом с использованием реагентов компании «Евроген» (Россия). Для исключения контаминации геномной ДНК полученные образцы обрабатывали препаратом ДНКазы I

(Thermo Fisher Scientific, США). Реакцию обратной транскрипции и синтез кДНК проводили с применением случайных гексамерных праймеров (random hexamers) и обратной транскриптазы MMLV (модификация Magnus, «Евроген»). Количественную ПЦР в реальном времени выполняли на амплификаторе StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific) с использованием готовой реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR + HighROX («Евроген»). Расчет относительного уровня экспрессии генов производили по методу  $2^{-\Delta Ct}$ . В качестве эндогенного контроля для нормализации данных использовали среднее геометрическое значений экспрессии двух референсных генов *Rps18* и *Tbp*. Последовательности использованных олигонуклеотидных праймеров представлены в таблице 2.

**Таблица 2.** Последовательности олигонуклеотидных праймеров, использованных для количественной ПЦР.

Наименование гена	NCBI Gene ID	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>Cdx2</i>	12591	AGTCCCTAGGAAGCCAAGTGAA	TCTCGGAGAGCCCAAGTGT
<i>Ddc</i>	13195	AGCGGGAAGCCTTTATCTCTGTCT	CCTCCGGGCCTGTGTAGTGTCT
<i>Gata6</i>	14465	ATGCATGCGGTCTCTACAGC	CCCTCAGCATTTCTACGCCA
<i>Maoa</i>	17161	GCTGAGGAATGGGACAAGATAACC	TACCTCCACACTGCCTCACATAACC
<i>Nanog</i>	71950	CAGATGCAAGAACTCTCCTCCA	CAGATGCGTTCACCAGATAGC
<i>Oct4</i>	18999	TGGAGGAAGCCGACAACAAT	AACCATACTCGAACCACATCCTT
<i>Rps18</i>	20084	AAGAAAATTCGAGCCCATAGAGG	TAACAGCAAAGGCCCAGAGACT
<i>Sox2</i>	20674	TTTGTCCGAGACCGAGAAGC	CTCCGGGAAGCGTGTACTTA
<i>Tbp</i>	21374	GTAGCGGTGGCGGGTATCT	CGTCTTCAATGTTCTGGGTATCT
<i>Tph1</i>	21990	TGCGACATCAGCCGAGAACAGT	GCGCAGAAGTCCAGGTCAGA
<i>Tph2</i>	216343	CATGGCTCCGACCCCTCTACA	ATACGCCCGCAGTTGACCCTCTT

Во всех молекулярно-генетических экспериментах независимой биологической повторностью считался единый пул эмбрионов (один помет), включавший от 4 до 19 бластоцист, полученных от одной самки. При оценке влияния флуоксетина на уровень транскрипции ферментов эндогенного синтеза серотонина генетический анализ был проведен на выборке из 61 контрольного эмбриона (6 пометов) и 42 экспериментальных эмбрионов (5

пометов). В серии экспериментов по изучению экспрессии маркеров плюрипотентности и первичной клеточной спецификации на фоне сочетанного воздействия экзогенного серотонина и паргилина в анализ вошли 36 контрольных эмбрионов (4 помета) и 34 экспериментальных эмбриона (4 помета). Оценка транскрипционного профиля аналогичных маркеров спецификации и плюрипотентности после перорального введения флуоксетина включала данные по 71 эмбриону контрольной группы (7 пометов) и 56 эмбрионам экспериментальной группы (7 пометов).

### **Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)**

Количественное определение содержания серотонина в ткани яичников проводили методом ВЭЖХ с электрохимическим детектированием. Данный подход является высокочувствительным методом, позволяющим достоверно анализировать концентрации моноаминов и их метаболитов вплоть до значений порядка  $10^{-9}$  моль/л (Guiard, Gotti, 2024). Предварительно замороженные образцы биологической ткани подвергали гомогенизации в 120 мкл 0,1 N раствора хлорной кислоты, содержащего 10 пмоль/мл гидробромида 3,4-дигидроксибензиламина (ДГБА) в качестве внутреннего стандарта. Полученный гомогенат центрифугировали при ускорении 2000 g в течение 20 минут при температуре 4 °C.

Хроматографическое разделение компонентов осуществляли на обращенно-фазовой колонке ReproSil-Pur при стабилизированной температуре +30 °C. Скорость потока подвижной фазы составляла 1 мл/мин и поддерживалась с помощью модульной системы жидкостного хроматографа 1260 Infinity II. В состав элюента (подвижной фазы) входили: 0,1 M цитратно-фосфатный буфер, 0,3 mM октансульфонат натрия, 0,1 mM ЭДТА и 8% ацетонитрила; уровень pH раствора составлял 2,9. Для регистрации сигнала применяли электрохимический детектор Decade II, оснащенный стеклоуглеродным рабочим электродом (рабочий потенциал +0,85 В) и

хлорсеребряным электродом сравнения (Ag/AgCl). Идентификацию хроматографических пиков серотонина и внутреннего стандарта проводили путем сопоставления их времени удерживания с аналогичными параметрами в калибровочном стандартном растворе.

Обработку хроматографических данных и интегрирование пиков выполняли в специализированном программном обеспечении Agilent OpenLab CDS Chromatography Software (Agilent, США). Процедура математической трансформации хроматограммы в численные значения включала построение базовой линии — уровня фонового сигнала электрода при протекании чистой подвижной фазы. Вычисление итогового значения осуществлялось путем интегрирования сигнала детектора: программа рассчитывала площадь фигуры под кривой хроматографического пика, ограниченной точками начала подъема сигнала и возврата к выровненной базовой линии, с компенсацией возможного дрейфа (наклона) нулевого уровня. Полученная площадь пика строго пропорциональна количеству окисленного на электроде вещества.

Итоговое содержание серотонина рассчитывали методом внутреннего стандарта, используя отношение преобразованных площадей пиков в стандартной калибровочной смеси и в анализируемом образце по следующей формуле:

$$C_{5\text{-HT}_{\text{пр}}} = \frac{S_{5\text{-HT}_{\text{пр}}} \cdot S_{\text{ДГБА}_{\text{ст}}}}{S_{\text{ДГБА}_{\text{пр}}} \cdot S_{5\text{-HT}_{\text{ст}}}} \cdot C_{\text{ДГБА}_{\text{пр}}}$$

где  $C_{5\text{-HT}_{\text{пр}}}$  — искомая концентрация серотонина в пробе,  $S_{5\text{-HT}_{\text{пр}}}$  — площадь хроматографического пика серотонина в пробе,  $S_{\text{ДГБА}_{\text{пр}}}$  — площадь пика ДГБА (внутреннего стандарта) в пробе,  $S_{\text{ДГБА}_{\text{ст}}}$  — площадь пика ДГБА в стандартном растворе,  $S_{5\text{-HT}_{\text{ст}}}$  — площадь пика серотонина в стандартном растворе,  $C_{\text{ДГБА}_{\text{пр}}}$  — известная концентрация внесенного ДГБА в пробе.

## **Вестерн-блоттинг**

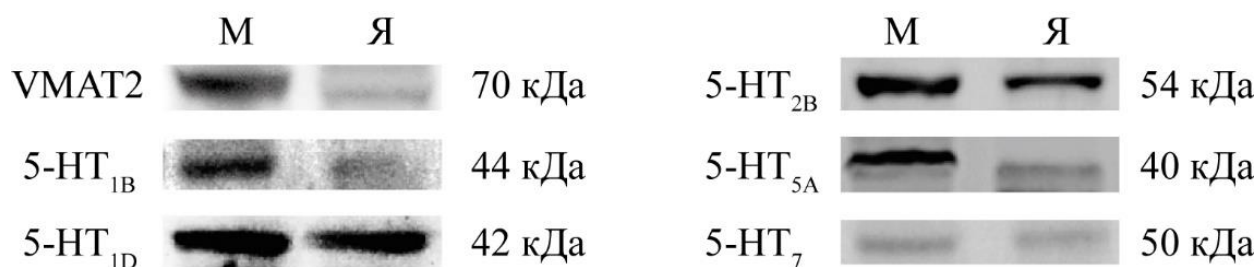
Для подтверждения специфичности связывания антител, использовавшихся в экспериментах с применением конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, был выполнен вестерн-блот-анализ лизатов тканей мозга (гиппокамп) и яичников на наличие везикулярного транспортера моноаминов VMAT2, а также серотониновых рецепторов 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>5A</sub> и 5-HT<sub>7</sub>. Тканевые образцы гомогенизировали в лизирующем буфере RIPA, после чего концентрацию общего белка определяли с использованием коммерческого набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

Подготовленные образцы денатурировали в буфере Лэммли в течение 30 минут при температуре 37 °С. Разделение белков осуществляли методом электрофореза в 10%-м полиакриламидном геле. Перенос белковых фракций на поливинилиденфторидную (PVDF) мембрану Immun-Blot® проводили с использованием системы для «мокрого» электропереноса Mini-PROTEAN (Bio-Rad Laboratories, Inc., США).

Для предотвращения неспецифического связывания антител мембраны блокировали в 5%-м растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем следовал этап инкубации с первичными антителами (в разведениях от 1:500 до 1:20000; применялись те же антитела, что и для иммуногистохимического анализа) в течение 1 часа при комнатной температуре. После серии отмывок в буфере TBST мембраны инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch, кат. № 111-035-003, разведение 1:20000), на протяжении 1 часа при комнатной температуре.

По завершении финальной отмывки в TBST иммунореактивные полосы визуализировали методом усиленной хемилюминесценции в рабочем растворе, содержащем 0,1 М Трис-HCl (pH 8,5), 12,5 мМ люминола, 2 мМ *p*-кумаровой кислоты и 0,09% пероксида водорода. Регистрацию сигнала осуществляли с применением системы визуализации и гель-

документирования Fusion-FX Edge V0.70/SPECTRA RGB. Полученные цифровые изображения (Рис. 9) анализировали в программном обеспечении Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Inc.).



**Рисунок 9.** Компоненты серотонинергической системы, выявленные в мозге и яичнике мыши методом Вестерн-блоттинга. М – мозг (гиппокамп), Я – яичник.

### Иммуногистохимия

Для проведения иммунофлуоресцентного анализа ооциты и эмбрионы фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида (PFA), приготовленном на фосфатно-солевом буфере (PBS), в течение 1 часа при комнатной температуре или в течение ночи при 4 °С. После фиксации и отмывки тканевые образцы подвергали криопротекции, последовательно инкубируя их в 15%-м растворе сахарозы (1 час при комнатной температуре) и 30%-м растворе сахарозы (в течение ночи при 4 °С). Затем ткань заключали в специализированную среду для замораживания Tissue-Tek O.C.T. Compound и замораживали в гексане, предварительно охлажденном парами жидкого азота до температуры -40 °С. Изготовление серийных криосрезов толщиной 10-18 мкм производили с помощью криостата Leica CM1900 (ЦКП ИБР РАН). Срезы монтировали на предметные стекла, обработанные желатином, высушивали в течение 2 часов при комнатной температуре, после чего отмывали от заливочной среды в растворе PBST (PBS с добавлением 0,1% детергента Triton X-100) на протяжении 5 минут.

Ооциты, эмбрионы, а также стекла с криосрезами промывали в буфере PBST и обрабатывали 1%-м раствором додецилсульфата натрия (SDS) с целью удаления блестящей оболочки и демаскирования антигенов, затем повторно

отмывали в PBST. Для предотвращения неспецифического связывания антител препараты инкубировали в течение 1 часа в блокирующем растворе, содержащем 3% бычьего сывороточного альбумина (BSA), 1% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), 0,1% Triton X-100 и 0,01% Tween-20 на базе 0,01 М PBS (pH 7,4). Далее образцы помещали во влажную камеру и инкубировали в течение ночи при температуре 4 °С со специфическими первичными антителами, разведенными в блокирующем растворе (подробная информация представлена в таблице 3).

На следующий день препараты троекратно отмывали в буфере PBST и инкубировали в растворе конъюгированных с флуорохромами вторичных антител (в PBST) в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте. Опционально часть эмбрионов после инкубации со вторичными антителами подвергали контрастирующему окрашиванию ядерным красителем DAPI (Merck KGaA, Германия) для визуализации клеточных ядер и конъюгатами фаллоидина (Merck KGaA, Германия) для выявления актиновой сети микрофиламентов. Специфичность иммуноокрашивания в каждой серии экспериментов контролировалась путем постановки отрицательного контроля путем инкубации аналогичных образцов без добавления первичных антител. По завершении инкубации и финальной отмывки образцы заключали под покровное стекло в монтирующую среду Mowiol для последующего микроскопического анализа.

**Таблица 3.** Перечень антител, использованных для иммуногистохимического анализа.

<b>Антитела, производитель, каталожный номер</b>	<b>В каком животном произведены</b>	<b>Разведение</b>
Первичные антитела		
Антитела против 5-HT (Sigma-Aldrich, S5545)	Кролик	1:1000
Антитела против VMAT2 (Invitrogen, Waltham, MA, USA, PA5-77496)	Кролик	1:1000

Антитела против рецептора 5-HT <sub>1B</sub> (ABclonal, Ухань, Китай, A18285)	Кролик	1:1000
Антитела против рецептора 5-HT <sub>1D</sub> (Invitrogen, Калифорния, США, PA5-95901)	Кролик	1:1000
Антитела против рецептора 5-HT <sub>2B</sub> (ABclonal, Ухань, Китай, A5670)	Кролик	1:1000
Антитела против рецептора 5-HT <sub>7</sub> (ABclonal, Ухань, Китай, A1976)	Кролик	1:1000
Антитела против моноаминоксидазы А (Abscam, Кэмбридж, Великобритания, ab126751)	Кролик	1:1000
Антитела против серотонилированного гистона H3 H3Q5ser (ABclonal, Ухань, Китай, A20210)	Кролик	1:200
Вторичные антитела		
FITC-конъюгированные антитела против IgG кролика (Jackson ImmunoResearch, Кембридж, Великобритания, 111-095-003)	Коза	1:200
555 – антитела против IgG кролика (ABclonal, Ухань, Китай, A5058)	Коза	1:300

### **Прижизненная визуализация функциональной активности митохондрий и уровня генерации активных форм кислорода (АФК)**

Для комплексной оценки физиологического статуса эмбрионов живые бластоцисты инкубировали со специфическими флуоресцентными зондами в течение 30 минут при температуре 37 °С. Для детекции мембранного потенциала митохондрий применяли краситель LumiTracker Mito Orange (в

разведении 1:1000, Lumiprobe, Россия, кат. № 2252). Выявление внутриклеточного пула активных форм кислорода осуществляли с использованием зонда 6-Carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA (в разведении 1:1000, Lumiprobe, Россия, кат. № 3290). Микроскопическую визуализацию и регистрацию флуоресцентного сигнала проводили незамедлительно по окончании этапа инкубации, *in vivo*, без предварительной химической фиксации образцов.

### **Обработка и анализ изображений**

Для определения пространственного распределения исследуемых компонентов интактные GV-ооциты, зиготы и бластоцисты подвергали иммуногистохимическому окрашиванию специфическими антителами. Полученные оптические срезы использовали для детального анализа локализации иммунопозитивного сигнала в цитоплазме ооцитов и зигот, а также для сравнительной оценки интенсивности флуоресценции в клетках трофэктодермы и внутренней клеточной массы бластоцист.

Конфокальную лазерную сканирующую микроскопию осуществляли с применением микроскопических систем Zeiss LSM 880 Airyscan (Carl Zeiss AG, Оберкохен, Германия), Leica TCS SP5, и Olympus Fluoview FV10i (Olympus Corp., Токио, Япония). Обзорную флуоресцентную микроскопию выполняли на приборе Leica Thunder Imager (Leica Microsystems, Вецлар, Германия). Для обеспечения строгого количественного сравнения все препараты в рамках одной экспериментальной серии сканировались на одном и том же приборе при идентичных аппаратных настройках: использовались объективы с одинаковой числовой апертурой, фиксированный размер конфокальной диафрагмы (pinhole), постоянная мощность лазерного излучения и чувствительность детекторов. Калибровка параметров визуализации всегда проводилась по препарату экспериментальной группы, демонстрирующему наиболее интенсивный специфический оптический сигнал. Впоследствии регистрация флуоресценции во всех остальных группах

данного эксперимента выполнялась при зафиксированных настройках, что исключало инструментальную погрешность при межгрупповом сравнении.

Цифровую обработку и количественную оценку микрофотографий выполняли в программной среде FIJI/ImageJ 2.9.0/1.54f. Уровень иммунореактивности оценивали по параметру средней интенсивности флуоресценции (Mean Gray Value) в выделенных областях интереса. Перед проведением денситометрического анализа исследуемые изображения конвертировались в монохромный 8-битный формат (режим градаций серого). В иллюстративных материалах работы исходным черно-белым изображениям для большей наглядности программным способом присвоены псевдоцвета.

Методология количественного анализа зависела от стадии развития. При оценке GV-ооцитов, МП-ооцитов и зигот на экваториальном оптическом срезе выделяли три независимые репрезентативные зоны (ROI) в цитоплазме, строго избегая захвата кариоплазмы (ядра). Медианный оптический срез тестируемой клетки выбирали из центральной части серии Z-проекций во избежание включения краевых артефактов сферических структур. Для каждой выделенной зоны регистрировали интенсивность сигнала, после чего рассчитывали усредненное значение для индивидуального ооцита или зиготы.

При анализе бластоцист по аналогичному протоколу измерения проводили отдельно для популяции клеток трофэктодермы и клеток внутренней клеточной массы, что позволяло проводить их независимое статистическое сравнение. При исследовании изменений уровня серотонилированного гистона H3 в бластоцистах стандартный протокол денситометрии цитоплазматического компартмента был расширен: проводилось дополнительное прицельное измерение интенсивности флуоресцентного сигнала непосредственно в ядерных зонах как клеток трофэктодермы, так и клеток ВКМ.

## Статистический анализ

В рамках каждой экспериментальной серии специфическому окрашиванию подвергали от 15 до 30 объектов, полученных не менее чем в трех независимых биологических повторностях. С целью полного нивелирования искажающего влияния индивидуальных особенностей конкретного помета на итоговые количественные показатели, для постановки каждого эксперимента отбирали эмбрионы из 2–8 различных пометов. Полученные клетки объединяли в единый пул, после чего методом рандомизации формировали контрольную и экспериментальные группы.

Для каждого исследуемого эмбриона или ооцита получали одиночное репрезентативное конфокальное изображение, соответствующее медианному оптическому срезу; в качестве альтернативы из серии полученных Z-проекций прицельно отбирали одну фокальную плоскость, проходящую через экваториальную (серединную) часть объекта.

Статистическую обработку и визуализацию полученных результатов выполняли в программном комплексе GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США). Поскольку распределение значений в анализируемых выборках не удовлетворяло критериям нормальности, для оценки достоверности различий применяли методы непараметрической статистики. При попарном сравнении групп использовали критерий Манна-Уитни (U-тест) для независимых (несвязанных) выборок и критерий Вилкоксона для зависимых (связанных) образцов. Проверку статистических гипотез при множественных сравнениях осуществляли с применением критерия Краскела-Уоллиса. В экспериментах сложного дизайна, где требовалась одновременная оценка влияния двух независимых факторов (например, оценка стадии развития ооцита совместно с топической локализацией сигнала), применяли стандартный двухфакторный дисперсионный анализ (Two-Way ANOVA), дополненный апостериорным критерием множественных сравнений Шидака (Sidak's multiple comparisons

test). Во всех проведенных тестах порог статистической значимости (альфа-уровень) был установлен на значении  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

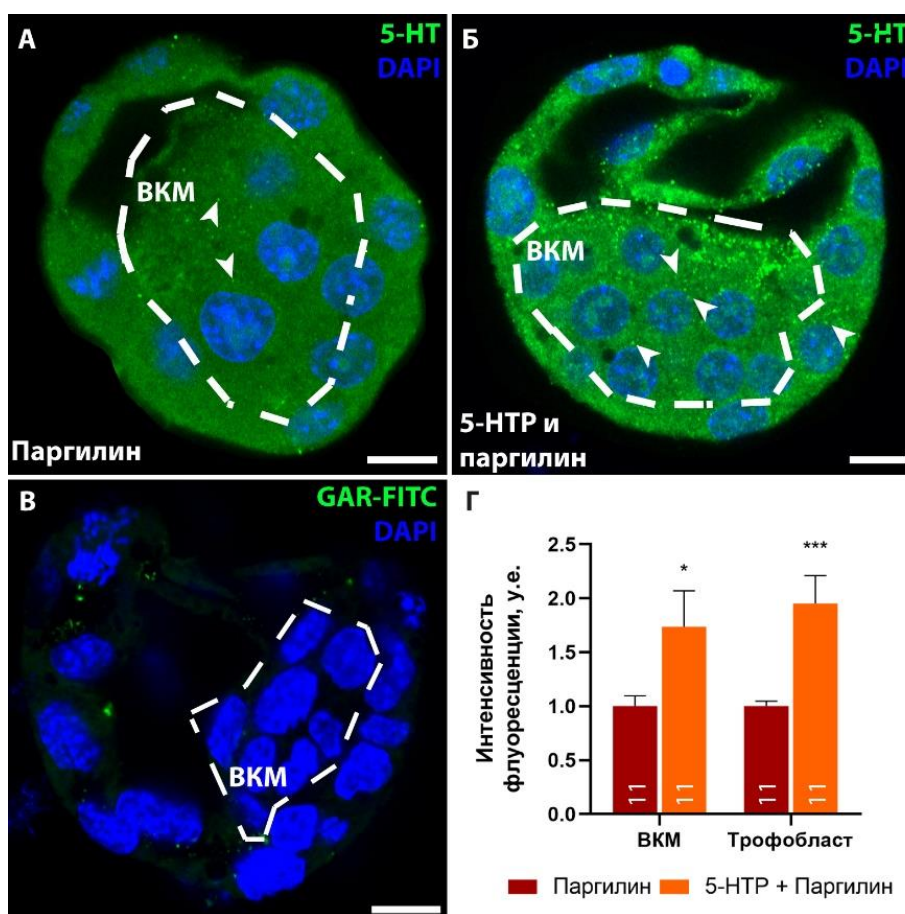
### Источники серотонина в ранних эмбрионах

В качестве главного источника серотонина для ооцитов и доимплантационных эмбрионов описан захват серотонина из межклеточной среды посредством специфического мембранного транспортера SERT. Однако, наряду с этим, не исключается вероятность эндогенного синтеза серотонина самими эмбрионами. Для изучения вклада данного механизма была проведена серия экспериментов по оценке возможности синтеза серотонина *de novo*. Для этого эмбрионы, начиная со стадии морулы, инкубировали в среде, содержащей предшественник серотонина 5-гидрокситриптофан, с последующим иммуногистохимическим анализом внутриклеточной локализации серотонина (Рис. 8). Инкубация проводилась в присутствии ингибитора моноаминоксидазы паргилина для предотвращения быстрой деградации синтезируемого серотонина. Анализ выявил достоверное увеличение интенсивности флуоресцентного сигнала серотонина в экспериментальной группе по сравнению с контрольной, как в клетках трофэктодермы, так и в клетках внутренней клеточной массы (Рис. 10). Таким образом, получены свидетельства функциональной активности фермента синтеза серотонина декарбоксилазы ароматических L-аминокислот уже на доимплантационных этапах онтогенеза.

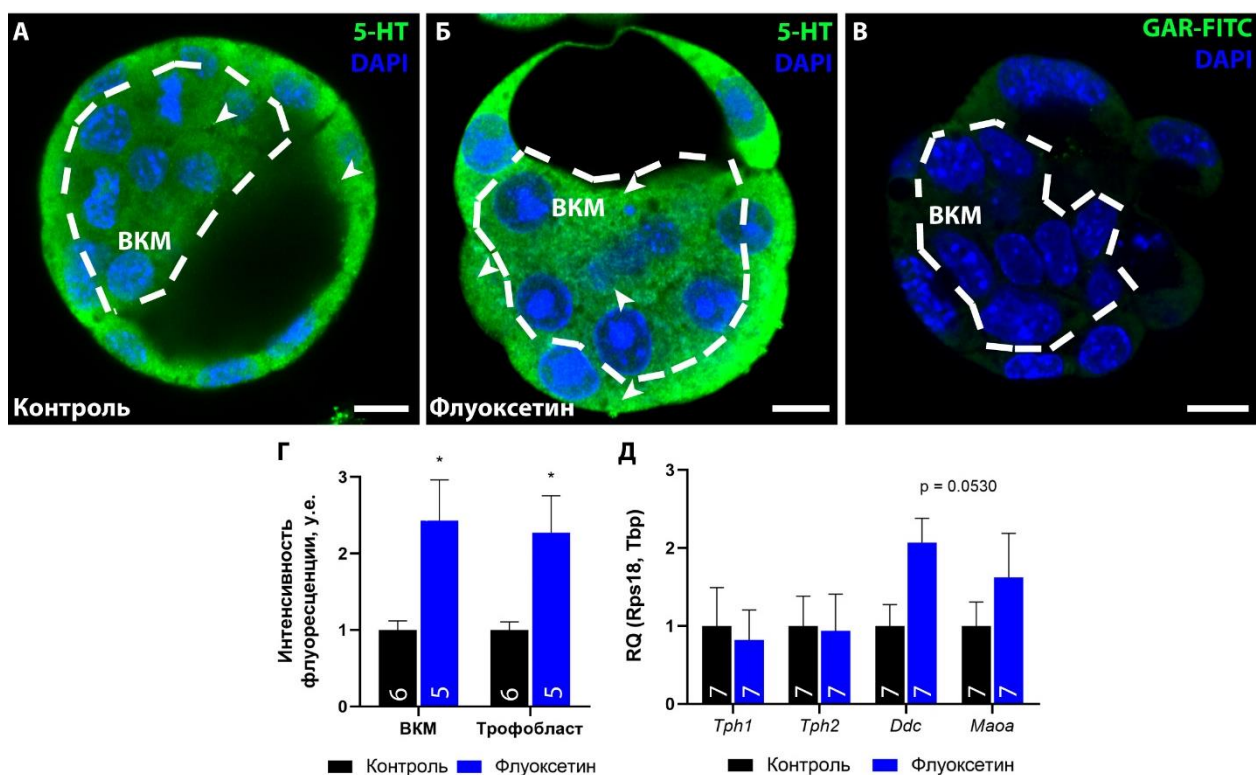
На следующем этапе изучалось влияние дефицита материнского серотонина на процессы раннего эмбриогенеза. Для этого применяли селективный ингибитор транспортера SERT флуоксетин, препятствующий захвату серотонина клетками из окружающей среды. Ранее уже было продемонстрировано, что системное введение флуоксетина снижает концентрацию серотонина не только в сыворотке крови, но также и в тканях яичников, ооцитах и репродуктивном тракте (Alyoshina et al., 2022, 2023).

В рамках данного эксперимента 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 сут. (3,5 дрс) (Рис. 6). Предполагалось, что у эмбрионов экспериментальной группы иммунореактивность 5-НТ будет снижена по сравнению с контрольной группой, поскольку фармакологическая блокада транспортера SERT должна препятствовать захвату серотонина эмбрионом из тканей репродуктивного тракта. Однако 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. 11А-Г).



**Рисунок 10. Анализ эндогенного синтеза серотонина в доимплантационных эмбрионах.** А–В – иммуногистохимическое выявление серотонина в бластоцистах. А – контроль; Б – накопление серотонина при инкубации в среде с добавлением 5-НТP; В – негативный контроль (без первичных антител). Пунктирная линия обозначает зону ВКМ, белые стрелки указывают на точечные участки повышенной иммунореактивности. Масштаб: 10 мкм. Г – количественный анализ иммунореактивности 5-НТ в бластоцистах. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  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 (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).



**Рисунок 11. Влияние флуоксетина на содержание серотонина в доимплантационных эмбрионах.** А–В – иммуногистохимическое выявление серотонина в бластоцистах. А – контроль; Б – накопление серотонина в бластоцистах при воздействии флуоксетина; В – негативный контроль (без первичных антител). Пунктирная линия обозначает зону ВКМ, белые стрелки указывают на точечные участки повышенной иммунореактивности. Масштаб: 10 мкм. Г – количественный анализ иммунореактивности 5-НТ в бластоцистах. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Цифры на гистограммах указывают количество экспериментальных повторностей (пометов). Звездочками отмечены статистически значимые различия между группами согласно критерию Манна–Уитни (\*  $p < 0,05$ ). Д – 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*. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Цифры на гистограммах указывают количество экспериментальных повторностей (пометов). Статистически значимых различий между группами не выявлено (критерий Манна–Уитни), для гена *Ddc* отмечена тенденция к значимости ( $p = 0,0530$ ).

Для выяснения молекулярных механизмов данного эффекта был проведен количественный анализ экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты синтеза и деградации серотонина: триптофангидроксилаз *Trp1* и *Trp2*, декарбоксилазы ароматических L-аминокислот *Ddc* и моноаминоксидазы А *Maoa*. В результате статистической обработки полученных данных не было выявлено достоверных различий в уровне

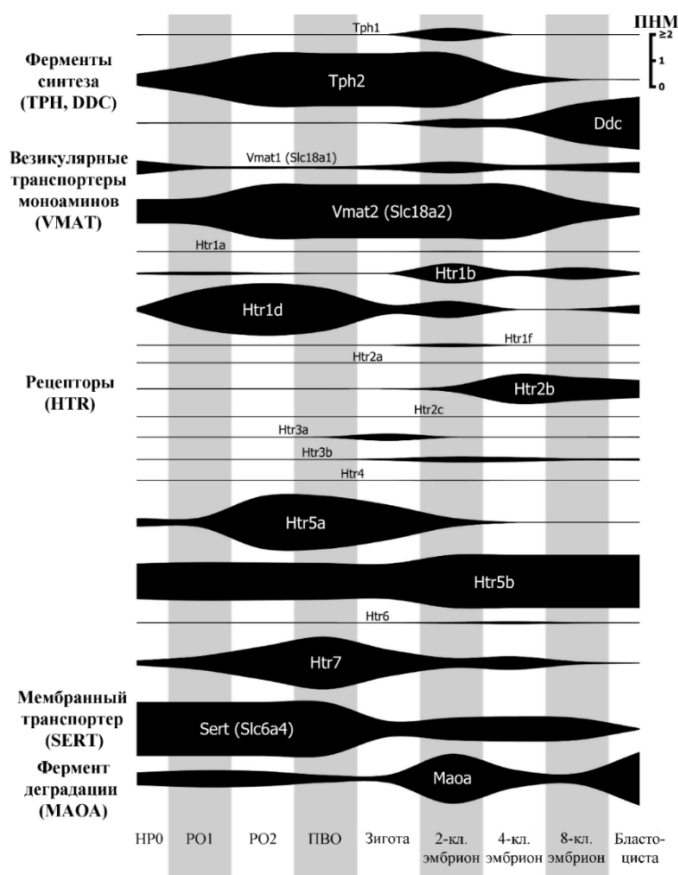
экспрессии мРНК этих генов (*Tph1*:  $p = 0,7104$ ; *Tph2*:  $p > 0,9999$ ; *Maoa*:  $p = 0,5350$ ). Однако, наблюдалась выраженная тенденция к повышению уровня экспрессии мРНК гена *Ddc* у эмбрионов, полученных от самок, принимавших флуоксетин ( $p = 0,0530$ , Рис. 11Д). Полученные результаты свидетельствуют 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.

### **Анализ компонентного состава серотонинергической сигнальной системы в раннем эмбриогенезе**

С целью выявления компонентов серотонинергической системы, присутствующих в оогенезе и на ранних стадиях эмбрионального развития, первоначально был проведен анализ опубликованных транскриптомных данных о динамике экспрессии мРНК у мышей (Veselovska et al., 2015; Qiao et al., 2020). Обобщенные профили, отражающие относительное количество транскриптов генов рецепторов и транспортеров серотонина на последовательных стадиях развития, схематически представлены на Рисунке 12.

Анализ транскриптомных данных продемонстрировал последовательный характер экспрессии ферментов, вовлеченных в синтез серотонина. На протяжении оогенеза и вплоть до стадии четырехклеточного эмбриона наблюдалась высокая экспрессия мРНК триптофангидроксилазы 2 (*Tph2*), катализирующей первый этап синтеза серотонина. В то же время транскрипция гена второго фермента пути декарбоксилазы ароматических L-аминокислот (*Ddc*) не достигала функционально значимых уровней вплоть до стадии восьми бластомеров. Помимо этого, в период оогенеза и раннего эмбриогенеза регистрировался высокий уровень экспрессии мРНК мембранного транспортера серотонина Sert (*Slc6a4*), везикулярного

транспортера моноаминов *Vmat2 (Slc18a2)*, а также ключевого фермента деградации моноаминоксидазы А (*Maoa*).



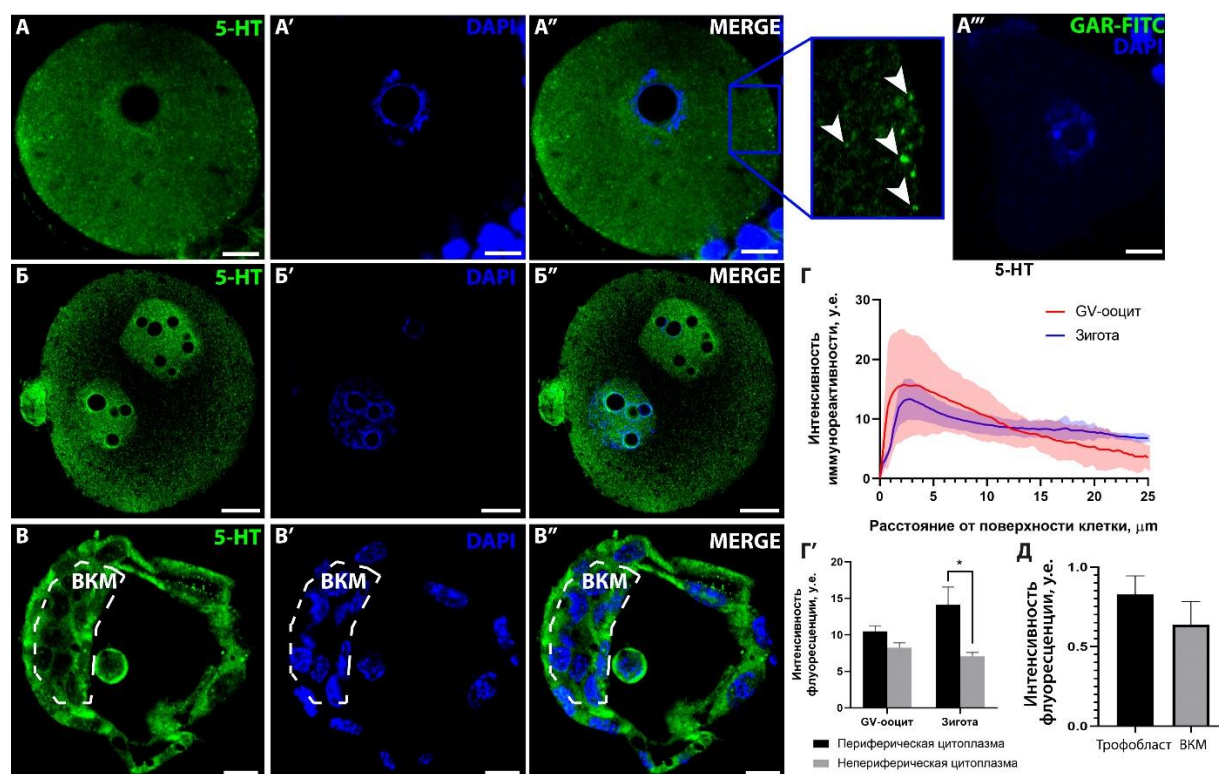
**Рисунок 12.** Анализ данных транскриптомных исследований, выполненных на ооцитах мышей и доимплантационных эмбрионах. Уровень экспрессии всех генов представлен в единой шкале. Значения выражены в единицах ПНМ (прочтений на миллион), отражающих нормализацию данных по общему количеству РНК. Затенение применено для визуального разделения стадий развития. Стадии оогенеза: NP0 – нерастущие ооциты; PO1 – растущие ооциты мышей через 8–14 дней после рождения (дпр); PO2 – растущие ооциты мышей через 15 дпр; PBO – полностью выросшие ооциты взрослых мышей. Исходные данные заимствованы из работ Veselovska et al., 2015; Qiao et al., 2020.

Среди 14 серотониновых рецепторов, идентифицированных у мышей, для ряда подтипов была характерна высокая экспрессия мРНК в период оогенеза и на начальных этапах дробления. В частности, транскрипты рецептора *Htr5b* стабильно экспрессировались на протяжении всего оогенеза вплоть до стадии бластоцисты, тогда как пики экспрессии *Htr1d*, *Htr5a* и *Htr7* приходились непосредственно на период оогенеза, а *Htr1b* и *Htr2b* на период активного дробления.

На основании полученных данных был сделан вывод, что базовые элементы, обеспечивающие реализацию сигнальной функции серотонина, транскрибируются уже на самых ранних этапах онтогенеза – в ооците и зиготе мыши. В дальнейшем основное внимание было уделено анализу пространственной локализации и функциональной активности везикулярного транспортера VMAT2, осуществляющего накопление серотонина в везикулах, необходимых для межклеточной сигнальной функции трансмиттера, а также мембранных серотониновых рецепторов, характеризующихся выраженной экспрессией в период доимплантационного развития (5-НТ<sub>1В</sub>, 5-НТ<sub>1D</sub>, 5-НТ<sub>2В</sub>, 5-НТ<sub>5А</sub> и 5-НТ<sub>7</sub>).

Для визуализации серотонина и белковых компонентов серотонинергической системы в ооцитах и развивающихся эмбрионах был применен иммуногистохимический метод, обладающий высокой специфичностью и воспроизводимостью. Данный методологический подход позволил не только выявить, но и количественно оценить содержание исследуемых антигенов с учетом их пространственного внутриклеточного распределения.

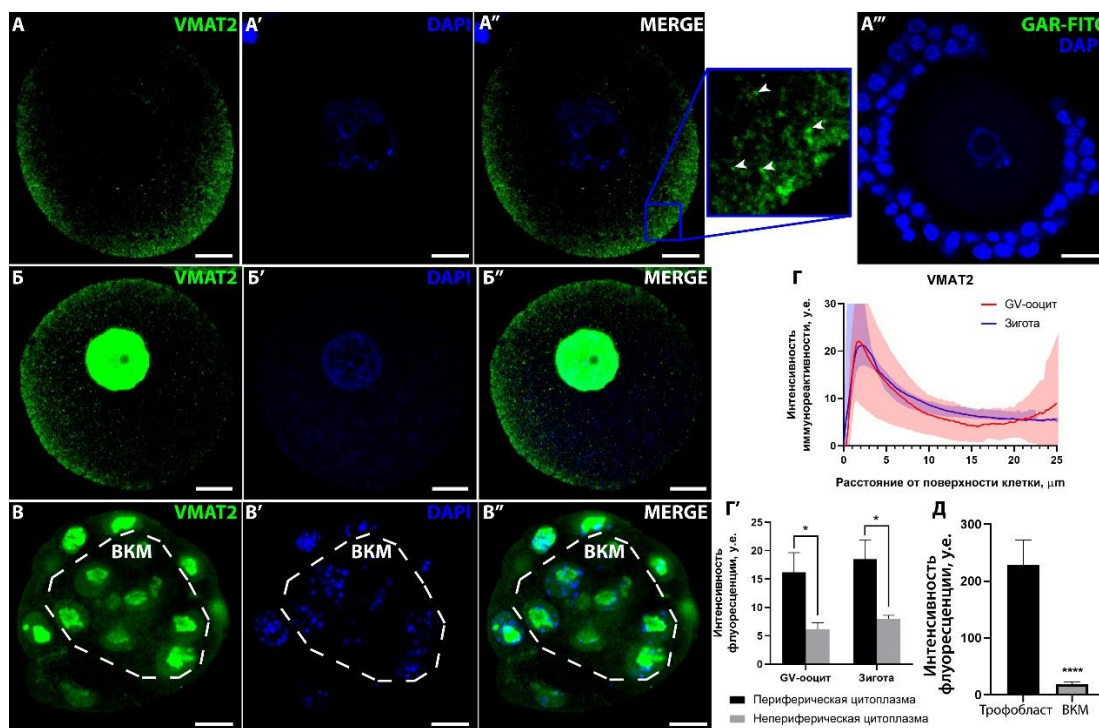
Анализ распределения серотонина, визуализированного с помощью специфических антител, показал идентичную картину в GV-ооцитах и ранних эмбрионах мышей: трансмиттер выявлялся диффузно по всему объему клеток в виде мелкодисперсных гранулярных структур (Рис. 13А-13А", 13Б-13Б", 13В-13В"). По результатам количественного анализа было установлено, что уровень 5-НТ в периферической зоне цитоплазмы GV-ооцитов превышал таковой в центральных областях. В зиготах выявленный градиент становился более выраженным и достигал уровня статистической значимости (Рис. 13Г'). На стадии бластоцисты содержание 5-НТ в клетках трофэктодермы было достоверно выше по сравнению с клетками внутренней клеточной массы (Рис. 13Д). В ряде случаев серотонин регистрировался в ядре, однако признаков его колокализации с хроматином не наблюдалось (Рис. 13Б-13Б").



**Рисунок 13. Распределение серотонина (5-НТ) в GV-ооцитах, зиготах и бластоцистах мышей.** А–А'' – распределение в GV-ооцитах (стрелки на врезке А'' указывают на иммунопозитивный сигнал); А''' – негативный контроль (окрашивание без первичных антител); Б–Б'' – распределение в зиготах; В–В'' – распределение в бластоцистах. Пунктирная линия отмечает область ВКМ. Масштаб: 10 мкм. Г – пространственное распределение иммунореактивности 5-НТ в зависимости от расстояния от мембраны клетки в GV-ооцитах и зиготах (GV-ооциты:  $n = 5$ , зиготы:  $n = 4$ ); Г' – соотношение иммунореактивности 5-НТ в периферической и непериферической цитоплазме в GV-ооцитах и зиготах. Звездочками обозначены значимые различия между периферической и непериферической областями (двухфакторный дисперсионный анализ, \*  $p < 0,05$ ). Д – соотношение иммунореактивности 5-НТ в ВКМ и трофобласте бластоцист ( $n = 13$ , в условных единицах; значимых различий по критерию Вилкоксона не обнаружено). Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

Локализация везикулярного транспортера моноаминов VMAT2 характеризовалась выраженным увеличением иммунореактивности в периферической части цитоплазмы на стадиях GV-ооцита и зиготы (Рис. 14А-14А'', 14Б-14Б'', 14Г). По достижении стадии бластоцисты VMAT2 концентрировался преимущественно в клетках трофэктодермы, тогда как в пуле ВКМ выявлялся лишь в следовых количествах (Рис. 14В-14В'', 14Д). Следует отметить, что применение антител к VMAT2 демонстрировало интенсивное окрашивание не только в цитоплазматических структурах клеток, но и в ядрах (Рис. 14 Б-В). Наблюдаемое окрашивание ядер, вероятнее

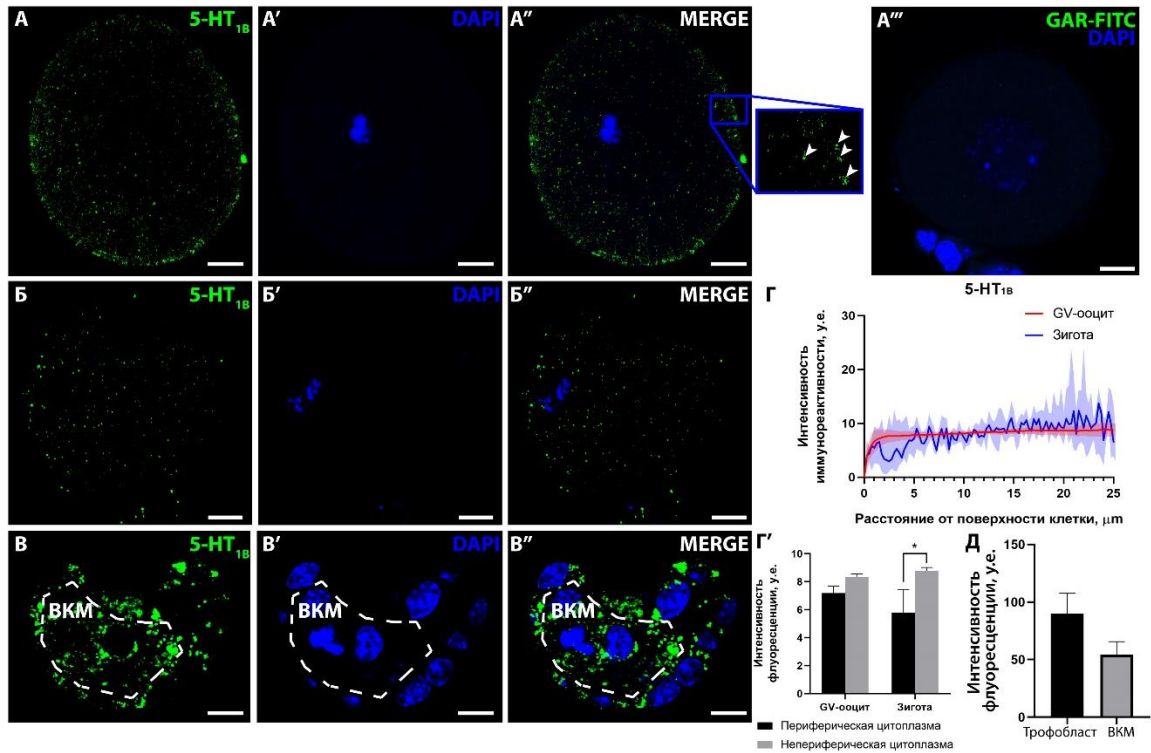
всего, было обусловлено неспецифическим связыванием первичных антител, поскольку трансмембранный белок VMAT2 функционально не может присутствовать во внутреннем пространстве ядра. Для верификации данного предположения было проведено контрольное иммуноокрашивание ооцитов, зигот и бластоцист с использованием антител против VMAT2 от другого производителя, что полностью подтвердило артефактный характер иммунореактивности в кариоплазме.



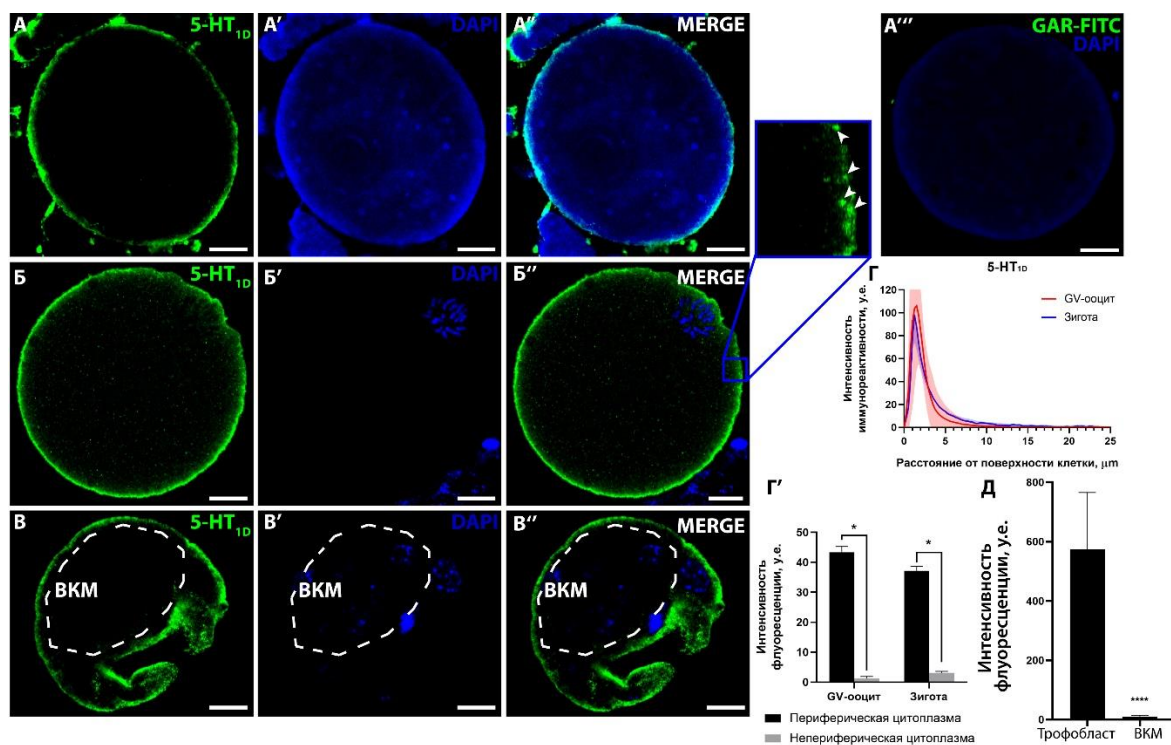
**Рисунок 14. Распределение везикулярного транспортера моноаминов VMAT2 в GV-ооцитах, зиготах и бластоцистах мышей.** А–А'' – распределение в GV-ооцитах (стрелки на врезке А'' указывают на иммунопозитивный сигнал); А''' – негативный контроль; Б–Б'' – распределение в зиготах; В–В'' – распределение в бластоцистах. Пунктирная линия отмечает область ВКМ. Масштаб: 10 мкм. Г – пространственное распределение иммунореактивности VMAT2 в зависимости от расстояния от поверхности клетки (GV-ооциты: n = 5, зиготы: n = 4); Г' – соотношение иммунореактивности VMAT2 в периферической и непериферической цитоплазме. Звездочками обозначены значимые различия между периферической и непериферической зонами (двухфакторный дисперсионный анализ, \* p < 0,05). Д – соотношение иммунореактивности VMAT2 в ВКМ и трофобласте (n = 19, в условных единицах). Звездочками показаны статистически значимые различия между структурами (критерий Вилкоксона, \*\*\*\* p < 0,0001). Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего.

В соответствии с профилем транскрипции гена рецептора 5-HT<sub>1B</sub>, иммуногистохимический сигнал на стадиях GV-ооцита и зиготы

характеризовался низкой интенсивностью. В ходе развития паттерн иммунореактивности претерпевал изменения. На стадии GV-ооцита распределение рецептора 5-HT<sub>1B</sub> было равномерным по всему объему клетки с тенденцией к более плотному расположению в центральной зоне цитоплазмы (Рис. 15А-15А'', 15Г). К стадии зиготы градиент концентрации рецептора между периферической и непериферической областями усиливался и приобретал статистическую значимость (Рис. 15Б-15Б'', 15Г). На стадии бластоцисты интенсивность сигнала была несколько выше в клетках трофобласта по сравнению с клетками ВКМ, однако данное качественное различие не подтверждалось статистически (Рис. 15В-15В'', 15Д).



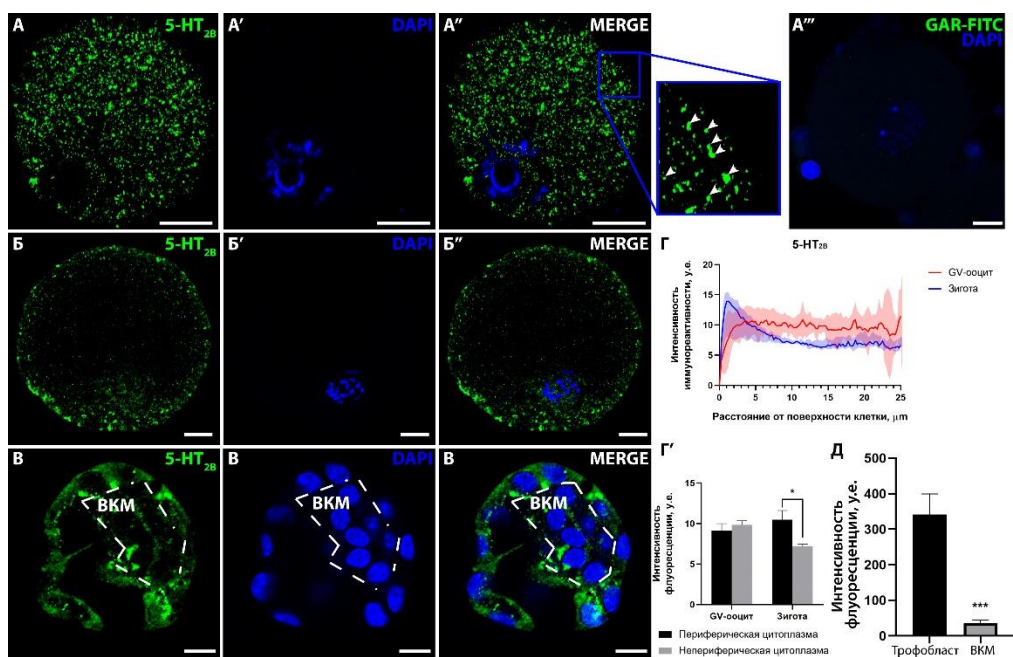
**Рисунок 15. Распределение рецептора 5-HT<sub>1B</sub> в GV-ооцитах, зиготах и бластоцистах мышей.** А–А'' – распределение в GV-ооцитах (стрелки на врезке А'' указывают на иммунопозитивный сигнал); А''' – негативный контроль; Б–Б'' – распределение в зиготах; В–В'' – распределение в бластоцистах. Пунктирная линия отмечает область ВКМ. Масштаб: 10 мкм. Г – пространственное распределение иммунореактивности 5-HT<sub>1B</sub> в зависимости от расстояния от поверхности клетки (GV-ооциты: n = 9, зиготы: n = 5); Г' – соотношение иммунореактивности 5-HT<sub>1B</sub> в периферической и непериферической цитоплазме. Звездочками обозначены значимые различия (двухфакторный дисперсионный анализ, \* p < 0,05). Д – соотношение иммунореактивности рецептора 5-HT<sub>1B</sub> в ВКМ и трофобласте бластоцист (n = 15, в условных единицах; значимых различий по критерию Вилкоксона не обнаружено). Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего.



**Рисунок 16. Распределение рецептора 5-НТ<sub>1D</sub> в GV-ооцитах, зиготах и бластоцистах мышей.** А–А'' – распределение в GV-ооцитах; А''' – негативный контроль; Б–Б'' – распределение в зиготах (стрелки на врезке Б'' указывают на иммунопозитивный сигнал); В–В'' – распределение в бластоцистах. Пунктирная линия отмечает область ВКМ. Масштаб: 10 мкм. Г – пространственное распределение иммунореактивности 5-НТ<sub>1D</sub> в зависимости от расстояния от поверхности клетки (GV-ооциты: n = 5, зиготы: n = 5); Г' – соотношение иммунореактивности 5-НТ<sub>1D</sub> в периферической и непериферической цитоплазме. Звездочками обозначены значимые различия (двухфакторный дисперсионный анализ, \* p < 0,05). Д – соотношение иммунореактивности рецептора 5-НТ<sub>1D</sub> в ВКМ и трофобласте (n = 15, в условных единицах). Звездочками показаны значимые различия между структурами (критерий Вилкоксона, \*\*\*\* p < 0,0001). Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего.

Пространственное распределение рецептора 5-НТ<sub>1D</sub> существенно отличалось от остальных исследованных маркеров. На стадиях GV-ооцита и зиготы иммунореактивные структуры характеризовались высокой гетерогенностью пространственного распределения: они строго концентрировались в узком кортикальном слое толщиной порядка 4 мкм, вероятно ассоциируясь с самой плазмолеммой, и практически не выявлялись в глубоких частях цитоплазмы (Рис. 16А-16А'', 16Б-16Б'', 16Г). Описанный паттерн сохранялся и на стадии бластоцисты: выраженная иммунореактивность обнаруживалась преимущественно в апикальной части клеток трофэктодермы, тогда как в клетках ВКМ специфический сигнал

практически отсутствовал (Рис. 16В-16В'', 16Д). Выявленные различия пространственного распределения обладали высокой степенью статистической значимости.

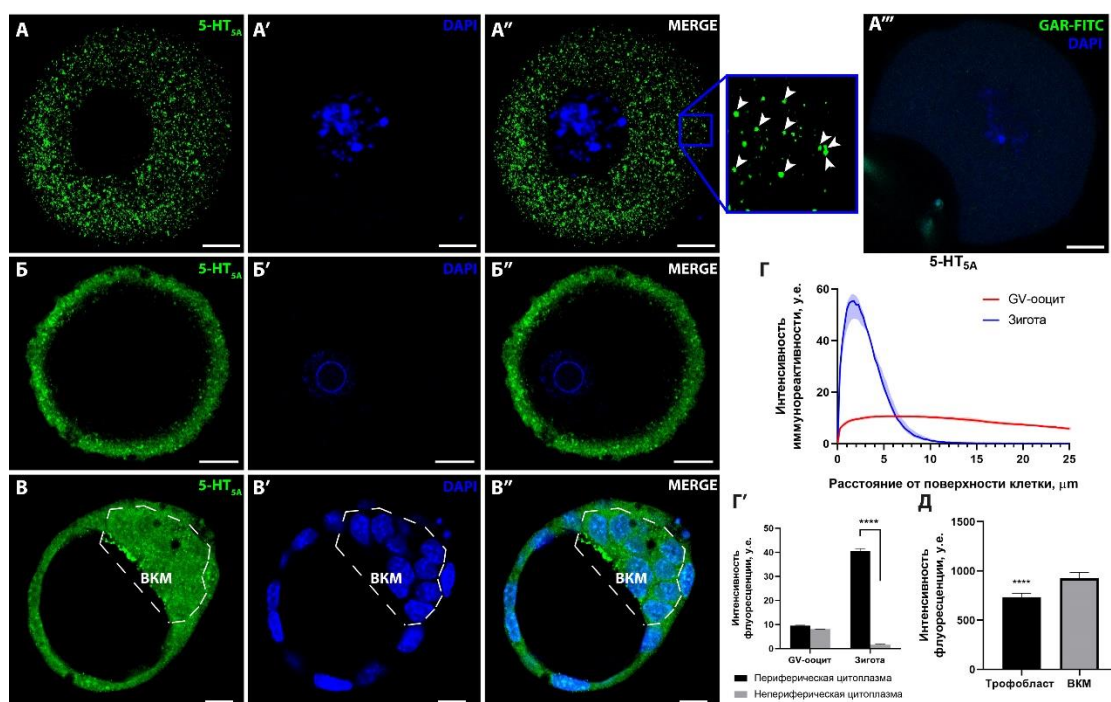


**Рисунок 17. Распределение рецептора 5-НТ<sub>2В</sub> в GV-ооцитах, зиготах и бластоцистах мышей.** А–А'' – распределение в GV-ооцитах (стрелки на врезке А'' указывают на иммунопозитивный сигнал); А''' – негативный контроль; Б–Б'' – распределение в зиготах; В–В'' – распределение в бластоцистах. Пунктирная линия отмечает область ВКМ. Масштаб: 10 мкм. Г – пространственное распределение иммунореактивности 5-НТ<sub>2В</sub> в зависимости от расстояния от поверхности клетки (GV-ооциты: n = 4, зиготы: n = 6); Г' – соотношение иммунореактивности 5-НТ<sub>2В</sub> в периферической и непериферической цитоплазме. Звездочками обозначены значимые различия (двухфакторный дисперсионный анализ, \* p < 0,05). Д – соотношение иммунореактивности рецептора 5-НТ<sub>2В</sub> в ВКМ и трофобласте (n = 15, в условных единицах). Звездочками показаны значимые различия (критерий Вилкоксона, \*\*\*\* p < 0,0001). Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего.

Распределение рецептора 5-НТ<sub>2В</sub>, экспрессия мРНК которого фактически не регистрировалась в транскриптомах GV-ооцита и зиготы, оказалось сходным с локализацией 5-НТ<sub>1В</sub> на белковом уровне. В GV-ооците иммунореактивный сигнал имел вид зернистых структур, гомогенно распределенных в цитоплазме (Рис. 17А-17А'', 17Г). На стадии зиготы распределение рецептора смещалось в периферическую часть клетки, при этом интенсивность флуоресценции кортикального слоя значительно превышала значения в глубоких слоях (Рис. 17Б-17Б'', 17Г). В бластоцистах

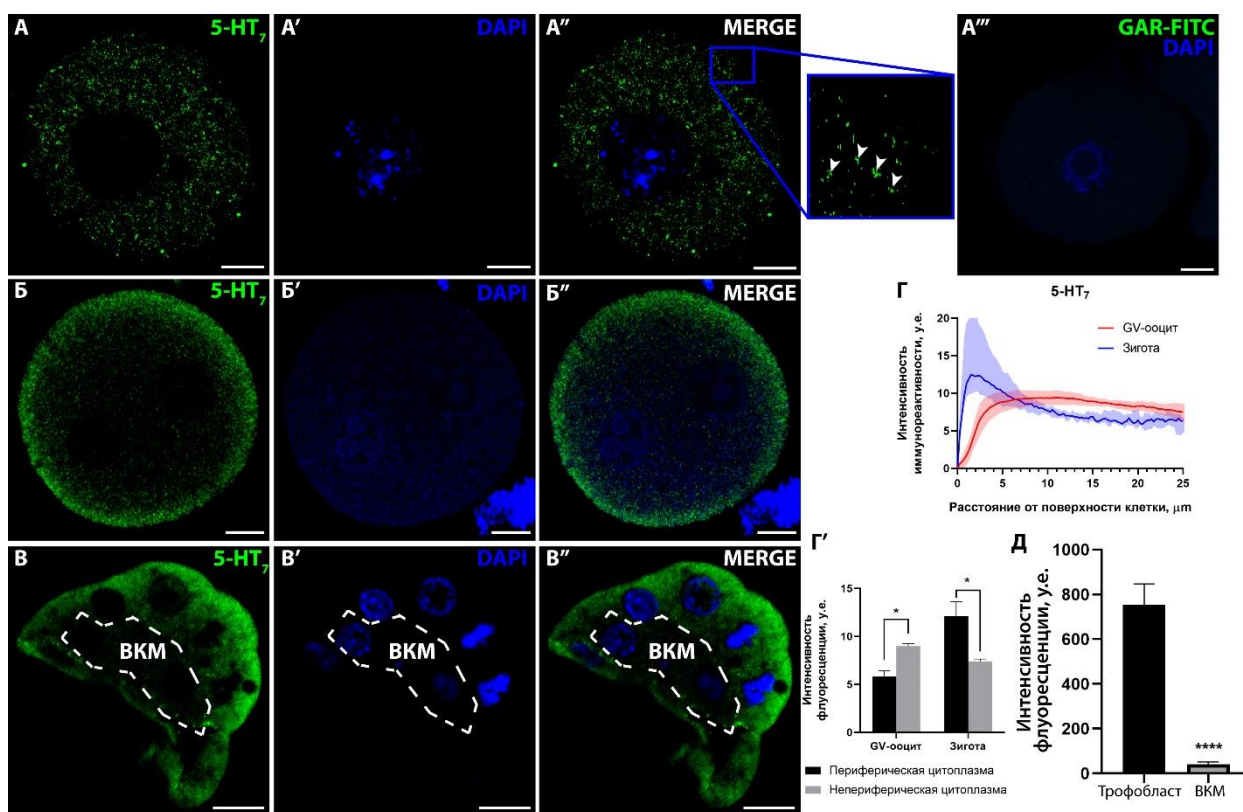
четкий специфический сигнал выявлялся как в трофэктодерме, так и в ВКМ, однако уровень экспрессии рецептора в клетках трофобласта был достоверно выше (Рис. 17В-17В", 17Д).

Рецептор 5-НТ<sub>5А</sub> на стадии GV-ооцита визуализировался во всем объеме клетки, при этом интенсивность сигнала в периферической зоне была умеренно выше по сравнению с внутренними областями (Рис. 18А-18В", 18Г). К стадии зиготы периферическая локализация иммунореактивности 5-НТ<sub>5А</sub> становилась значительно более выраженной (Рис. 18Б-18Б", 18Г). На стадии бластоцисты уровень иммунодетекции характеризовался преобладанием специфического сигнала в клетках внутренней клеточной массы относительно клеток трофэктодермы (Рис. 18В-18В", 18Д).



**Рисунок 18. Распределение рецептора 5-НТ<sub>5А</sub> в GV-ооцитах, зиготах и бластоцистах мышей.** А–А'' – распределение в GV-ооцитах (стрелки на врезке А'' указывают на иммунопозитивный сигнал); А''' – негативный контроль; Б–Б'' – распределение в зиготах; В–В'' – распределение в бластоцистах. Пунктирная линия отмечает область ВКМ. Масштаб: 10 мкм. Г – пространственное распределение иммунореактивности рецептора в зависимости от расстояния от поверхности клетки (GV-ооциты: n = 9, зиготы: n = 9); Г' – соотношение иммунореактивности рецептора в периферической и непериферической цитоплазме. Звездочками обозначены значимые различия (двухфакторный дисперсионный анализ, \*\*\*\* p < 0,0001). Д – соотношение иммунореактивности рецептора 5-НТ<sub>5А</sub> в ВКМ и трофобласте (n = 26, в условных единицах). Звездочками показаны значимые различия (критерий Вилкоксона, \*\*\*\* p < 0,0001). Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего.

Рецептор 5-HT<sub>7</sub> на этапе GV-ооцита также определялся по всему объему клетки, однако, в отличие от 5-HT<sub>5A</sub>, максимальная интенсивность сигнала локализовалась в непериферической цитоплазме (Рис. 19А-19В", 19Г). На стадии зиготы характер распределения рецептора 5-HT<sub>7</sub> кардинально менялся, демонстрируя смещение иммунореактивности к периферии клетки (Рис. 19Б-19Б", 19Г). При формировании бластоцисты общая интенсивность иммунофлуоресценции снижалась, а экспрессия выявлялась преимущественно в клетках трофобласта (Рис. 19В-19В", 19Д).



**Рисунок 19. Распределение рецептора 5-HT<sub>7</sub> в GV-ооцитах, зиготах и бластоцистах мышей.** А–А'' – распределение в GV-ооцитах (стрелки на врезке А'' указывают на иммунопозитивный сигнал); А''' – негативный контроль; Б–Б'' – распределение в зиготах; В–В'' – распределение в бластоцистах. Пунктирная линия отмечает область ВКМ. Масштаб: 10 мкм. Г – пространственное распределение иммунореактивности 5-HT<sub>7</sub> в зависимости от расстояния от поверхности клетки (GV-ооциты: n = 10, зиготы: n = 6); Г' – соотношение иммунореактивности 5-HT<sub>7</sub> в периферической и непериферической цитоплазме. Звездочками обозначены значимые различия (двухфакторный дисперсионный анализ, \* p < 0,05). Д – соотношение иммунореактивности рецептора 5-HT<sub>7</sub> в ВКМ и трофобласте (n = 18, в условных единицах). Звездочками показаны значимые различия (критерий Вилкоксона, \*\*\*\* p < 0,0001). Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего.

Таким образом, результаты проведенных транскриптомных и иммуногистохимических исследований свидетельствуют о том, что ключевые компоненты серотонинергической системы не только экспрессируются на самых ранних этапах эмбриогенеза, но и характеризуются сложной пространственно-временной динамикой. Выраженный кортикальный паттерн серотонина, его везикулярного транспортера и некоторых мембранных рецепторов указывают на роль серотонина в раннем эмбриогенезе как сигнальной молекулы межклеточной коммуникации.

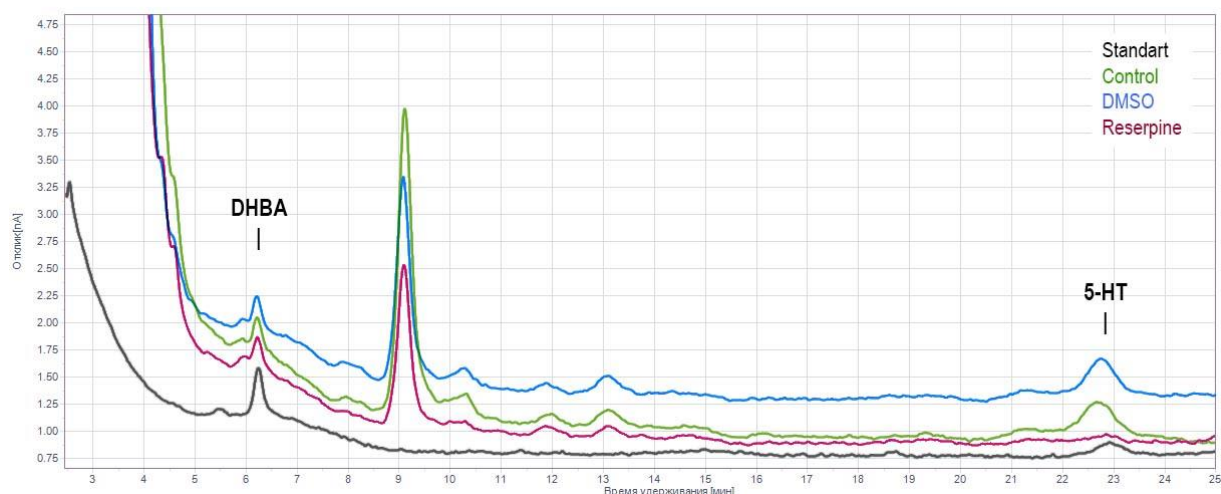
### **Анализ функциональной активности везикулярного транспорта серотонина в ооцитах**

Как было продемонстрировано выше, уровень экспрессии мРНК и белка везикулярного транспортера моноаминов VMAT2 оставался высоким в период оогенеза и раннего эмбриогенеза (Рис. 12, 14). Серотонин визуализировался в виде точечных гранулярных структур (Рис. 13), характерный размер которых совпадал с таковым для иммунопозитивных кластеров VMAT2 (Рис. 30). Это указывает на возможность депонирования серотонина в везикулах, необходимых для его последующего высвобождения в межклеточное пространство и реализации сигнальной функции через мембранные рецепторы.

Для оценки функциональной активности везикулярного транспортера в созревающих ооцитах была проведена серия экспериментов с использованием ингибитора VMAT2 резерпина, после чего анализировалось содержание серотонина в ткани яичника и непосредственно в созревающих ооцитах (Рис. 5).

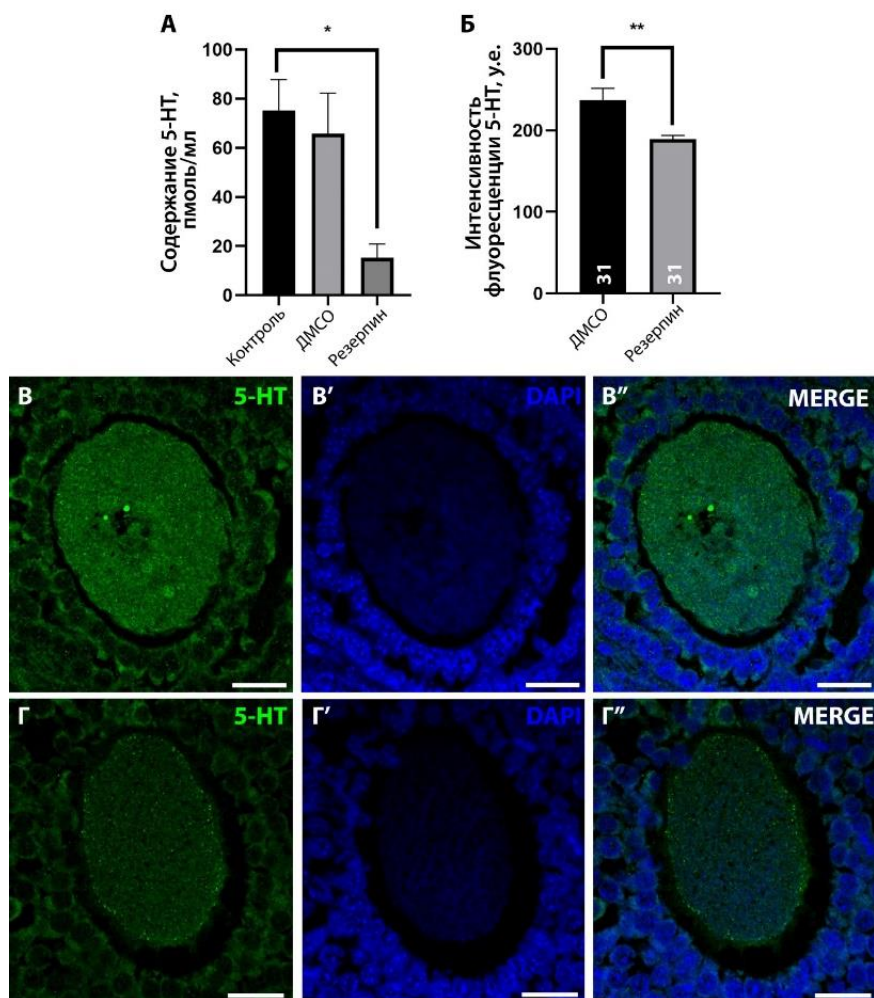
Количественный анализ, проведенный методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, выявил существенное снижение содержания серотонина не только в сыворотке крови, но и в яичниках самок, получавших резерпин. Уровень серотонина в тканях экспериментальной группы составлял лишь 20% от значений контроля (Рис. 20, 21А). Иммуногистохимическое

окрашивание ткани яичников также продемонстрировало выраженное падение уровня серотонина в ооцитах растущих фолликулов (Рис. 21Б, 21В-21В", 21Г-21Г").



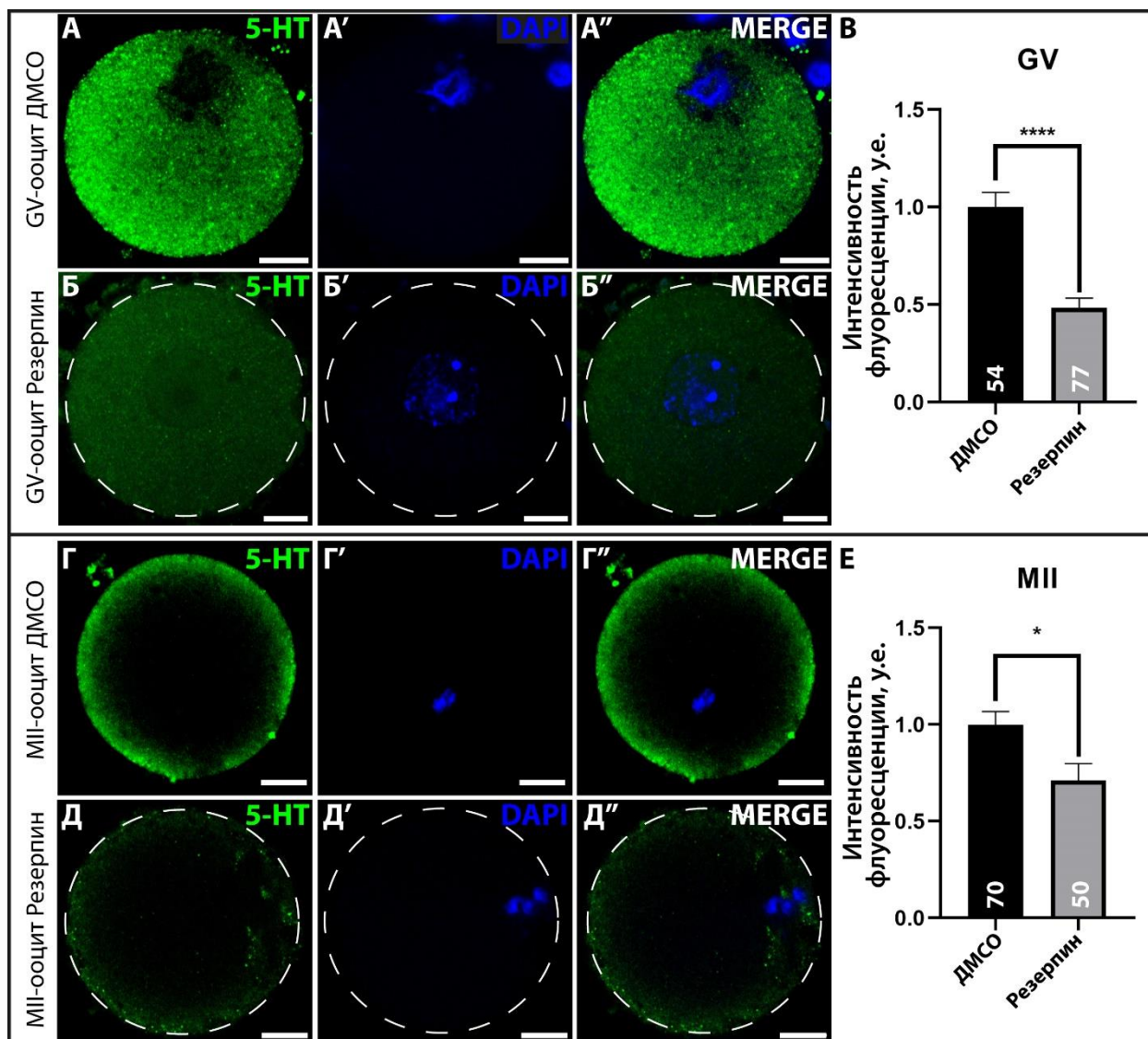
**Рисунок 20.** Хроматограмма ВЭЖХ, отражающая уровень серотонина в яичниках самок после инъекций физиологического раствора (Control), ДМСО (DMSO) и резерпина (Reserpine). DHBA – стандарт (3,4-дигидроксибензиламин).

Достоверное снижение иммунореактивности серотонина регистрировалось как в незрелых GV-ооцитах, выделенных из яичников (Рис. 22А-22А", 22Б-22Б", 22В), так и в зрелых МII-ооцитах, полученных из яйцеводов мышей после недельной экспозиции резерпином (Рис. 22Г-22Г", 22Д-22Д", 22Е). По сравнению с контрольной группой животных, получавших инъекции растворителя (ДМСО), в пуле ооцитов экспериментальной группы отмечалось выраженное снижение внутриклеточного содержания серотонина на 50% в GV-ооцитах и на 30% в МII-ооцитах. Особого внимания заслуживает тот факт, что в большинстве случаев происходило не просто падение общего содержания серотонина, но и практически полное исчезновение его характерной точечной локализации в кортикальной зоне клеток.



**Рисунок 21.** Влияние семидневного введения резерпина на содержание серотонина в яичниках. А – результаты ВЭЖХ-анализа содержания серотонина в яичниках животных контрольных (физиологический раствор (Контроль) и ДМСО) и экспериментальной (Резерпин) групп. Звездочками отмечены статистически значимые различия между группами (критерий Краскела-Уоллиса, \*  $p < 0,05$ ). Б – количественная оценка иммунореактивности серотонина (5-НТ) в ооцитах на криосрезах ткани яичников контрольной (ДМСО) и экспериментальной (Резерпин) групп; цифры на гистограммах соответствуют числу проанализированных ооцитов. Звездочками отмечены значимые различия между группами (критерий Манна-Уитни, \*\*  $p < 0,005$ ). В-В'' – иммуногистохимическое выявление серотонина на криосрезах ткани яичников контрольной группы (ДМСО). Г-Г'' – иммуногистохимическое выявление серотонина на криосрезах ткани яичников экспериментальной группы (Резерпин). Масштаб: 10 мкм.

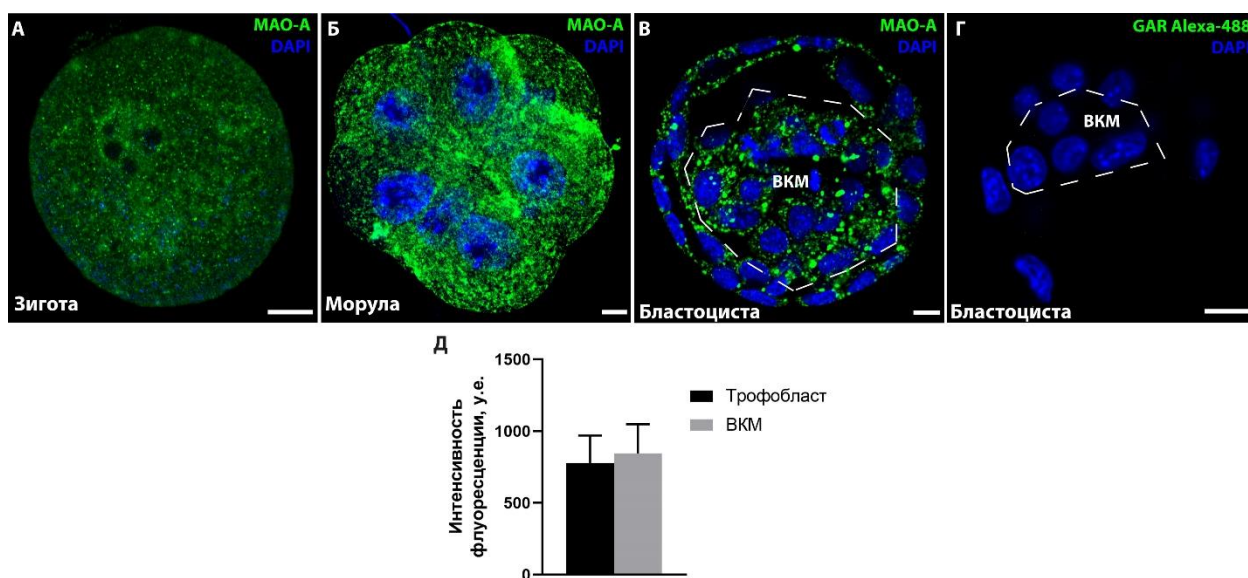
Полученные данные свидетельствуют о наличии в ооцитах специализированного везикулярного компартмента, в котором происходит аккумуляция серотонина, опосредованная функциональной активностью белка VMAT2.



**Рисунок 22.** Влияние семидневного введения резерпина на содержание серотонина в ооцитах. А-А'' – иммуногистохимическое выявление серотонина в GV-ооцитах контрольной группы (ДМСО). Б-Б'' – иммуногистохимическое выявление серотонина в GV-ооцитах экспериментальной группы (Резерпин). В – количественная оценка иммунореактивности 5-НТ в GV-ооцитах сравниваемых групп; цифры на гистограммах соответствуют количеству проанализированных ооцитов. Г-Г'' – иммуногистохимическое выявление серотонина в MII-ооцитах контрольной группы (ДМСО). Д-Д'' – иммуногистохимическое выявление серотонина в MII-ооцитах экспериментальной группы (Резерпин). Пунктирная линия обозначает границы ооцита. Е – количественная оценка иммунореактивности 5-НТ в MII-ооцитах сравниваемых групп; цифры на гистограммах соответствуют количеству проанализированных ооцитов. Данные нормализованы относительно группы ДМСО (среднее значение принято за 1) и представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Звездочками отмечены статистически значимые различия между группами (критерий Манна-Уитни, \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). Масштаб: 10 мкм.

## Выявление и оценка активности моноаминоксидазы в раннем эмбриональном развитии

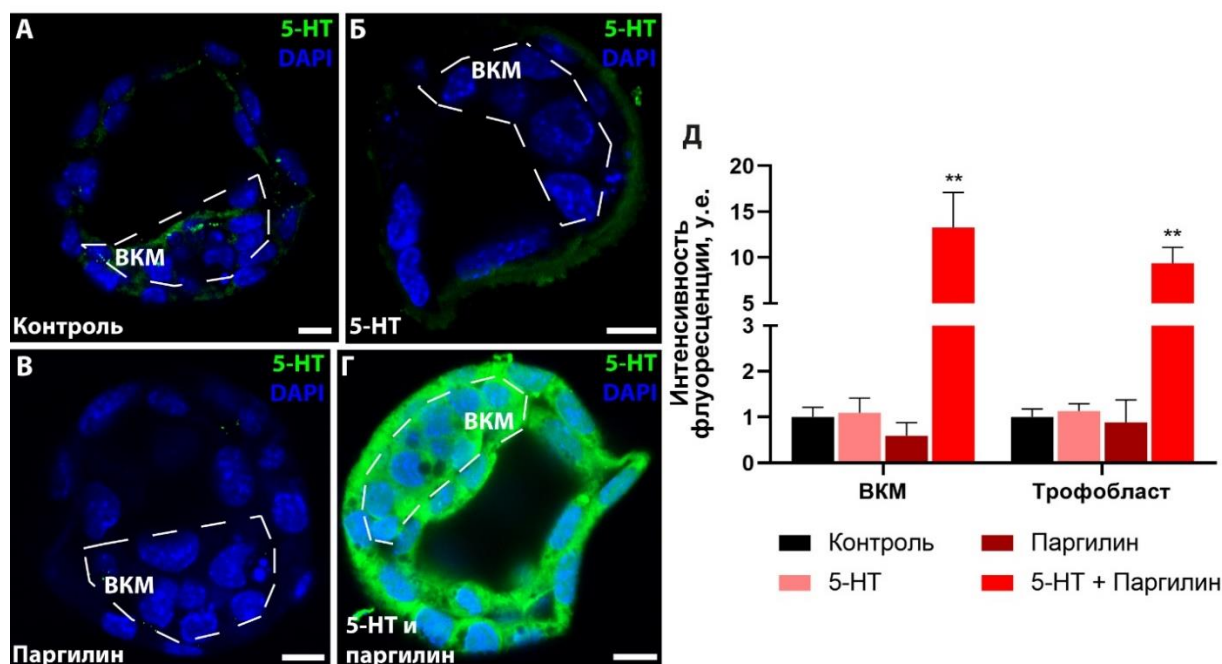
На уровне транскриптов экспрессия моноаминоксидазы А (*Maoa*) регистрируется на протяжении всего оогенеза и раннего эмбриогенеза, достигая пиковых значений на стадии двух бластомеров с последующим повторным возрастанием к стадии бластоцисты (Рис. 12). Для подтверждения трансляции фермента и изучения его внутриклеточной локализации на белковом уровне было проведено иммуногистохимическое окрашивание эмбрионов мыши на стадиях зиготы, некомпактной морулы и бластоцисты с использованием специфических антител против MAO-A. Результаты анализа подтвердили наличие исследуемого белка на всех изученных этапах раннего развития (Рис. 23).



**Рисунок 23. Визуализация моноаминоксидазы А в доимплантационном развитии мыши.** А-Г – Иммуногистохимическое выявление моноаминоксидазы А (MAO-A) в эмбрионах. А – зигота. Б – морула. В – бластоциста. Г – бластоциста, негативный контроль (окрашивание без первичных антител). Пунктирная линия обозначает зону VKM. Масштаб: 10 мкм. Д – количественное соотношение иммунореактивности MAO-A в структурах VKM и трофобласта в бластоцистах (n = 7) в условных единицах. Статистически значимых различий по критерию Вилкоксона не обнаружено. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

На стадии зиготы MAO-A визуализируется в виде мелкодисперсных точечных структур, диффузно распределенных по всей цитоплазме (Рис. 23А). К стадии морулы фермент сохраняет цитоплазматическое распределение. При

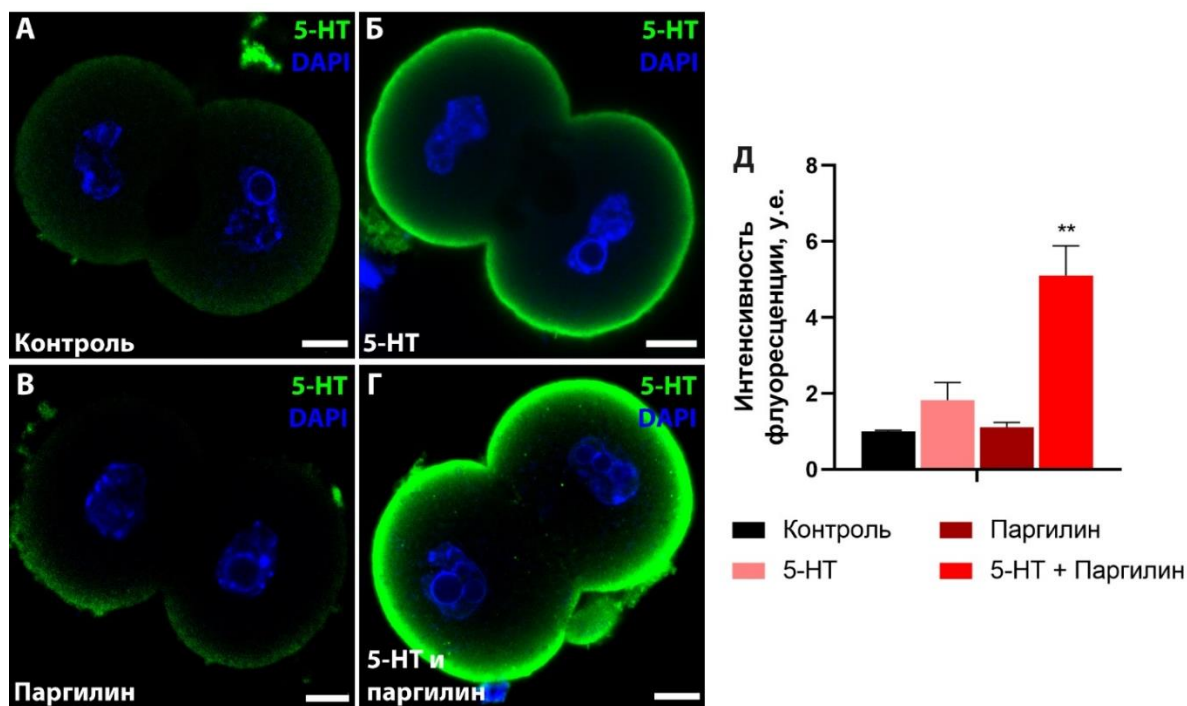
этом наблюдается формирование белковых скоплений, однако в отдельных компартментах, в частности, в кортикальной зоне ряда бластомеров (Рис. 23Б). На стадии бластоцисты MAO-A выявляется в виде иммунопозитивных скоплений как в клетках внутренней клеточной массы, так и в клетках трофобласты (Рис. 23В-23Д). При этом прослеживается четкая динамика увеличения интенсивности флуоресцентного сигнала от стадии зиготы к стадии бластоцисты.



**Рисунок 24.** Оценка активности моноаминоксидазы А на стадии бластоцисты. А-Г – Иммуногистохимическое выявление серотонина в бластоцистах экспериментальных групп. А – Контроль; Б – Серотонин; В – Паргилин; Г – Серотонин и паргилин. Пунктирная линия обозначает зону ВКМ. Масштаб: 10 мкм. Д – Количественная оценка иммунореактивности 5-НТ в бластоцистах (13 экспериментальных повторностей). Звездочками отмечены статистически значимые различия между группами (критерий Фридмана с апостериорным тестом Данна для множественных сравнений, \*\*  $p < 0,01$ ). Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

Для оценки функциональной активности MAO-A в доимплантационных эмбрионах была проведена серия экспериментов *in vitro*. Для определения способности зародышей накапливать серотонин в условиях фармакологической блокады фермента проводилось их культивирование от стадии зиготы до стадии бластоцисты в присутствии неселективного ингибитора моноаминоксидаз паргилина (Рис. 7). 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 паргелин (Рис. 24). 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 MAO-A.



**Рисунок 25.** Оценка активности моноаминоксидазы А на стадии дробления. А-Г – Иммуногистохимическое выявление серотонина в двухклеточных эмбрионах экспериментальных групп. А – Контроль; Б – Серотонин; В – Паргелин; Г – Серотонин и паргелин. Масштаб: 10 мкм. Д – количественная оценка иммунореактивности 5-НТ в двухклеточных эмбрионах (13 экспериментальных повторностей). Звездочками отмечены статистически значимые различия между группами (критерий Фридмана с апостериорным тестом Данна для множественных сравнений, \*\*  $p < 0,01$ ). Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

Несмотря на наличие белка MAO-A уже на стадии зиготы, выраженная каталитическая активность начинает проявляться на более поздних этапах. В ходе аналогичного эксперимента, завершено на стадии двух бластомеров, было установлено, что при совместном воздействии серотонина и паргелина происходит максимальное накопление медиатора. При инкубации только с серотонином накопление также регистрируется, однако значительно менее выраженное. В то же время, при инкубации исключительно с паргелином или

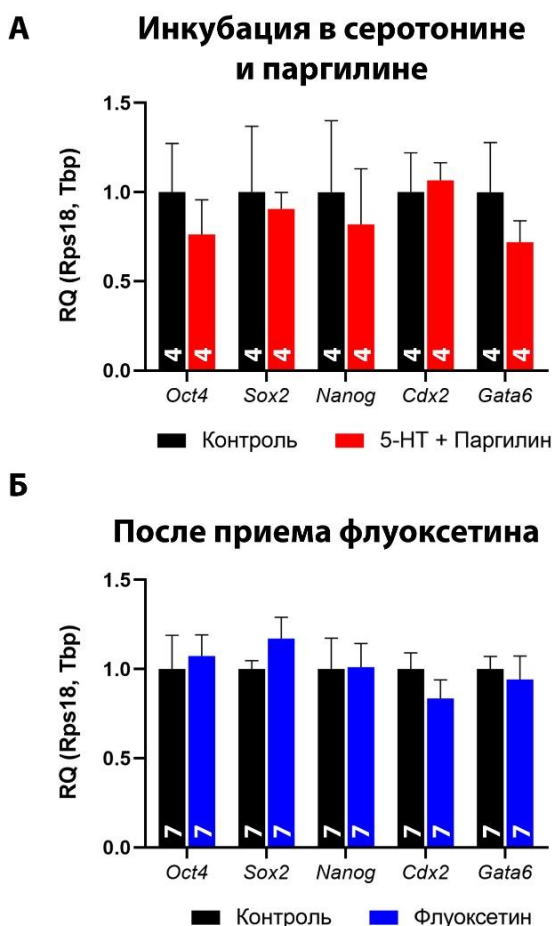
в стандартной культуральной среде внутриклеточное накопление серотонина практически отсутствовало (Рис. 25). На основании этих данных можно заключить, что механизмы захвата и деградации серотонина функционируют уже на начальных этапах дробления, однако ферментативная активность МАО-А в данный период менее выражена по сравнению со стадией бластоцисты.

### **Влияние повышенного уровня цитоплазматического серотонина на экспрессию маркеров плюрипотентности, спецификации клеточных линий бластоцисты, генерацию АФК и активность митохондрий**

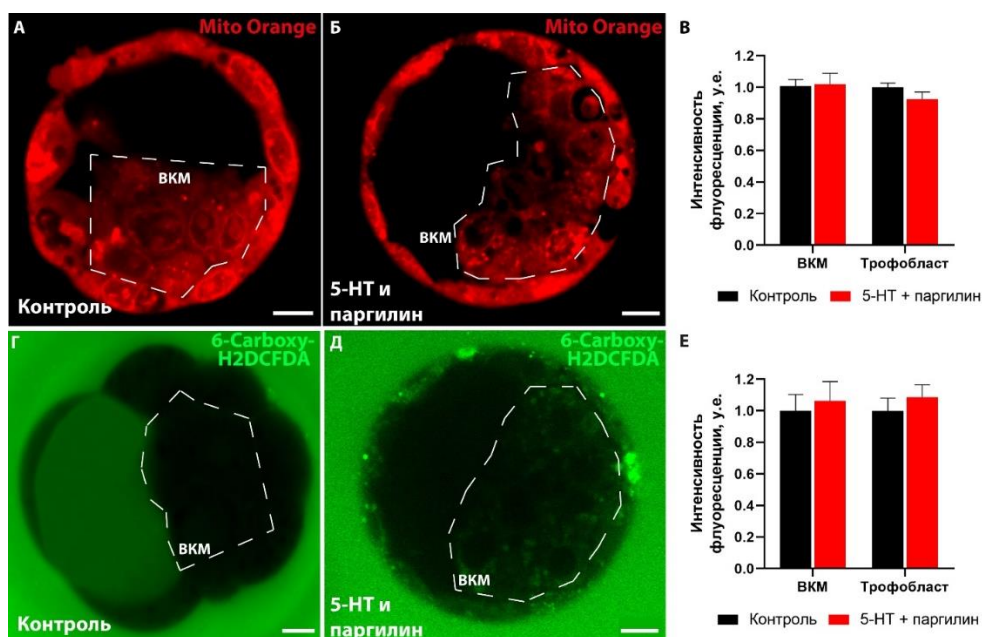
Для анализа последствий накопления серотонина в клетках ранних эмбрионов, индуцированного воздействием экзогенного серотонина и паргилина, была проведена серия экспериментов по оценке функциональных показателей эмбриональных клеток. Прежде всего, методом количественной ПЦР в реальном времени оценивалось качество бластоцист по изменению уровня экспрессии маркеров плюрипотентности и спецификации клеточных линий бластоцисты. Полученные результаты продемонстрировали, что на фоне повышения внутриклеточного уровня серотонина экспрессия генов *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Cdx2* и *Gata6* статистически значимо не изменяется (Рис. 26А). Аналогичным образом оценивалось влияние флуоксетина, также способствующего повышению внутриклеточного содержания серотонина в ранних эмбрионах. Анализ данных количественной ПЦР в реальном времени показал, что при пероральном введении флуоксетина самкам уровень экспрессии генов *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Cdx2* и *Gata6* в эмбрионах сохраняется на уровне контрольных значений (Рис. 26Б).

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, потенциал-зависимо маркирующим митохондрии (Рис. 27А, 27Б), а также красителем 6-

Carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA, специфично выявляющим АФК (Рис. 27Г, 27Д), показало, что активность митохондрий и внутриклеточное содержание свободнорадикальных соединений значительно не изменяются при повышении концентрации серотонина в клетках (Рис. 27В, 27Е). Стоит отметить, что при визуализации АФК наблюдалась активная диффузия флуоресцентного сигнала в культуральную среду, а в ряде случаев – в бластоцель (Рис. 27Г), что в равной степени было характерно как для контрольной, так и для экспериментальной групп.

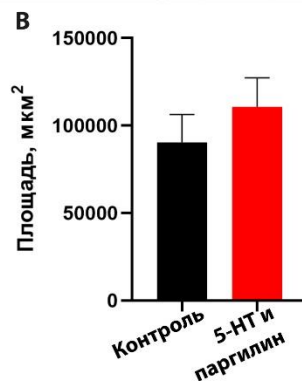
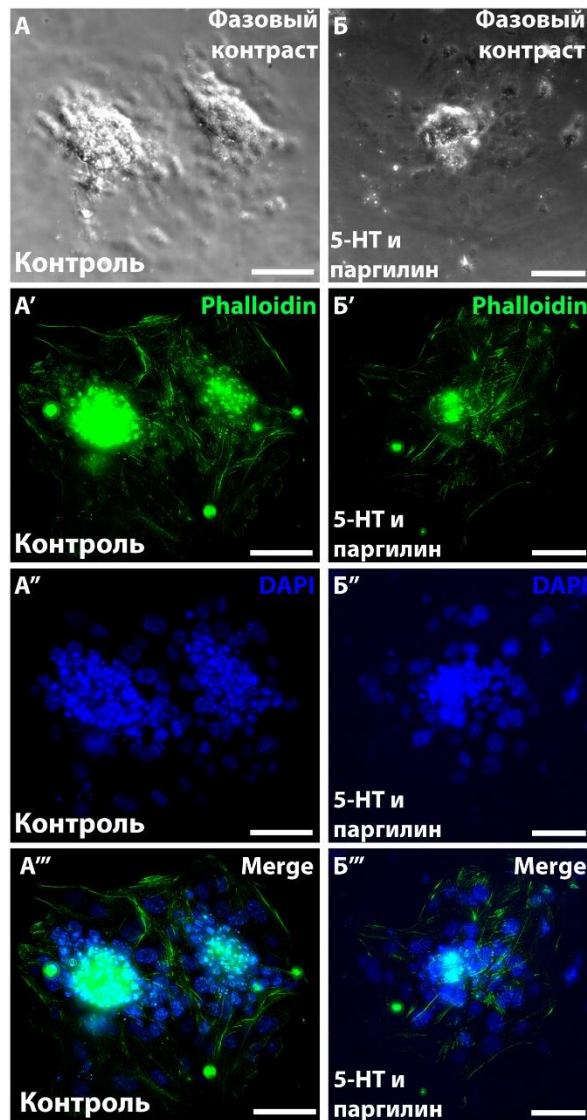


**Рисунок 26. Оценка уровня экспрессии генов, кодирующих маркеры плюрипотентности и спецификации клеточных линий бластоцисты.** А – сравнительный анализ уровня экспрессии маркеров между контрольной группой и эмбрионами после инкубации с серотонином и паргиллином. Б – сравнительный анализ уровня экспрессии маркеров между контрольной группой и эмбрионами от самок, получавших флуоксетин. RQ – относительный уровень экспрессии, рассчитанный методом  $2^{-\Delta Ct}$  по отношению к референсным генам *Tbp* и *Rps18*. Цифры на гистограммах указывают количество экспериментальных повторностей (проанализированных пометов). Статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни не выявлено. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего.



**Рисунок 27. 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 паргилином (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 паргилином (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. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

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. Не было выявлено морфологических отличий между распластавшимися бластоцистами, а также расхождений в доле и скорости их прикрепления к субстрату или площади конечного распластывания трофобласта (Рис. 28).



**Рисунок 28.** Анализ способности бластоцист с повышенным содержанием внутриклеточного серотонина к имплантации на модели имплантации *in vitro*. А-Б – флуоресцентные микрофотографии распластавшихся *in vitro* эмбрионов, окрашенных фаллоидином и ядерным красителем DAPI, на сроке, эквивалентном 8,5 дням эмбрионального развития. А – Контрольные эмбрионы. Б – Эмбрионы после инкубации с серотонином и паргидином. Масштаб: 100 мкм. В – Количественный анализ площади распластавшихся бластоцист (15 экспериментальных повторностей). Статистически значимых различий по критерию Манна-Уитни не обнаружено. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего.

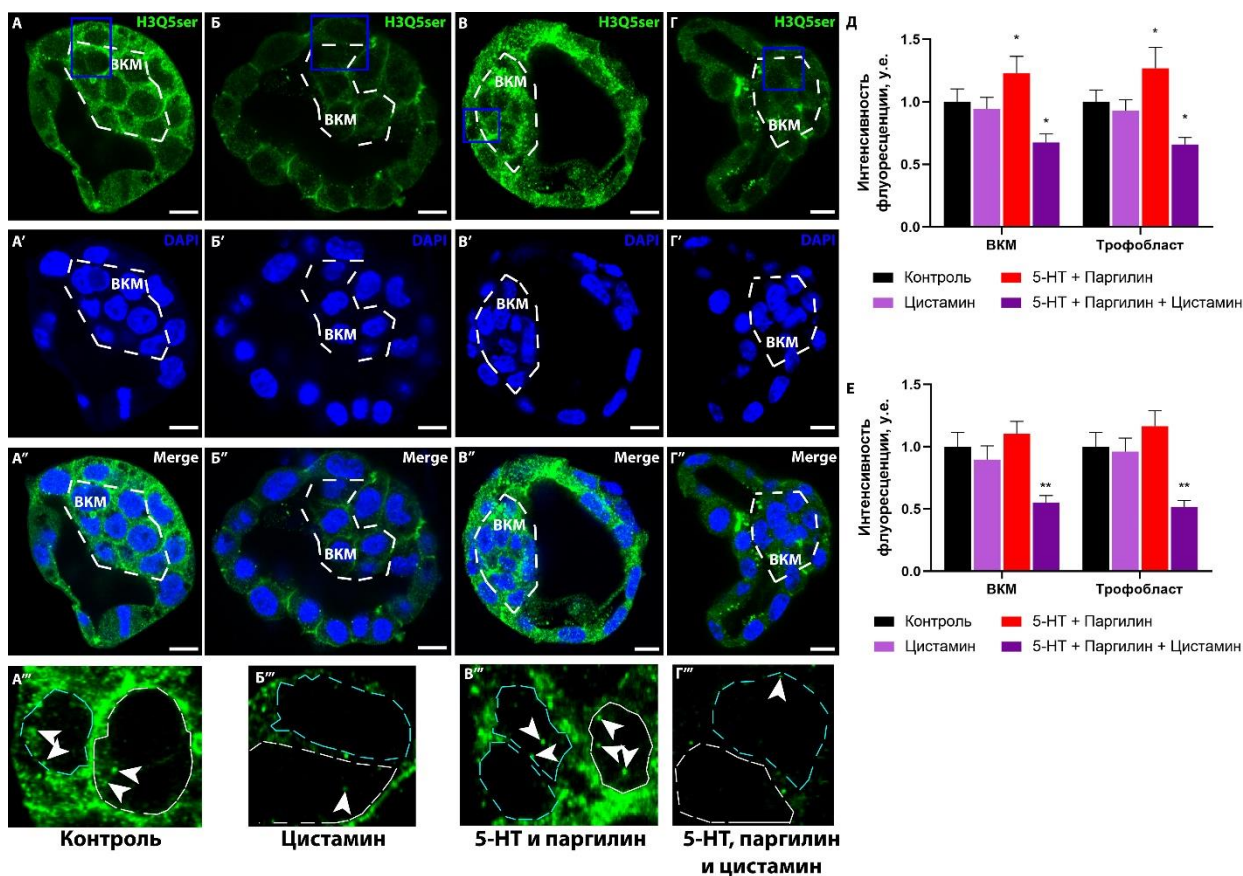
Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что повышенное содержание внутриклеточного серотонина не оказывает критического влияния на процессы доимплантационного развития.

### **Влияние повышенной концентрации внутриклеточного серотонина на серотонилирование гистона H3**

Для оценки возможности долгосрочных последствий повышения внутриклеточного уровня серотонина для развивающегося эмбриона была проведена оценка содержания серотонилированного гистона H3 в эмбрионах при их инкубации с серотонином и паргилином. С использованием специфических антител против серотонилированного гистона H3 (H3Q5ser) было установлено, что повышение внутриклеточной концентрации серотонина приводит к усилению серотонилирования гистона H3, выявляемому как в ядре (Рис. 29), так и в цитоплазме клеток бластоцисты. При этом интенсивность сигнала возрастает в клетках как внутренней клеточной массы, так и трофобласта: на 19,6 % в ядрах ВКМ и на 26,5 % в ядрах трофобласта; а также на 14,3 % в цитоплазме ВКМ и на 18,1 % в цитоплазме трофобласта. 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 трансглутаминаз.

Для подтверждения ферментативной природы наблюдаемой модификации эмбрионы были обработаны цистамином, ингибитором трансглутаминаз широкого спектра действия. Фармакологическая блокада цистамином эффективно подавила индуцированное серотонином усиление сигнала H3Q5ser, снизив его интенсивность до минимальных значений (Рис. 29Б–29Б''''', 29Г–29Г'''''). Полученные данные свидетельствуют о том, что избыток внутриклеточного серотонина активно связывается с гистонами H3 (и,

вероятно, с цитоплазматическим пулом растворимого гистона H3) посредством трансглутаминозависимого механизма.



**Рисунок 29. 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. Пунктирная линия на панорамных снимках (А-А'', Б-Б'', В-В'', Г-Г'') обозначает границы зоны ВКМ. Участки, выделенные синими рамками на А-Г представлены с большим увеличением на врезках А'''-Г'''. На врезках с увеличением голубым пунктиром обозначены ядра клеток трофэктодермы, белым пунктиром – ядра клеток ВКМ, белые стрелки указывают на иммунопозитивный сигнал. Масштаб: 10 мкм. Д-Е – Сравнительный анализ уровня серотонилирования гистона H3 в ядрах (Д) и цитоплазме (Е) клеток четырех экспериментальных групп (18 экспериментальных повторностей); звездочками отмечены значимые различия по критерию Фридмана с апостериорным тестом Данна, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Во всех случаях данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

Примечательно, что инкубация эмбрионов в среде с добавлением серотонина, паргилина и цистамина не только предотвратила стимулированное серотонином повышение сигнала, но и привела к снижению базового уровня H3Q5ser ниже контрольных значений (Рис. 29Д, 29Е). Данный факт указывает на то, что избыточное поступление серотонина в клетки

эмбриона может стимулировать эпигенетические перестройки в хроматине. В присутствии специфического ингибитора данный процесс полностью блокируется, вследствие чего уровень серотонилирования оказывается значительно ниже показателей контрольной группы: на 34,8 % и 34,2 % в ядрах ВКМ и трофобласта соответственно, а также на 49,5 % и 49,4 % в цитоплазме ВКМ и трофобласта соответственно.

## ОБСУЖДЕНИЕ

### **Состав серотонинергической системы в доимплантационном развитии**

Одной из основных задач диссертационного исследования стало изучение наличия и пространственно-временной динамики экспрессии ключевых компонентов серотонинергической системы в ранних, доимплантационных эмбрионах мыши. Анализ транскриптомных данных показал, что мРНК ряда серотониновых рецепторов, включая 5-НТ<sub>1D</sub>, 5-НТ<sub>5A</sub>, 5-НТ<sub>5B</sub> и 5-НТ<sub>7</sub>, экспрессируются в ооците, зиготе и на последующих стадиях доимплантационного развития. Учитывая отсутствие транскрипции до активации зиготического генома, которая у мышей происходит на стадии двух бластомеров, можно заключить, что транскрипты, детектируемые на стадиях ооцита и зиготы, имеют материнское происхождение. Кроме того, экспрессия рецептора 5-НТ<sub>1B</sub> наблюдается со стадии двухклеточного, а 5-НТ<sub>2B</sub> – со стадии четырехклеточного эмбриона, что, вероятно, отражает вовлечение зиготического генома в поддержание серотонинергической сигнализации.

Проведенный иммуногистохимический анализ с использованием специфических антител к рецепторам 5-НТ<sub>1D</sub>, 5-НТ<sub>1B</sub>, 5-НТ<sub>2B</sub>, 5-НТ<sub>5A</sub> и 5-НТ<sub>7</sub> подтвердил присутствие соответствующих белков на различных этапах оогенеза и раннего эмбриогенеза мыши. Уровень иммунореактивности, а также стадийспецифичная динамика их локализации служат косвенным указанием на функциональную активность данных рецепторных комплексов. На основании совокупности полученных транскриптомных профилей и результатов иммуноцитохимической визуализации можно сделать вывод о том, что доимплантационный эмбрион обладает набором серотониновых рецепторов, сопоставимым с тем, что обеспечивает медиаторную передачу во взрослых дифференцированных тканях.

Отдельного внимания заслуживает пространственная организация детектируемых компонентов. Распределение рецепторов 5-НТ<sub>1B</sub> и 5-НТ<sub>2B</sub> на стадии GV-ооцита характеризуется преимущественно локализацией в

центральной области клетки, тогда как уже на стадии зиготы начинает преобладать периферический паттерн. К стадии бластоцисты локализация рецептора 5-HT<sub>1B</sub> меняется, концентрируясь преимущественно в клетках трофэктодермы по сравнению с клетками внутренней клеточной массы. Аналогичная тенденция к компартиментализации наблюдалась и в отношении рецептора 5-HT<sub>7</sub>. Вопрос активности рецепторов, находящихся в глубоких слоях цитоплазмы, остается предметом научного обсуждения. Одно из объяснений заключается в том, что это пулы синтезируемых и депонируемых молекул, временно находящихся в неактивном состоянии или рециклинге.

Альтернативная гипотеза предполагает, что трансмиттеры, в том числе серотонин, изначально могли выступать в роли внутриклеточных регуляторов биосинтетических процессов (Buznikov, 1989). В литературе появляются данные о том, что рецепторы, сопряженные с G-белком, расположенные на мембранах внутриклеточных органелл, способны запускать в цитоплазме сигнальные каскады вторичных мессенджеров (Fasciani et al., 2022). Подобная внутриклеточная активность рецептора L-ДОФА GPR143 была убедительно показана на модели клеток пигментного эпителия сетчатки (Bueschbell et al., 2022). Данное допущение согласуется с исследованиями о внутриклеточном действии трансмиттеров в раннем развитии. Например, в бластуле морского ежа дофамин и рецептор D1 колокализуются во внутриклеточных гранулах, топографически связанных с базальными тельцами ресничек (Katow et al., 2010). В контексте представленной работы важно отметить вероятное значение пространственной компартиментализации для внутриклеточной физиологической активности мембранных рецепторов (Klauer et al., 2024).

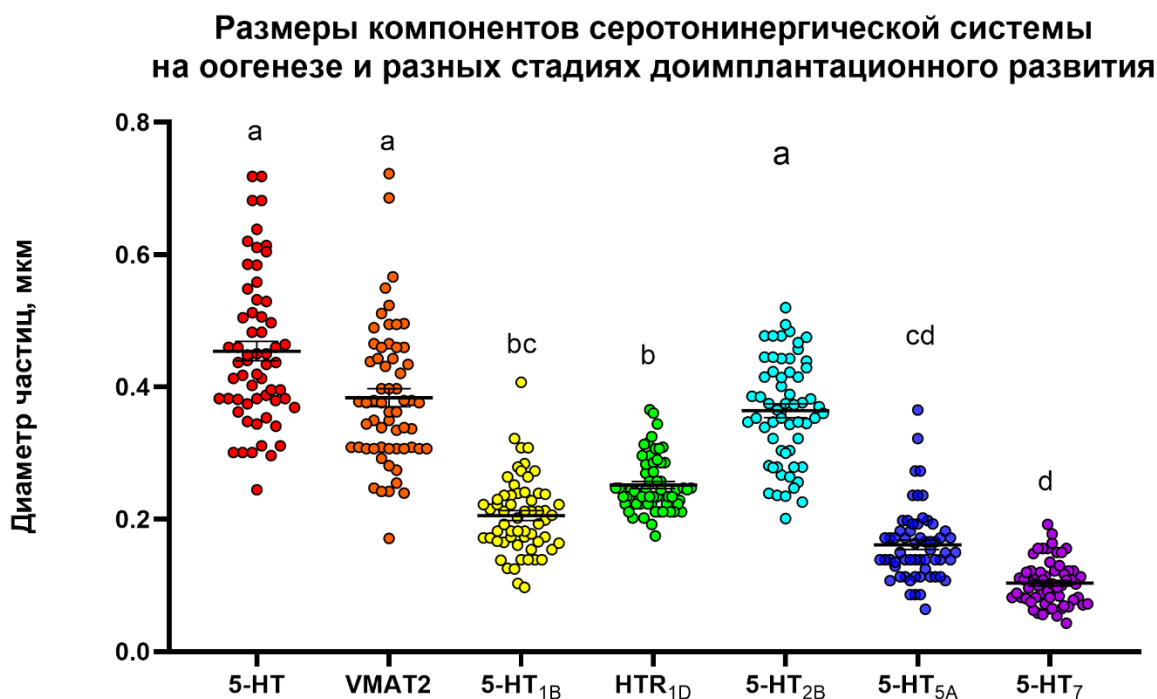
В отличие от других изученных белков, рецептор 5-HT<sub>1D</sub> демонстрирует преимущественно кортикальную локализацию на всех этапах оогенеза и эмбриогенеза, при этом сохраняется градиент интенсивности сигнала по отношению к некортикальной цитоплазме. Эти наблюдения согласуются с данными об экспрессии мРНК данного рецептора у доимплантационных эмбрионов и влиянии его антагонистов на раннее развитие (Vesela et al., 2003).

У ранних эмбрионов мыши основная локализация серотонина также постепенно смещается в кортикальный слой. Наличие рецепторов серотонина в плазмолемме и транспортеров в прилежащем субмембранном слое эмбрионов поддерживает гипотезу о вовлечении серотонина в межклеточные взаимодействия между бластомерами, аналогично механизмам у морских ежей (Shmukler, 1993). Стоит отметить, что главной мишенью таких паракринных и аутокринных регуляторных событий может выступать кортикальный цитоскелет (Grigor'ev, 1988; Cornea-Hebert et al., 2002).

В рамках работы была также проведена оценка размеров частиц серотонина, транспортера VMAT2 и пяти серотониновых рецепторов, детектируемых иммуногистохимическим методом (данные представлены на Рисунке 30). Сравнение показало, что данные компоненты серотонинергической системы имеют различающиеся размеры, за исключением серотонина, везикулярного транспортера VMAT2 и рецептора 5-HT<sub>2B</sub>. Отсутствие значимых различий в размерах структур, содержащих серотонин и транспортер VMAT2, может свидетельствовать о том, что в оогенезе и раннем эмбриогенезе специализированные везикулы с VMAT2 аккумулируют серотонин, препятствуя его деградации моноаминоксидазой.

В литературе описаны факты одновременной экспрессии нескольких функционально активных рецепторов для одного лиганда в раннем эмбриогенезе (Veselovska et al., 2015; Qiao et al., 2020). Теоретическая вероятность подобного феномена для различных типов серотониновых рецепторов упоминалась ранее (Shmukler, Nikishin, 2012). Выявленные в настоящей работе данные о дифференциальной пространственной локализации и динамике экспрессии рецепторов серотонина позволяют предположить, что многообразие рецепторов может определяться дифференциацией их функций, среди которых регуляция метаболизма, коммуникация в системе «ооцит-кумулюс» и взаимодействие бластомеров. Ранее также отмечалась корреляция между функциональной активностью серотонина и процессом активации зиготической транскрипции у

млекопитающих, который взаимосвязан с эпигенетическими модификациями гистонов (Farely et al., 2019; Romero-Reyes et al., 2021). Для подтверждения механистической роли соответствующих рецепторов в будущих исследованиях потребуется использование моделей с таргетными нокаутами или селективной фармакологической блокадой специфических рецепторных мишеней.



**Рисунок 30.** Сравнение линейных размеров иммунопозитивных кластеров компонентов серотонинергической системы, выявленных на конфокальных изображениях ооцитов и ранних эмбрионов мыши. Данные представлены в виде совокупности индивидуальных значений (точки), среднего значения (горизонтальная черта) и стандартной ошибки среднего (усы). Различия между группами оценивали с использованием критерия Краскела–Уоллиса. Разными буквами обозначены группы компонентов серотонинергической системы, статистически значительно различающиеся между собой по линейным размерам.

Наличие везикулярного транспорта моноаминов в клетках ранних эмбрионов свидетельствует в пользу вероятной активности серотонина в качестве сигнальной молекулы межклеточной коммуникации. Данные транскриптомного анализа выявили высокую экспрессию мРНК везикулярного транспортера *Vmat2* на протяжении оогенеза и раннего эмбриогенеза. Иммуногистохимический анализ подтвердил трансляцию этого

гена и показал присутствие белка VMAT2 на стадиях GV-ооцита, зиготы и бластоцисты, при этом максимальная интенсивность флуоресценции была зафиксирована на стадии GV-ооцита. Важным наблюдением является то, что пространственные паттерны распределения внутриклеточного серотонина и транспортера VMAT2 в ооцитах и зиготах демонстрируют высокую степень топографического совпадения. Это указывает на возможную функцию VMAT2 как механизма внутриклеточного депонирования и компартментализации серотонина.

Для оценки функциональной значимости этого пула была применена *in vivo* модель фармакологического истощения моноаминов с помощью резерпина. Сохранение эстрального цикла и формирование овулировавших МП-ооцитов свидетельствуют об отсутствии выраженного токсического влияния препарата на оогенез. Снижение уровня серотонина в яичниках экспериментальных животных было подтверждено методами количественной ВЭЖХ и иммуногистохимии. Анализ данных показал, что семидневное введение резерпина приводит к снижению пула серотонина в GV-ооцитах почти вдвое, тогда как в МП-ооцитах степень истощения оказалась менее выраженной. Это различие может быть связано с тем, что концентрация серотонина в просвете яйцевода превышает таковую в строме яичника (Amenta et al., 1992). Серотонин является одним из факторов, поддерживающих поздние этапы мейотического созревания ооцита (Alyoshina et al., 2023). Исходя из этого, можно предположить более высокую интенсивность мембранного захвата моноамина с помощью транспортера SERT во время нахождения эмбриона в яйцеводе.

К стадии бластоцисты интенсивность иммунофлуоресценции как VMAT2, так и самого серотонина снижается. Уменьшение пула депонированного серотонина может быть следствием его катаболизма ферментом MAO-A, активирующимся на данном этапе. В дальнейшем генерация эндогенного серотонина в растущем организме возобновляется

преимущественно после закладки внезародышевых структур и формирования плаценты (Wu et al., 2016).

В настоящий момент имеются обширные данные о влиянии серотонина на компетенцию, созревание и селекцию ооцитов (Krantic et al., 1992; Sheng et al., 2005; Tinicul et al., 2008; Lister et al., 2009; Alyoshina et al., 2023). В рамках нашей работы предполагается, что накопленный серотонин может служить не только сигнальной молекулой межклеточной коммуникации, но и субстратом для серотонилирования внутриклеточных белков (Bader, 2019; Voronezhskaya, 2021; Chan et al., 2024). Эти белковые модификации могут обеспечивать функциональную поддержку эмбриона до полноценной активации зиготического генома. Наряду с мембранным транспортом серотонина, обеспечивающим поступление молекулы в клетку, везикулярный транспорт моноаминов в данном случае является одним из механизмов, обеспечивающих гомеостаз цитоплазматической концентрации серотонина. Соответственно, дисфункция или фармакологическая модуляция активности белков-транспортеров может оказывать влияние на процессы созревания и раннего эмбриогенеза. Оценка функциональной активности транспортеров SERT и VMAT2 в перспективе могла бы рассматриваться как один из параметров при определении качества ооцитов в рамках вспомогательных репродуктивных технологий. Тем не менее, для выявления возможных последствий таких нарушений требуются дополнительные исследования, направленные на оценку эффектов сочетанной блокады различных элементов серотонинергической системы.

### **Роль моноаминоксидазы А в раннем эмбриональном развитии**

Одним из ключевых механизмов, определяющих уровень цитоплазматического серотонина в раннем развитии, является ферментативная система его деградации, представленная моноаминоксидазой А. Результаты исследования демонстрируют, что MAO-A экспрессируется и проходит стадию функциональной активации на ранних этапах эмбриогенеза

мышь, начиная с одноклеточной зиготы и вплоть до стадии бластоцисты. Детекция данного фермента в раннем развитии согласуется с актуальными данными о функционировании компонентов серотонинергической системы до момента имплантации.

Наблюдаемая пространственная динамика флуоресцентного сигнала MAO-A от зиготы к бластоцисте может отражать перестройку внутриклеточных метаболических путей, связанных с регуляцией баланса моноаминов. Выявленные кластеры фермента указывают на возможное формирование специфических компартментов, обеспечивающих локальную регуляцию концентрации молекул. Физическим субстратом для агрегации этих структур выступают митохондрии, наружные мембраны которых служат сайтом локализации для моноаминоксидаз (Santin et al., 2020, Luo et al., 2025). Наличие компартментализации фермента в кортикальной области клеток позволяет предположить, что MAO-A формирует биохимический барьер, способствующий предотвращению избытка поступающих через мембрану моноаминов.

Функциональные тесты *in vitro* показали, что присутствие белка MAO-A на ранних стадиях развития не сопровождается его выраженной каталитической активностью. Это может быть связано с необходимостью предварительного накопления порогового пула субстрата (серотонина) (Finberg, Rabey, 2016), а также с зависимостью от глобальной активации зиготического генома (Minami et al., 2007; Svoboda, 2018). В период ранних делений дробления преимущественно осуществляется интернализация внешнего серотонина через SERT и его депонирование посредством VMAT2, однако по достижении стадии бластоцисты механизм деградации избытка моноаминов с участием MAO-A становятся более выраженным и эффективно предотвращает накопление экзогенного серотонина.

Согласно имеющимся литературным данным, активность MAO-A в этот период может выполнять не только функцию утилизации моноаминов, но и регуляторную роль. Ряд исследований указывает на корреляцию между

экспрессией MAO-A и успешностью процесса имплантации (Zhang et al., 2011; Yu et al., 2024), в то время как ее дефицит или фармакологическое блокирование могут приводить к нарушениям формирования окна имплантации (Henriquez et al, 2006).

### **Источники серотонина и его влияние на жизнеспособность эмбрионов**

Значимым результатом данного исследования является подтверждение того, что доимплантационный эмбрион млекопитающих представляет собой не просто пассивного реципиента материнских сигналов, но потенциально способен к эндогенному биосинтезу серотонина. В условиях инкубации эмбрионов с предшественником 5-HTP на фоне ингибирования деградации паргилином было зафиксировано статистически значимое накопление серотонина как в клетках трофэктодермы, так и во внутренней клеточной массе. Это указывает на функциональную активность ферментов синтеза, прежде всего декарбоксилазы DDC, на доимплантационных этапах развития. Ранее в литературе преобладало представление, согласно которому серотонин в эмбрионе имеет преимущественно материнское происхождение, поступая путем трансплацентарного транспорта (Yavarone et al., 1993; Amireault et al., 2013; Kliman et al., 2018). Полученные данные дополняют эту концепцию, указывая на наличие метаболической автономности эмбриона при доступности аминокислотных предшественников.

В контексте метаболической автономности заслуживает внимания выявленный компенсаторный эффект флуоксетина, блокирующего работу транспортера SERT. В эмбрионах от самок, получавших препарат, было зарегистрировано повышение уровня внутриклеточного серотонина на 43% в обеих клеточных популяциях бластоцисты. Данный ответ, сопровождающийся тенденцией к увеличению уровня мРНК *Ddc*, может свидетельствовать о чувствительности эмбриона к серотонину и способности активировать механизмы синтеза серотонина *de novo* при его недостатке.

Подобная адаптивная метаболическая пластичность важна для поддержания уровня медиатора в условиях изменения микроокружения.

Важно отметить, что экспериментальное моделирование повышенного содержания внутриклеточного серотонина, как путем добавления паргилина и 5-НТ, так и при воздействии флуоксетина, не привело к нарушению программ спецификации клеток. Сохранение профилей экспрессии ключевых маркеров плюрипотентности (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog*) и ранней специализации (*Cdx2*, *Gata6*) указывает на то, что серотонин напрямую не нарушает процесс спецификации клеток. Имеются данные об ингибирующем влиянии флуоксетина на дифференцировку или репрограммирование в культурах клеток (Kusakawa et al., 2008; Sinenko et al., 2023). Однако интактный эмбрион *in vivo*, по всей видимости, обладает активной системой регуляции серотонинергических процессов, позволяющей нивелировать возможные токсические эффекты и адаптироваться к флуктуациям его концентрации.

Оценка клинических перспектив позволяет предполагать сохранение жизнеспособности эмбриона в условиях экспериментально измененного уровня серотонина. Бластоцисты с повышенным внутриклеточным содержанием серотонина (при одновременной инкубации с серотонином и паргилином) демонстрировали сопоставимую с контролем частоту имплантации *in vitro*, сохраняли морфологическую нормальность, физиологический митохондриальный потенциал и базальные уровни генерации активных форм кислорода.

Полученные данные расширяют представления о регуляции эмбрионального клеточного гомеостаза. Установленные компенсаторные реакции на воздействие флуоксетина на доимплантационных стадиях развития контрастируют с описанными в литературе негативными эффектами приема СИОЗС на более поздних стадиях органогенеза (Morrison et al., 2005; Thibeault et al., 2017; Tkachenko et al., 2025). Серотонин может рассматриваться как молекулярный сигнальный фактор, баланс которого активно поддерживается системами захвата (SERT), везикулярного транспорта (VMAT2) и деградации

(MAO-A), создавая оптимальную среду для процессов развития. Несмотря на отсутствие немедленного эмбриотоксического эффекта, способного нарушить имплантацию при кратковременном воздействии, выживаемость эмбриона не исключает вероятности отсроченных молекулярных последствий, поскольку серотонин может выступать эпигенетическим модификатором на последующих этапах онтогенеза.

### **Серотонилирование гистона H3 как предпосылка возможных отсроченных эффектов эпигенетической регуляции**

Важным механизмом формирования устойчивых эпигенетических изменений является посттрансляционная модификация белков. Одним из таких процессов выступает серотонилирование – ферментативно опосредованное ковалентное присоединение молекул серотонина к остаткам глутамина посредством реакции трансамидирования (Walther et al., 2003). Ранее было показано, что данная модификация активно протекает в клетках эмбрионов до формирования нервных структур (Ivashkin et al., 2015). Главная особенность данных реакций заключается в их отсроченном действии: эффект на ранних этапах дробления может не проявляться, однако формирующиеся эпигенетические метки способны оказывать влияние на направление клеточной дифференцировки на более поздних, постимплантационных стадиях развития (Ivashkin et al., 2019).

Результаты настоящего исследования демонстрируют, что повышение уровня внутриклеточного серотонина в эмбрионе может индуцировать усиление серотонилирования гистона H3. Соответствующий сигнал локализуется не только в ядре, но и широко представлен в цитоплазме клеток бластоцисты. Концепция существования внеядерных гистонов активно обсуждается в литературе (Singh et al., 2021). В ряде исследований такие белки ассоциируются с клеточным стрессом, воспалительными реакциями и онкогенезом (Okamura et al., 2008; Schiera et al., 2013; Han et al., 2014; Nair et al., 2018), а также с патологиями беременности, такими как преэклампсия

(Baig et al., 2014). В то же время экспорт гистонов в цитоплазму наблюдается и при нормальных физиологических процессах, в частности, при эритропоэзе (Hattangadi et al., 2014; Zlatanova et al., 1990) или в клетках иммунной системы (Parseghian, Luhrs, 2006). Учитывая потребность быстро делящегося эмбриона в значительном пуле свободных гистонов для формирования хроматина, можно предположить наличие механизма, при котором избыток серотонина связывается цитоплазматическим пулом гистонов до момента их транспорта в ядро (Torres-Padilla et al., 2006). Возрастание сигнала как во внутренней клеточной массе, так и в трофэктодерме указывает на то, что серотонилирование выступает не специфической, а скорее адаптивной клеточной реакцией. Ферментативная природа наблюдаемой модификации была подтверждена экспериментами с ингибитором транскламиназ цистамином, применение которого приводило к снижению уровня серотонилирования H3 до базальных значений.

Значимость серотонилирования гистонов подтверждается данными о том, что ковалентное связывание серотонина с гистоном H3 регулирует аффинность хроматина к транскрипционному фактору TFIID, влияя на экспрессию нейтральных генов (Farrelli et al., 2019). Экспериментальное нарушение этого механизма приводило к отклонениям в последующей нейрональной дифференцировке. Также показана возможная роль эпигенетического серотонилирования в онкогенезе (Chen et al., 2024) и развитии сенсо-невральных патологий (Sardar et al., 2023). Выявленный эффект эпигенетического влияния серотонина на серотонилирование гистона H3 в клетках бластоцисты требует дальнейшего расширенного изучения для оценки отсроченных последствий подобных модификаций в процессе эмбрионального развития.

## 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 млекопитающих представляет собой автономную систему, способную не только к захвату серотонина из окружающей среды посредством мембранного транспортера SERT, 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<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>5A</sub> и 5-HT<sub>7</sub> 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 серотонина эмбрион способен компенсаторно усиливать его эндогенный биосинтез.

Показано, что экспериментально вызванное повышение внутриклеточного уровня серотонина не приводит к нарушению базовых параметров жизнеспособности эмбриона. Показатели митохондриальной активности, уровень генерации активных форм кислорода, успешность имплантации в модели *in vitro*, а также профили экспрессии ключевых маркеров плюрипотентности (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog*) и ранней клеточной специализации (*Cdx2*, *Gata6*) остаются стабильными.

Значимым итогом работы стало описание способности эмбриона реагировать на изменение содержания серотонина 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, влияя на процессы клеточной дифференцировки в дальнейшем развитии.

## ВЫВОДЫ

- 1) Эндогенный синтез из предшественника 5-НТР, 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-НТ<sub>1B</sub>, 5-НТ<sub>1D</sub>, 5-НТ<sub>2B</sub>, 5-НТ<sub>5A</sub> и 5-НТ<sub>7</sub>, пространственная локализация которых характеризуется специфичностью и динамикой. К стадии зиготы распределение рецепторов 5-НТ<sub>1D</sub>, 5-НТ<sub>2B</sub>, 5-НТ<sub>5A</sub> и 5-НТ<sub>7</sub> 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 (MAO-A) 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.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) Бузников Г.А. Донервные трансмиттеры как регуляторы эмбриогенеза. Современное состояние проблемы // Онтогенез. – 2007. – № 38(4). – С. 262-270.
- 2) Бузников Г.А. Нейротрансмиттеры в эмбриогенезе // Москва, Наука. – 1987. – 232 с.
- 3) Бузников Г.А. Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития // Москва, Наука. – 1967. – 265 с.
- 4) Бузников Г.А., Григорьев Н.К. Эффект биогенных моноаминов и их антагонистов на кортикальный цитоплазматический слой у ранних зародышей морских ежей // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 1990. – Т. 26. – С. 614-622.
- 5) Григорьев Н.Г. Кортикальный слой цитоплазмы – возможное место действия донервных трансмиттеров // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 1988. – Т. 24. – № 5. С. 625-629.
- 6) 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.
- 7) Шмуклер Ю.Б. Специфическое связывание [H<sup>3</sup>] 8-ОН-DРАТ ранними зародышами морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* // Биологические мембраны. – 1992. – Т. 9. – №. 10-11. – С. 1167-1169.
- 8) Шмуклер Ю.Б., Чайлахян Л.М., Карпович А.Л., Харитон В.Ю., Квавилашвили И.Ш. Межклеточные взаимодействия у ранних зародышей морских ежей. I. Существование различных типов делений дробления зародышей половинного размера морских ежей // Онтогенез. – 1981б. – Т. 12. – № 2. – С. 197-201.
- 9) Шмуклер Ю.Б., Чайлахян Л.М., Смолянинов В.В., Блюх Ж.Л., Карпович А.Л., Гусарева Э.В., Найдено Т.Х., Хашаев З.Х.-М., Медведева Т.Д. Межклеточные взаимодействия у ранних зародышей морских ежей. II.

Датированное механическое разделение бластомеров // Онтогенез. – 1981а. – Т. 12. – № 4. – С. 398-403.

10) Achary B., Rohini S. Electron micrograph studies on the effects of fluoxetine in depression-induced adult female rat ovaries // Indian Journal of Science and Technology. – 2021. – V. 14. – №. 5. – P. 406-414.

11) Acharya S.B., Goswami N.G., Debnath P.K. Uterine and placental 5-HT profile in different gestational period of albino rats // Indian Journal of Experimental Biology. – 1989. – V. 27. – №. 6. – P. 505-509.

12) Alpini G., Invernizzi P., Gaudio E., Venter J., Kopriva S., Bernuzzi F., Onori O., Franchitto A., Coufal M., Frampton G., Alvaro D., Lee S.P., Marzioni M., Benedetti A., DeMorrow S. Serotonin metabolism is dysregulated in cholangiocarcinoma, which has implications for tumor growth // Cancer research. – 2008. – V. 68. – №. 22. – P. 9184-9193.

13) Alyoshina N.M., Tkachenko M.D., Malchenko L.A., Shmukler Y.B., Nikishin D.A. Uptake and metabolization of serotonin by granulosa cells form a functional barrier in the mouse ovary // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – V. 23. – №. 23. – 14828.

14) Alyoshina N.M., Tkachenko M.D., Nikishina Y.O., Nikishin D.A. Serotonin Transporter Activity in Mouse Oocytes Is a Positive Indicator of Follicular Growth and Oocyte Maturity // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – V. 24. – №. 14. – 11247.

15) Amenta F., Vega J.A., Ricci A., Collier W.L. Localization of 5-hydroxytryptamine-like immunoreactive cells and nerve fibers in the rat female reproductive system // The Anatomical Record. – 1992. – V. 233. – №. 3. – P. 478-484.

16) Amireault P., Dube F. Intracellular cAMP and calcium signaling by serotonin in mouse cumulus-oocyte complexes // Molecular pharmacology. – 2005a. – V. 68. – №. 6. – P. 1678-1687.

- 17) Amireault P., Dubé F. Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos // *Biology of reproduction.* – 2005b. – V. 73. – №. 2. – P. 358-365.
- 18) Amireault P., Sibon D., Côté F. Life without peripheral serotonin: insights from tryptophan hydroxylase 1 knockout mice reveal the existence of paracrine/autocrine serotonergic networks // *ACS chemical neuroscience.* – 2013. – V. 4. – №. 1. – P. 64-71.
- 19) Aprison E. Z., Dzitoyeva S., Ruvinsky I. The roles of TGF $\beta$  and serotonin signaling in regulating proliferation of oocyte precursors and germline aging // *bioRxiv.* – 2024.
- 20) Asada M., Ebihara S., Yamanda S., Niu K., Okazaki T., Sora I., Arai H. Depletion of serotonin and selective inhibition of 2B receptor suppressed tumor angiogenesis by inhibiting endothelial nitric oxide synthase and extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation // *Neoplasia.* – 2009. – V. 11. – №. 4. – P. 408-417.
- 21) Azmitia E. C. Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis // *Brain Research Bulletin.* – 2001. – V. 5 (56). – P. 413–424.
- 22) Bader M. Serotonylation: serotonin signaling and epigenetics // *Frontiers in Molecular Neuroscience.* – 2019. – V. 12. – P. 288.
- 23) Baghban Rahimi S., Mohebbi A., Vakilzadeh G., Biglari P., Jahromi S.R., Mohebi S.R., Shirian S., Gorji A., Ghaemi A. Enhancement of therapeutic DNA vaccine potency by melatonin through inhibiting VEGF expression and induction of antitumor immunity mediated by CD8<sup>+</sup> T cells // *Archives of virology.* – 2018. – V. 163. – №. 3. – P. 587-597.
- 24) Baig S., Kothandaraman N., Manikandan J., Rong L., EE K.H., Hill J., Lai C.W., Tan W.Y., Yeoh F., Kale A., Su L.L., Biswas A., Vasoo S., Choolani M. Proteomic analysis of human placental syncytiotrophoblast microvesicles in preeclampsia // *Clinical proteomics.* – 2014. – T. 11. – №. 1. – C. 40.

- 25) Baronio D., Chen Y., Decker A.R., Enckell L., Fernández-López B., Semenova S., Puttonen H.A.J., Cornell, R.A., Panula P. Vesicular monoamine transporter 2 (SLC18A2) regulates monoamine turnover and brain development in zebrafish // *Acta Physiologica*. – 2022. – V. 234. – №. 1. – P. e13725.
- 26) Basu B., Desai R., Balaji J. Serotonin in pre-implantation mouse embryos is localized to the mitochondria and can modulate mitochondrial potential // *Reproduction*. – 2008. – № 5 (135). – P. 657–669.
- 27) Bell C.E., Watson A.J. p38 MAPK regulates cavitation and tight junction function in the mouse blastocyst // *PloS one*. – 2013. – V. 8. – №. 4. – e59528.
- 28) Bérard A., Levin M., Sadler T., Healy D. Selective serotonin reuptake inhibitor use during pregnancy and major malformations: the importance of serotonin for embryonic development and the effect of serotonin inhibition on the occurrence of malformations // *Bioelectricity*. – 2019. – V. 1. – №. 1. – P. 18-29.
- 29) Berger M., Gray J. A., Roth B. L. The expanded biology of serotonin // *Annual review of medicine*. – 2009. – V. 60. – №. 1. – P. 355-366.
- 30) Beyer T., Danilchik M., Thumberger T., Vick P., Tisler M., Schneider I., Bogusch S., Andre P., Ulmer B., Walentek P., Niesler B., Blum M., Schweickert A. Serotonin signaling is required for Wnt-dependent GRP specification and leftward flow in *Xenopus* // *Current Biology*. – 2012. – V. 22. – № 1. – P. 33-39.
- 31) Blakeley P.M., Capron L.E., Jensen A.B., O'Donnell K.J., Glover V. Maternal prenatal symptoms of depression and down regulation of placental monoamine oxidase A expression // *Journal of Psychosomatic Research*. – 2013. – V. 75. – №. 4. – P. 341-345.
- 32) Boadle-Biber M. C. Regulation of serotonin synthesis // *Progress in biophysics and molecular biology*. – 1993. – V. 60. – №. 1. – P. 1-15.
- 33) Bódis J., Török A., Tinneberg H.R., Hanf J., Papenfuss F., Schwarz H. Serotonin induces progesterone release from human granulosa cells in a superfused granulosa cell system // *Archives of gynecology and obstetrics*. – 1993. – V. 253. – P. 59-64.

- 34) Bogomolov A.I., Voronezhskaya E.E. An increase in the level of intracellular serotonin in blastomeres leads to the disruption in the spiral cleavage pattern in the mollusc *Lymnaea stagnalis* // Russian Journal of Developmental Biology. – 2022. – V. 53. – №. 2. – P. 115-120.
- 35) Bonnin A., Goeden N., Chen K., Wilson M.L., King J., Shih J.C., Blakely R.D., Deneris E.S., Levitt P. A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain // Nature. – 2011. – V. 472. – №. 7343. – P. 347-350.
- 36) Bueschbell B., Manga P., Schiedel A. C. The many faces of G protein-coupled receptor 143, an atypical intracellular receptor // Frontiers in Molecular Biosciences. – 2022. – V. 9. – P. 873777.
- 37) Buznikov G.A. Transmitters in early embryogenesis (new data) // Ontogenez. – 1989. – V. 20. – №. 6. – P. 637-646.
- 38) Buznikov G.A., Chudakova I.V., Berdysheva L.V., Vyazmina N.M. The role of neurohumours in early embryogenesis: III. Pharmacological analysis of the role of neurohumours in cleavage divisions // Development. – 1970. – V. 23. – № 3. – P. 549 – 569.
- 39) Buznikov G.A., Chudakova I.V., Zvezdina N.D. The role of neurohumours in early embryogenesis.: I. Serotonin content of developing embryos of sea urchin and loach // Development. – 1964. – V. 12. – №. 4. – P. 563-573.
- 40) Buznikov G.A., Nikitina L.A., Galanov A.Y., Malchenko L.A., Trubnikova O.B. The control of oocyte maturation in the starfish and amphibians by serotonin and its antagonists // International Journal of Developmental Biology. – 1993. – V. 37. – P. 363-363.
- 41) Buznikov G.A., Nikitina L.A., Voronezhskaya E.E., Bezuglov V.V., Dennis Willows A. O., Nezlin L.P. Localization of serotonin and its possible role in early embryos of *Tritonia diomedea* (Mollusca: Nudibranchia) // Cell and tissue research. – 2003. – V. 311. – №. 2. – P. 259-266.
- 42) Buznikov G.A., Peterson R.E., Nikitina L.A., Bezuglov V.V., Lauder J.M. The pre-nervous serotonergic system of developing sea urchin embryos and larvae:

- pharmacologic and immunocytochemical evidence // *Neurochemical research*. – 2005. – V. 30. – №. 6. – P. 825-837.
- 43) Buznikov G.A., Shmukler Y.B., Lauder J.M. From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development? // *Cellular and molecular neurobiology*. – 1996. – V. 16. – №. 5. – P. 533-559.
- 44) Bytautiene E., Vedernikov Y.P., Saade G.R., Romero R., Garfield R.E. Endogenous mast cell degranulation modulates cervical contractility in the guinea pig // *American journal of obstetrics and gynecology*. – 2002. – V. 186. – №. 3. – P. 438-445.
- 45) Calibuso-Salazar M.J., Ten Eyck G.R. A novel whole-embryo culture model for pharmaceutical and developmental studies // *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. – 2015. – V. 73. – P. 21-26.
- 46) Carrasco G., Cruz M.A., Dominguez A., Gallardo V., Miguel P., González C. The expression and activity of monoamine oxidase A, but not of the serotonin transporter, is decreased in human placenta from pre-eclamptic pregnancies // *Life sciences*. – 2000. – V. 67. – №. 24. – P. 2961-2969.
- 47) Cerdà J., Reich G., Wallace R.A., Selman K. Serotonin inhibition of steroid-induced meiotic maturation in the teleost *Fundulus heteroclitus*: role of cyclic AMP and protein kinases // *Molecular Reproduction and Development*. – 1998. – V. 49 – №. 3. – P. 333–341.
- 48) Chan J.C., Alenina N., Cunningham A.M., Ramakrishnan A., Shen L., Bader M., Maze I. Serotonin transporter-dependent histone serotonylation in placenta contributes to the neurodevelopmental transcriptome // *Journal of molecular biology*. – 2024. – V. 436. – №. 7. – P. 168454.
- 49) Chen H.-C., He P., McDonald M., Williamson M.R., Varadharajan S., Lozzi B., Woo J., Choi D.-J., Sardar D., Huang-Hobbs E., Sun H., Ippagunta S.M., Jain A., Rao G., Merchant T.E., Ellison D.W., Noebels J.L., Bertrand K.C., Mack S.C., Deneen B. Histone serotonylation regulates ependymoma tumorigenesis // *Nature*. – 2024. – V. 632. – №. 8026. – P. 903-910.

- 50) Choi D.S., Ward S.J., Messaddeq N., Launay J.M., Maroteaux L. 5-HT<sub>2B</sub> receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and myocardial cells // *Development*. – 1997. – V. 124. – №. 9. – P. 1745-1755.
- 51) Choi I.G., Kee B.S., Son H.G., Ham B.J., Yang B.H., Kim S.H. Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenase, dopamine and serotonin transporters in familial and non-familial alcoholism // *European Neuropsychopharmacology*. – 2006. – V. 16. – №. 2. – P. 123-128.
- 52) Čikoš Š., Fabian D., Makarevich A.V., Chrenek P., Koppel J. Biogenic monoamines in preimplantation development // *Human Reproduction*. – 2011. – V. 26. – №. 9. – P. 2296–2305.
- 53) Clark J., Meisner S., Torkkeli P.H. Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase and muscarinic ACh receptors in the antenna during development of the sphinx moth *Manduca sexta* // *Cell and tissue research*. – 2005. – V. 320. – №. 1. – P. 163-173.
- 54) Clark K.E., Mills E.G., Otte T.E., Stys S.J. Effect of serotonin on uterine blood flow in pregnant and nonpregnant sheep // *Life Sciences*. – 1980. – V. 27. – №. 25-26. – P. 2655-2661.
- 55) Colas J.F., Launay J.M., Kellermann O., Rosay P., Maroteaux L. Drosophila 5-HT<sub>2</sub> serotonin receptor: coexpression with fushi-tarazu during segmentation // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1995. – V. 92. – №. 12. – P. 5441-5445.
- 56) Colas J.F., Launay J.M., Maroteaux L. Maternal and zygotic control of serotonin biosynthesis are both necessary for Drosophila germband extension // *Mechanisms of development*. – 1999b. – V. 87. – №. 1-2. – P. 67-76.
- 57) Colas J.F., Launay J.M., Vonesch J.L., Hickel P., Maroteaux L. Serotonin synchronises convergent extension of ectoderm with morphogenetic gastrulation movements in Drosophila // *Mechanisms of development*. – 1999a. – V. 87. – №. 1-2. – P. 77-91.
- 58) Conn P. M. (ed.). *Neuroscience in medicine* // Springer Science & Business Media. – 2008. – 833 p.

- 59) Cornea-Hebert V., Watkins K.C., Roth B.L., Kroeze W.K., Gaudreau P., Leclerc N., Descarries L. Similar ultrastructural distribution of the 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptor and microtubule-associated protein MAP1A in cortical dendrites of adult rat // *Neuroscience*. – 2002. – V. 113. – №. 1. – P. 23-35.
- 60) Cornelius L.A., Nehring L.C., Harding E., Bolanowski M., Welgus H.G., Kobayashi D.K., Pierce R.A., Shapiro S.D. Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization // *The Journal of Immunology*. – 1998. – V. 161. – №. 12. – P. 6845-6852.
- 61) Côté F., Fligny C., Bayard E. Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2007. – № 1 (104). – P. 329–334.
- 62) de Freitas C.M., Busanello A., Schaffer L.F., Peroza L.R., Krum B.N., Leal C.Q., Chiapinotto Ceretta A.P., da Rocha J.P.T., Fachinetto R. Behavioral and neurochemical effects induced by reserpine in mice // *Psychopharmacology*. – 2016. – V. 233. – №. 3. – P. 457-467.
- 63) Dobretsov S.V., Qian P.J. Pharmacological induction of larval settlement and metamorphosis in the blue mussel *Mytilus edulis* L. // *Biofouling*. – 2003. – V. 19. – P. 57–63.
- 64) Domingues R.R., Wiltbank M.C., Hernandez L.L. The antidepressant fluoxetine (Prozac®) modulates estrogen signaling in the uterus and alters estrous cycles in mice // *Molecular and cellular endocrinology*. – 2023. – V. 559. – P. 111783.
- 65) Dubé F., Amireault P. Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos // *Life sciences*. – 2007. – V. 81. – №. 25-26. – P. 1627-1637.
- 66) Duerschmied D., Suidan G.L., Demers M., Herr N., Carbo C., Brill A., Cifuni S.M., Mauler M., Cicko S., Bader M., Idzko M., Bode C., Wagner D.D. Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2013. – V. 121. – №. 6. – P. 1008-1015.

- 67) Eiden L.E., Schäfer M.K., Weihe E., Schütz B. The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine // *Pflügers Archiv: European journal of physiology.* –2004. – V. 447. – № 5. – P. 636-640.
- 68) El-Merahbi R., Löffler M., Mayer A., Sumara G. The roles of peripheral serotonin in metabolic homeostasis // *FEBS letters.* – 2015. – V. 589. – №. 15. – P. 1728-1734.
- 69) Emanuelsson H. Autoradiographic localization in polychaete embryos of tritiated mesulergine, a selective antagonist of serotonin receptors that inhibits early polychaete development // *The International journal of developmental biology.* – 1992. – V. 36. – № 2. – P. 293-302.
- 70) Emanuelsson H. Localization of serotonin in cleavage embryos of *Ophryotrocha labronica* La Greca and Bacci // *Development Genes and Evolution.* – 1974. – V. 175. – № 4. – P. 253-271.
- 71) Eroglu C., Barres B.A. Regulation of synaptic connectivity by glia // *Nature.* – 2015. – № 468(7321). – P. 223–231.
- 72) Esteve J.M., Launay J.M., Kellermann O., Maroteaux L. Functions of serotonin in hypoxic pulmonary vascular remodeling // *Cell biochemistry and biophysics.* – 2007. – V. 47. – P. 33-43.
- 73) Falugi C., Diaspro A., Angelini C., Pedrotti M.L., Raimondo M., Robello M. Three-dimensional mapping of cholinergic molecules by confocal laser scanning microscopy in sea urchin larvae // *Micron.* – 2002. – V. 33. – P. 233–239.
- 74) Faria M., Prats E., Bellot M., Gomez-Canela C., Raldúa D. Pharmacological modulation of serotonin levels in zebrafish larvae: Lessons for identifying environmental neurotoxicants targeting the serotonergic system // *Toxics.* – 2021. – V. 9. – №. 6. – P. 118.
- 75) Farrelly L.A., Thompson R.E., Zhao S., Lepack A.E., Lyu Y., Bhanu N.V., Zhang B., Loh Y.H.E., Ramakrishnan A., Vadodaria K.C., Heard K.J., Erikson G., Nakadai T., Bastle R.M., Lukasak B.J., Zebroski III H., Alenina N., Bader M.,

- Berton O., Roeder R.G., Molina H., Gage F.H., Shen L., Garcia B.A., Li H., Muir T.W., Maze I. Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIID binding to H3K4me3 // *Nature*. – 2019. – V. 567. – №. 7749. – P. 535-539.
- 76) Fasciani I., Carli M., Petragnano F., Colaianni F., Aloisi G., Maggio R., Scarselli M., Rossi M. GPCRs in intracellular compartments: new targets for drug discovery // *Biomolecules*. – 2022. – V. 12. – №. 10. – P. 1343.
- 77) Finberg J.P.M., Rabey J.M. Inhibitors of MAO-A and MAO-B in psychiatry and neurology // *Frontiers in pharmacology*. – 2016. – V. 7. – P. 340.
- 78) Folk Jr G.E., Long J.P. Serotonin as a neurotransmitter: a review // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. – 1988. – V. 91. – №. 1. – P. 251-257.
- 79) Ford C.P., Gantz S.C., Phillips P.E.M, Williams J.T. Control of extracellular dopamine at dendrite and axon terminals // *Journal of Neuroscience*. – 2010. – №. 30(20). – P. 6975–6983.
- 80) Fröbe A., Čičin-Šain L., Jones G., Soldić Ž., Lukač J., Bolanča A., Kusić Z. Plasma free serotonin as a marker for early detection of breast cancer recurrence // *Anticancer research*. – 2014. – V. 34. – №. 3. – P. 1167-1169.
- 81) Fujiwara T., Nakada K., Shirakawa H., Miyazaki S. Development of inositol trisphosphate-induced calcium release mechanism during maturation of hamster oocytes // *Developmental Biology*. – 1993. – V. 156. – №. 1. – P. 69-79.
- 82) Fukumoto T., Blakely R., Levin M. Serotonin transporter function is an early step in left-right patterning in chick and frog embryos // *Developmental neuroscience*. – 2005. – V. 27. – №. 6. – P. 349-363.
- 83) Garramone G.K. Neurotransmitter receptor expression and activity in gastrulation and neurulation in the chicken model system. – 2024.
- 84) George S.J. Wnt pathway: a new role in regulation of inflammation // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2008. – V. 28. – №. 3. – P. 400-402.

- 85) Gershon M.D., Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders // *Gastroenterology*. – 2007. – V. 132. – №. 1. – P. 397-414.
- 86) Greenawalt J.W., Schnaitman C. An appraisal of the use of monoamine oxidase as an enzyme marker for the outer membrane of rat liver mitochondria // *The Journal of cell biology*. – 1970. – V. 46. – № 1. – P. 173-179.
- 87) Grieco D., Avvedimento E.V., Gottesman M.E. A role for cAMP-dependent protein kinase in early embryonic divisions // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1994. – V. 91. – № 21. – P. 9896-9900.
- 88) Grigor'ev N.G. The cortical layer of the cytoplasm--a possible site of the action of prenervous transmitters // *Zhurnal Evoliutsionnoi Biokhimii i Fiziologii*. – 1988. – V. 24. – №. 5. – P. 625-629.
- 89) Guiard B.P., Gotti G. The high-precision liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ECD) for monoamines neurotransmitters and their metabolites: a review // *Molecules*. – 2024. – V. 29. – №. 2. – P. 496.
- 90) Gulubova M., Vlaykova T. Chromogranin A-, serotonin-, synaptophysin- and vascular endothelial growth factor-positive endocrine cells and the prognosis of colorectal cancer: an immunohistochemical and ultrastructural study // *Journal of gastroenterology and hepatology*. – 2008. – V. 23. – №. 10. – P. 1574-1585.
- 91) Hadden C., Fahmi T., Cooper A., Savenka A.V., Lupashin V.V., Roberts D.J., Maroteaux L., Hauguel-de Mouzon S., Kilic F. Serotonin transporter protects the placental cells against apoptosis in caspase 3-independent pathway // *Journal of cellular physiology*. – 2017. – V. 232. – №. 12. – P. 3520-3529.
- 92) Hallett R.M., Girgis-Gabardo A., Gwynne W.D., Giacomelli A.O., Bisson J.N.P., Jensen J.E., Dvorkin-Gheva A., Hassell J.A. Serotonin transporter antagonists target tumor-initiating cells in a transgenic mouse model of breast cancer // *Oncotarget*. – 2016. – V. 7. – №. 33. – P. 53137.
- 93) Han M. J., Koc E. C., Koc H. Post-translational modification and mitochondrial relocalization of histone H3 during apoptosis induced by

- staurosporine // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2014. – T. 450. – №. 1. – C. 802-807.
- 94) Han Y., Zhang M., Duan J., Li L., Du J., Cheng H., Zhang S., Zhai Y., An X., Li Q., Zhang X., Li Z., Tang B. Maternal prepregnancy 5-hydroxytryptamine exposure affects the early development of the fetus // *Frontiers in Physiology*. – 2022. – V. 13. – P. 761357.
- 95) Hannon J., Hoyer D. Serotonin receptors and systems: endless diversity? // *Acta Biologica Szegediensis*. – 2002. – V. 46. – №. 1-2. – P. 1-12.
- 96) Hattangadi S.M., Martinez-Morilla S., Patterson H.C., Shi J., Burke K., Avila-Figueroa A., Venkatesan S., Wang J., Paulsen K., Görlich D., Murata-Hori M., Lodish H.F. Histones to the cytosol: exportin 7 is essential for normal terminal erythroid nuclear maturation // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2014. – T. 124. – №. 12. – C. 1931-1940.
- 97) Hendricks T., Francis N., Fyodorov D., Deneris E.S. The ETS domain factor Pet-1 is an early and precise marker of central serotonin neurons and interacts with a conserved element in serotonergic genes // *Journal of Neuroscience*. – 1999. – V. 19. – №. 23. – P. 10348-10356.
- 98) Henriquez S., Tapia A., Quezada M., Vargas M., Cardenas H., Rios M., Salvatierra A.M., Croxatto H., Orihuela P., Zegers-Hochschild F., Munroe D.J., Velasquez L. Deficient expression of monoamine oxidase A in the endometrium is associated with implantation failure in women participating as recipients in oocyte donation // *MHR: Basic science of reproductive medicine*. – 2006. – V. 12. – №. 12. – P. 749-754.
- 99) Herr N., Bode C., Duerschmied D. The effects of serotonin in immune cells // *Frontiers in cardiovascular medicine*. – 2017. – V. 4 (48).
- 100) Hilaire G., Voituron N., Menuet C., Ichiyama R.M., Subramanian H.H., Dutschmann M. The role of serotonin in respiratory function and dysfunction // *Respiratory physiology & neurobiology*. – 2010. – V. 174. – №. 1-2. – P. 76-88.

- 101) Hirai S., Kishimoto T., Kadam A.L., Kanatani H., Koide S.S. Induction of spawning and oocyte maturation by 5-hydroxytryptamine in the surf clam // *Journal of Experimental Zoology*. – 1988. – V. 245. – №. 3. – P. 318-321.
- 102) Horvatiček M., Perić M., Bečeheli I., Klasić M., Žutić M., Kesić M., Desoye G., Radoš S.N., Ivanišević M., Hranilovic D., Štefulj J. Maternal metabolic state and fetal sex and genotype modulate methylation of the serotonin receptor type 2A gene (HTR2A) in the human placenta // *Biomedicines*. – 2022. – V. 10. – №. 2. – 467.
- 103) Houghton F. D. Role of gap junctions during early embryo development // *Reproduction*. – 2005. – V. 129. – №. 2. – P. 129-135.
- 104) Huang W.Q., Zhang C.L., Di X.Y., Zhang R.Q. Studies on the localization of 5-hydroxytryptamine and its receptors in human placenta // *Placenta*. – 1998. – V. 19. – №. 8. – P. 655-661.
- 105) Hur C., Nanavaty V., Yao M., Desai N. The presence of partial compaction patterns is associated with lower rates of blastocyst formation, sub-optimal morphokinetic parameters and poorer morphologic grade // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2023. – V. 21. – №. 1. – P. 12.
- 106) Hyman S.E. Neurotransmitters // *Current biology*. – 2005. – V. 15. – №. 5. – C. 154-158.
- 107) Il'ková G., Reháč P., Veselá J., Fabian D., Czikková S., Koppel J. Serotonin localization and its functional significance during mouse preimplantation embryo development // *Zygote*. – 2004. – V. 12. – №. 3. – P. 205-213.
- 108) Ivashkin E., Khabarova M.Y., Melnikova V., Nezhlin L.P., Kharchenko O., Voronezhskaya E.E., Adameyko I. Serotonin mediates maternal effects and directs developmental and behavioral changes in the progeny of snails // *Cell Reports*. – 2015. – V. 12. – №. 7. – P. 1144-1158.
- 109) Ivashkin E., Melnikova V., Kurtova A., Brun N.R., Obukhova A., Khabarova M.Yu., Yakusheff A., Adameyko I., Gribble K.E., Voronezhskaya E.E. Transglutaminase activity determines nuclear localization of serotonin immunoreactivity in the early embryos of invertebrates and vertebrates // *ACS Chemical Neuroscience*. – 2019. – V. 10. – №. 8. – P. 3888-3899.

- 110) Jiang S.H., Li J., Dong F.Y., Yang J.Y., Liu D.J., Yang X.M., Wang Y.H., Yang M.W., Fu X.L., Zhang X.X., Li Q., Pang X.F., Huo Y.M., Li J., Zhang J.F., Lee H.Y., Lee S.J., Qin W.X., Gu J.R., Sun Y.W., Zhang Z.G. Increased serotonin signaling contributes to the Warburg effect in pancreatic tumor cells under metabolic stress and promotes growth of pancreatic tumors in mice // *Gastroenterology*. – 2017. – V. 153. – №. 1. – P. 277-291. e19.
- 111) Johnson P.L., Molosh A.I., L.M., Bernabe C., Haggerty D., Fitz S.D., Nalivaiko E., Truitt W., Shekhar A. Assessment of fear and anxiety associated behaviors, physiology and neural circuits in rats with reduced serotonin transporter (SERT) levels // *Translational Psychiatry*. – 2019. – V. 9. – №. 1. – P. 33-47.
- 112) Jones L.A., Sun E.W., Martin A.M., Keating D.J. The ever-changing roles of serotonin // *The international journal of biochemistry & cell biology*. – 2020. – V. 125. – P. 105776.
- 113) Jonscher R., Belkind-Gerson J. Concise review: cellular and molecular mechanisms of postnatal injury-induced enteric neurogenesis // *Stem Cells*. – 2019. – V. 37. – №. 9. – P. 1136-1143.
- 114) Karki S., Saadaoui M., Dunsing V., Kerridge S., Da Silva E., Philippe J.M., Maurange C., Lecuit T. Serotonin signaling regulates actomyosin contractility during morphogenesis in evolutionarily divergent lineages // *Nature Communications*. – 2023. – V. 14. – №. 1. – P. 5547.
- 115) Karmakar S., Lal G. Role of serotonin receptor signaling in cancer cells and anti-tumor immunity // *Theranostics*. – 2021. – V. 11. – №. 11. – P. 5296-5312.
- 116) Katow H., Suyemitsu T., Ooka S., Yaguchi J., Jin-nai T., Kuwahara I., Katow T., Yaguchi S., Abe H. Development of a dopaminergic system in sea urchin embryos and larvae // *Journal of Experimental Biology*. – 2010. – V. 213. – №. 16. – P. 2808-2819.
- 117) Kayabaşı Y., Güneş B., Erbaş O. Serotonin receptors and depression // *Journal of Experimental and Basic Medical Sciences*. – 2021. – V. 2. – №. 2. – P. 240-246.
- 118) Kelly C.R., Sharif N.A. Pharmacological evidence for a functional serotonin-2B receptor in a human uterine smooth muscle cell line // *The Journal of*

- pharmacology and experimental therapeutics. – 2006. – V. 317. – №. 3. – P. 1254-1261.
- 119) Kendig D.M., Grider J.R. Serotonin and colonic motility // *Neurogastroenterology & Motility*. – 2015. – V. 27. – №. 7. – P. 899-905.
- 120) Kereveur A., Callebert J., Humbert M., Herve P., Simonneau G., Launay J. M., Drouet L. High plasma serotonin levels in primary pulmonary hypertension: effect of long-term epoprostenol (prostacyclin) therapy // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2000. – V. 20. – P. 2233–2239.
- 121) Khozhai L.I., Puchkov V.F., Otellin V.A. The effect of a serotonin deficiency on mammalian embryonic development // *Ontogenez*. – 1995. – V. 26. – № 5. – P. 350-355.
- 122) Kim M.S., Lee W.S., Jeong J., Kim S.J., Jin W. Induction of metastatic potential by TrkB via activation of IL6/JAK2/STAT3 and PI3K/AKT signaling in breast cancer // *Oncotarget*. – 2015. – V. 6. – №. 37. – P. 40158.
- 123) Kinkade J.A., Seetharam A.S., Sachdev S., Bivens N.J., Phinney B.S., Grigorean G., Roberts M.R., Tuteja G., Rosenfeld C.S. Extracellular vesicles from mouse trophoblast cells: Effects on neural progenitor cells and potential participants in the placenta–brain axis // *Biology of Reproduction*. – 2024. – V. 110. – №. 2. – P. 310-328.
- 124) Klauer M.J., Willette B.K.A., Tsvetanova N.G. Functional diversification of cell signaling by GPCR localization // *Journal of Biological Chemistry*. – 2024. – V. 300. – №. 3.
- 125) Kliman H.J., Quaratella S.B., Setaro A.C., Siegman E.C., Subha Z.T., Tal R., Milano K.M., Steck T. L. Pathway of maternal serotonin to the human embryo and fetus // *Endocrinology*. – 2018. – V. 159. – №. 4. – P. 1609-1629.
- 126) Krantic S., Dube F., Quirion R., Guerrier P. Pharmacology of the serotonin-induced meiosis reinitiation in *Spisula solidissima* oocytes // *Developmental Biology*. – 1991. – V. 146. – № 2. – P. 491-449.

- 127) Kusakawa S., Yamauchi J., Miyamoto Y., Sanbe A., Tanoue A. Estimation of embryotoxic effect of fluoxetine using embryonic stem cell differentiation system // Life sciences. – 2008. – V. 83. – №. 25-26. – P. 871-877.
- 128) Leise E.M., Kempf S.C., Durham N.R., Gifondorwa D.J. Induction of metamorphosis in the marine gastropod *Ilyanassa obsoleta*: 5HT, NO and programmed cell death // Acta Biologica Hungarica. – 2004. – V. 55. – P. 293-300.
- 129) Levin M., Buznikov G.A., Lauder J.M. Of Minds and Embryos: Left-Right Asymmetry and the Serotonergic Controls of Pre-Neural Morphogenesis // Developmental neuroscience. – 2006. – V. 28. – №. 3. – P. 171-185.
- 130) Lindsay D., Poulson E., Robson J. M. The effect of 5-hydroxytryptamine and of an amine oxidase inhibitor on experimental deciduomata in mice // Journal of Endocrinology. – 1961. – V. 23. – №. 2. – P. 209-215.
- 131) Lissoni P., Barni S., Tancini G., Ardizzoia A., Ricci G., Aldeghi R., Brivio F., Tisi E., Rovelli F., Rescaldani R., Quadro G., Maestroni G. A randomised study with subcutaneous low-dose interleukin 2 alone vs interleukin 2 plus the pineal neurohormone melatonin in advanced solid neoplasms other than renal cancer and melanoma // British journal of cancer. – 1994. – V. 69. – №. 1. – P. 196-199.
- 132) Lissoni P., Brivio F., Fumagalli L., Messina G., Vigore L., Parolini D., Colciago M., Rovelli F. Neuroimmunomodulation in medical oncology: application of psychoneuroimmunology with subcutaneous low-dose IL-2 and the pineal hormone melatonin in patients with untreatable metastatic solid tumors // Anticancer research. – 2008. – V. 28. – №. 2B. – P. 1377-1381.
- 133) Lister A., Regan C., Van Zwol J., Van Der Kraak G. Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: A mechanistic evaluation // Aquatic toxicology. – 2009. – V. 95 – №. 4. – P. 320–329.
- 134) Liu N., Liu T., Alim N., Zou J., Hu X., Zhang B., Liu F., Ding X., Sun P., Wang S., Zhang L., Zheng R., Liang R. 5-HT promotes pancreatic  $\alpha$ -to- $\beta$  cell transdifferentiation // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. – 2025. – V. 1872. – №. 5. – P. 119958.

- 135) Liu Y., Zhang H., Wang Z., Wu P., Gong W. 5-Hydroxytryptamine<sub>1a</sub> receptors on tumour cells induce immune evasion in lung adenocarcinoma patients with depression via autophagy/pSTAT3 // *European Journal of Cancer*. – 2019. – V. 114. – P. 8-24.
- 136) Liu Y., Zhou N., Zhou L., Wang J., Zhou Y., Zhang T., Fang Y., Deng J., Gao Y., Liang X., Lv J., Wang Z., Xie J., Xue Y., Zhang H., Ma J., Tang K., Fang Y., Cheng F., Zhang C., Dong B., Zhao Y., Yuan P., Gao Q., Zhang H., Qin F.X.F., Huang B. IL-2 regulates tumor-reactive CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion by activating the aryl hydrocarbon receptor // *Nature immunology*. – 2021. – V. 22. – №. 3. – P. 358-369.
- 137) Lodish H., Berk A., Zipursky S.L. *Molecular Cell Biology: Neurotransmitters, Synapses, and Impulse Transmission* (4th ed.). // New York: W. H. Freeman. – 2000. – 1184 p.
- 138) Lübbe A.S., Huhnt W. Microvessel diameters of human colon adenocarcinoma during acute treatment with serotonin // *International Journal of Microcirculation*. – 1994. – V. 14. – №. 4. – P. 218-225.
- 139) Lucki I. The spectrum of behaviors influenced by serotonin // *Biological psychiatry*. – 1998. – V. 44. – №. 3. – P. 151-162.
- 140) Luo X., Li L., Zeng Y., Li Z., Sun M., Zhong Y., Qian Y. Mitochondria-Targeted Quinoline-Based Fluorescent Probes for Imaging of Viscosity and MAO-A with High-Throughput Inhibitor Screening // *Chemical & Biomedical Imaging*. – 2025.
- 141) Lv J., Liu F. The role of serotonin beyond the central nervous system during embryogenesis // *Frontiers in cellular neuroscience*. – 2017. – T. 11. – C. 74.
- 142) Lychkova A.E., De Pasquale V., Avallone L., Puzikov A.M., Pavone L.M.. Serotonin regulates contractile activity of the uterus in non-pregnant rabbits // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. – 2014. – V. 165. – P. 53-59.

- 143) Mansoriyan M., Torabzadeh Khorasani P., Ramezani M. Effect of fluoxetine on ovarian and oviduct tissue in female mature Balb/C mice // Journal of Advances in Medical and Biomedical Research. – 2018. – V. 26. – №. 116. – P. 100-110.
- 144) Markova L.N., Buznikov G.A., Kovačević N., Rakić L., Salimova N.B., Volina E.V. Histochemical study of biogenic monoamines in early (“Prenervous”) and late embryos of sea urchins // International journal of developmental neuroscience. – 1985. – V. 3. – №. 5. – P. 493-495.
- 145) Martin A.M., Young R.L., Leong L., Rogers G.B., Spencer N.J., Jessup C.F., Keating D.J.. The diverse metabolic roles of peripheral serotonin // Endocrinology. – 2017. – V. 158. – №. 5. – P. 1049-1063.
- 146) McCauley D.W. Serotonin Plays an Early Role in the Metamorphosis of the Hydrozoan *Phialidium gregarium* // Developmental biology. – 1997. – V. 190. – №. 2. – P. 229-240.
- 147) Mercado C.P., Byrum S., Beggs M.L., Ziu E., Singh P., Raj V.R., Haun R.S., Kilic F. Impact of elevated plasma serotonin on global gene expression of murine megakaryocytes // PloS one. – 2013. – V. 8. – №. 8. – e72580.
- 148) Minami N., Suzuki T., Tsukamoto S. Zygotic gene activation and maternal factors in mammals // Journal of Reproduction and Development. – 2007. – V. 53. – №. 4. – P. 707-715.
- 149) Mitchell J.A., Hammer R.E., Goldman H. Serotonin-induced disruption of implantation in the rat: II. Suppression of decidualization // Biology of reproduction. – 1983. – V. 29. – №. 1. – P. 151-156.
- 150) Mohammad-Zadeh L.F., Moses L., Gwaltney-Brant S.M. Serotonin: a review // Journal of veterinary pharmacology and therapeutics. – 2008. – V. 31. – №. 3. – P. 187-199.
- 151) Molina-Cerrillo J., Grande E., Alonso-Gordoa T. Inhibition of Serotonin Synthesis May Have Antitumor Activity? Long-Term Efficacy in a Patient with Gastrointestinal Neuroendocrine Tumor // The oncologist. – 2019. – V. 24. – №. 7. – P. e597-e599.

- 152) Mori A., Zhai Y.L., Toki T., Nikaido T., Fujii S. Distribution and heterogeneity of mast cells in the human uterus // *Human reproduction* (Oxford, England). – 1997. – V. 12. – №. 2. – P. 368-372.
- 153) Morrison J.L., Riggs K.W., Rurak D.W. Fluoxetine during pregnancy: impact on fetal development // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2005. – V. 17. – №. 6. – P. 641-650.
- 154) Muller C.L., Anacker A.M., Rogers T.D., Goeden N., Keller E.H., Forsberg C.G., Kerr T.M., Wender C., Anderson G.M., Stanwood G.D., Blakely R.D., Bonnin A., Veenstra-VanderWeele J. Impact of maternal serotonin transporter genotype on placental serotonin, fetal forebrain serotonin, and neurodevelopment // *Neuropsychopharmacology*. – 2017. – V. 42. – №. 2. – P. 427-436.
- 155) Murphy D.L., Lerner A., Rudnick G., Lesch K.-P. Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics // *Molecular interventions*. – 2004. – V. 4. – №. 2. – P. 109-123.
- 156) Nair R.R., Mazza, D., Brambilla F., Gorzanelli A., Agresti A., Bianchi M.E. LPS-challenged macrophages release microvesicles coated with histones // *Frontiers in immunology*. – 2018. – T. 9. – C. 1463.
- 157) Nakamoto A., Nagy L.M. Disruption of spindle orientation and protein localization during asymmetric cleavage by pharmacological inhibition of serotonin signaling // *bioRxiv*. – 2025. – 2025.04.
- 158) Nakamura T., Kitazawa T., Cao J., Iwamoto T., Teraoka H., Kadota K., Taneike T. Excitatory and inhibitory 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors expressed in the isolated porcine uterine muscles // *European journal of pharmacology*. – 2008. – V. 600. – №. 1-3. – P. 123-129.
- 159) Nakamura Y., Ise K., Yamazaki Y., Fujishima F., McNamara K.M., Sasano H. Serotonin receptor 4 (5-hydroxytryptamine receptor Type 4) regulates expression of estrogen receptor beta and cell migration in hormone-naive prostate cancer // *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. – 2017. – V. 60. – №. 1. – P. 33-37.
- 160) Nebigil C.G., Choi D.S., Dierich A., Hickel P., Le Meur M., Messaddeq N., Launay J.M., Maroteaux L. Serotonin 2B receptor is required for heart development

// Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2000. – V. 97. – №. 17. – P. 9508-9513.

161) Nebigil C.G., Etienne N., Messaddeq N., Maroteaux L. Serotonin is a novel survival factor of cardiomyocytes: mitochondria as a target of 5-HT 2B receptor signaling // *Faseb Journal*. – 2003. – V. 17. – №. 10. – P. 1373-1375.

162) Nebigil C.G., Launay J.M., Hickel P., Tournois C., Maroteaux L. 5-hydroxytryptamine 2B receptor regulates cell-cycle progression: cross-talk with tyrosine kinase pathways // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2000. – V. 97. – №. 6. – P. 2591-2596.

163) Nikishin D.A., Alyoshina N.M., Semenova M.L., Shmukler Y.B. Expression dynamics of the serotonergic system components in granulosa cells of the developing ovarian follicle and after luteinization // *Genes & Cells*. – 2017. – V. 12. – №. 4. – P. 33-38.

164) Nikishin D.A., Alyoshina N.M., Semenova M.L., Shmukler Y.B. Analysis of expression and functional activity of aromatic L-amino acid decarboxylase (DDC) and serotonin transporter (SERT) as potential sources of serotonin in mouse ovary // *International journal of molecular sciences*. – 2019. – T. 20. – №. 12. – C. 3070.

165) Nikishin D.A., Khramova Y.V., Alyoshina N.M., Malchenko L.A., Shmukler Y.B. Oocyte-mediated effect of serotonin on the functional status of granulosa cells // *Russian Journal of Developmental Biology*. – 2021. – V. 52. – P. 97-104.

166) Nikishin D.A., Kremnyov S.V., Konduktorova V.V., Shmukler Y.B. Expression of serotonergic system components during early *Xenopus* embryogenesis // *International Journal of Developmental Biology*. – 2012. – V. 56. – P. 385–391.

167) Nikishin D.A., Malchenko L.A., Milošević I., Rakić L., Shmukler Y.B. Effects of Haloperidol and Cyproheptadine on the Cytoskeleton of the Sea Urchin Embryos // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. – 2020. – V. 14. – P. 249-254.

168) Nikishin D.A., Milošević I., Gojković M., Rakić L., Bezuglov V.V., Shmukler Y.B. Expression and functional activity of neurotransmitter system

components in sea urchins' early development // *Zygote*. – 2016. – V. 24. – №. 2. – P. 206-218.

169) Nocito A., Dahm F., Jochum W., Jang J., Georgiev P., Bader M., Graf R., Clavien P. Serotonin regulates macrophage-mediated angiogenesis in a mouse model of colon cancer allografts // *Cancer research*. – 2008. – V. 68. – №. 13. – P. 5152-5158.

170) Okamura H., Yoshida K., Amorim B.R., Haneji T. Histone H1.2 is translocated to mitochondria and associates with Bak in bleomycin-induced apoptotic cells // *Journal of cellular biochemistry*. – 2008. – T. 103. – №. 5. – C. 1488-1496.

171) Ori M., De Lucchini S., Marras G., Nardi I. Unraveling new roles for serotonin receptor 2B in development: key findings from *Xenopus* // *The International journal of developmental biology*. – 2013. – V. 57. – №. 9-10. – P. 707-714.

172) Palén K., Thörneby L., Emanuelsson H. Effects of serotonin and serotonin antagonists on chick embryogenesis // *Wilhelm Roux's archives of developmental biology*. – 1979. – V. 187. – P. 89-103.

173) Palomares A.R., Lendínez-Ramírez A.M., Pérez-Nevot B., Cortés-Rodríguez M., Martínez F., Garrido N., Ruiz-Galdón M., Reyes-Engel A. Genetic polymorphisms of serotonin transporter and receptor 1A could influence success during embryo implantation and maintenance of pregnancy // *Fertility and Sterility*. – 2013. – V. 99. – №. 7. – P. 2009-2016. e2.

174) Parseghian M.H., Luhrs K.A. Beyond the walls of the nucleus: the role of histones in cellular signaling and innate immunity // *Biochemistry and cell biology*. – 2006. – T. 84. – №. 4. – C. 589-595.

175) Parsons S.M. Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage // *The FASEB Journal*. – 2000. – V. 14. – №. 15. – P. 2423-2434.

176) Pavličev M., Wagner G.P., Chavan A.R., Owens K., Maziarz J., Dunn-Fletcher C., Kallapur S.G., Muglia L., Jones H. Single-cell transcriptomics of the human placenta: inferring the cell communication network of the maternal-fetal interface // *Genome research*. – 2017. – V. 27. – №. 3. – P. 349-361.

- 177) Pennati R., Groppelli S., Sotgia C., Candiani S., Pestarino M., De Bernardi F. Serotonin localization in *Phallusia mammillata* larvae and effects of 5-HT antagonists during larval development // Development, growth & differentiation. – 2001. – V. 43. – №. 6. – P. 647-656.
- 178) Perić M., Bečeheli I., Čičin-Šain L., Desoye G., Štefulj J. Serotonin system in the human placenta—the knowns and unknowns // Frontiers in endocrinology. – 2022. – V. 13. – P. 1061317.
- 179) Peroutka S.J. 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes: molecular, biochemical and physiological characterization // Trends in neurosciences. – 1988. – V. 11. – №. 11. – P. 496-500.
- 180) Pfaar H., von Holst A., Vogt Weisenhorn D.M., Brodski C., Guimera J., Wurst W. mPet-1, a mouse ETS-domain transcription factor, is expressed in central serotonergic neurons // Development genes and evolution. – 2002. – V. 212. – №. 1. – P. 43-46.
- 181) Pidathala S., Liao S., Dai Y., Li X., Long C., Chang C.L., Zhang Z., Lee C.H. Mechanisms of neurotransmitter transport and drug inhibition in human VMAT2 // Nature. – 2023. – V. 623. – №. 7989. – P. 1086-1092.
- 182) Pires A., Croll R.P., Hadfield M.G. Catecholamines modulate metamorphosis in the opisthobranch gastropod, *Phestilla sibogae* // The Biological Bulletin. – 2000. – V. 198. – P. 319-331.
- 183) Prasad P., Ogawa S., Parhar I. S. Role of serotonin in fish reproduction // Frontiers in neuroscience. – 2015. – V. 9. – P. 195.
- 184) Pytliak M., Vargová V., Mechírová V., Felsöci M. Serotonin receptors—from molecular biology to clinical applications // Physiological research. – 2011. – V. 60. – №. 1. – P. 15.
- 185) Qiao Y., Ren C., Huang S., Yuan J., Liu X., Fan J., Lin J., Wu S., Chen Q., Bo X., Li X., Huang X., Liu Z., Shu W. High-resolution annotation of the mouse preimplantation embryo transcriptome using long-read sequencing // Nature Communications. – 2020. – V. 11. – №. 1. – P. 2653.

- 186) Qin L., Zhao D., Xu J., Ren X., Terwilliger E.F., Parangi S., Lawler J., Dvorak H.F., Zeng H. The vascular permeabilizing factors histamine and serotonin induce angiogenesis through TR3/Nur77 and subsequently truncate it through thrombospondin-1 // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2013. – V. 121. – №. 11. – P. 2154-2164.
- 187) Ranzil S., Ellery S., Walker D.W., Vaillancourt C., Alfaidy N., Bonnin A., Borg A., Wallace E.M., Ebeling P.R., Erwich J.J., Murthi P. Disrupted placental serotonin synthetic pathway and increased placental serotonin: Potential implications in the pathogenesis of human fetal growth restriction // *Placenta*. – 2019. – V. 84. – P. 74-83.
- 188) Rapport M.M., Green A.A., Page I.H. Serum vasoconstrictor (serotonin): IV. Isolation and characterization // *Journal of Biological Chemistry*. – 1948. – V. 176. – №. 3. – P. 1243-1251.
- 189) Rebsam A., Seif I., Gaspar P. Refinement of thalamocortical arbors and emergence of barrel domains in the primary somatosensory cortex: a study of normal and monoamine oxidase a knock-out mice // *Journal of Neuroscience*. – 2002. – V. 22. – №. 19. – P. 8541-8552.
- 190) Reisoli E., De Lucchini S., Nardi I., Ori M. Serotonin 2B receptor signaling is required for craniofacial morphogenesis and jaw joint formation in *Xenopus* // *Development*. – 2010. – V. 137. – №. 17. – P. 2927-2937.
- 191) Renaud F., Parisi E., Capasso A., De Prisco P. On the role of serotonin and 5-methoxy-tryptamine in the regulation of cell division in sea urchin eggs // *Developmental biology*. – 1983. – V. 98. – №. 1. – P. 37-46.
- 192) Reviriego J., Fernandez-Alfonso M.S., Marin J. Actions of vasoactive drugs on human placental vascular smooth muscle // *General pharmacology*. – 1990. – V. 21. – №. 5. – P. 719-727.
- 193) Riley L.A., Waguespack M.A., Denney R.M. Characterization and quantitation of monoamine oxidases A and B in mitochondria from human placenta // *Molecular pharmacology*. – 1989. – V. 36. – №. 1. – P. 54-60.

- 194) Romero-Reyes J., Cárdenas M., Damián-Matsumura P., Domínguez R., Ayala M. E. Inhibition of serotonin reuptake in the prepubertal rat ovary by fluoxetine and effects on ovarian functions // *Reproductive Toxicology*. – 2016. – V. 59. – P. 80-88.
- 195) Romero-Reyes J., Molina-Hernández A., Díaz N. F., Camacho-Arroyo I. Role of serotonin in vertebrate embryo development // *Reproductive biology*. – 2021. – V. 21. – №. 1. – P. 100475.
- 196) Rossi D.J., Hamann M. Spillover-mediated transmission at inhibitory synapses promoted by high affinity  $\alpha 6$  subunit GABAA receptors and glomerular geometry // *Neuron*. – 1998. № 20(4). – P. 783–795.
- 197) Rudnick G., Clark J. From synapse to vesicle: the reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters // *Biochimica et biophysica acta*. – 1993. – V. 1144. – № 3. – P. 249-263.
- 198) Rudolph M.I., Bardisa L., Cruz M. A., Reinicke K. Mast cells mediators evoke contractility and potentiate each other in mouse uterine horns // *General Pharmacology: The Vascular System*. – 1992. – V. 23. – №. 5. – P. 833-836.
- 199) Rydelek-Fitzgerald L., Wilcox B.D., Teitler M., Jeffrey J.J. Serotonin-dependent collagenase induction in rat myometrial smooth muscle cells: mediation by the 5-HT<sub>2</sub> receptor // *Molecular and cellular endocrinology*. – 1993. – V. 91. – №. 1-2. – P. 67-74.
- 200) Russell S. M., Mayer R. J. Degradation of transplanted rat liver mitochondrial-outer-membrane proteins in hepatoma cells // *Biochemical Journal*. – 1983. – T. 216. – №. 1. – C. 163-175.
- 201) Sakita J.Y., Bader M., Santos E.S., Garcia S.B., Minto S.B., Alenina N., Brunaldi M.O., Carvalho M.C., Vidotto T., Gasparotto B., Martins R.B., Silva Jr W.A., Brandão M.L., Leite C.A., Cunha F.Q., Karsenty G., Squire J.A., Uyemura S.A., Kannen V. Serotonin synthesis protects the mouse colonic crypt from DNA damage and colorectal tumorigenesis // *The Journal of pathology*. – 2019. – V. 249. – №. 1. – P. 102-113.

- 202) Salvan P., Fonseca M., Winkler A.M., Beauchamp A., Lerch J.P., Johansen-Berg H. Serotonin regulation of behavior via large-scale neuromodulation of serotonin receptor networks // *Nature neuroscience*. – 2023. – V. 26. – №. 1. – P. 53-63.
- 203) Santin Y., Fazal L., Sainte-Marie Y., Sicard P., Maggiorani D., Tortosa F., Yücel Y.Y., Teysseudre L., Rouquette J., Marcellin M., Vindis C., Shih J.C., Lairez O., Burlet-Schiltz O., Parini A., Lezoualc'h F., Mialet-Perez J. Mitochondrial 4-HNE derived from MAO-A promotes mitoCa<sup>2+</sup> overload in chronic postischemic cardiac remodeling // *Cell Death & Differentiation*. – 2020. – V. 27. – №. 6. – P. 1907-1923.
- 204) Sardar D., Cheng Y.T., Woo J., Choi D.J., Lee Z. F., Kwon W., Chen H.-C., Lozzi B., Cervantes A., Rajendran K., Huang T.-W., Jain A., Arenkiel B.R., Maze I., Deneen B. Induction of astrocytic Slc22a3 regulates sensory processing through histone serotonylation // *Science*. – 2023. – V. 380. – №. 6650. – P. eade0027.
- 205) Schiera G., Di Liegro C.M., Saladino P., Pitti R., Savettieri G., Proia P., Di Liegro I. Oligodendroglioma cells synthesize the differentiation-specific linker histone H1 and release it into the extracellular environment through shed vesicles // *International journal of oncology*. – 2013. – T. 43. – №. 6. – C. 1771-1776.
- 206) Schmid T., Snoek L.B., Fröhli E., van der Bent M.L., Kammenga J., Hajnal A. Systemic regulation of RAS/MAPK signaling by the serotonin metabolite 5-HIAA // *PLoS genetics*. – 2015. – V. 11. – №. 5. – P. e1005236.
- 207) Semerci Sevimli T., Demir Cevizlidere B., Ghorbani A., Gakhiyeva F., Sevimli M. Investigation of the Effect of Serotonin on Proliferation of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells via Wnt-β Signaling Pathway // *Aksaray University Journal of Medical Sciences*. – 2023. – V. 4. – № 2. – P. 1-5.
- 208) Shader R.I. Monoamine oxidase interactions // *Journal of Clinical Psychopharmacology*. – 2023. – V. 43. – №. 4. – P. 393.
- 209) Shahbazi M.N., Jedrusik A., Vuoristo S., Recher G., Hupalowska A., Bolton V., Fogarty N.M.E., Campbell A., Devito L.G., Ilic D., Khalaf Y., Niakan K.K.,

- Fishel S. Zernicka-Goetz M. Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues // *Nature cell biology*. – 2016. – V. 18. – №. 6. – P. 700-708.
- 210) Shajib M.S., Khan W.I. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation // *Acta physiologica*. – 2015. – V. 213. – №. 3. – P. 561-574.
- 211) Sheng Y., Wang L., Liu X.S.J., Montplaisir V., Tiberi M., Baltz J.M., Liu X.S.J. 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 // *Journal of Cellular Physiology*. – 2005. – V. 202. – №. 3. – P. 777–786.
- 212) Shih J. C., Chen K., Ridd M. J. Monoamine oxidase: from genes to behavior // *Annual review of neuroscience*. – 1999. – V. 22. – №. 1. – P. 197-217.
- 213) Shimizu Y., Minatoguchi S., Hashimoto K., Uno Y., Arai M., Wang N., Chen X., Lu C., Takemura G., Shimomura M., Fujiwara T., Fujiwara H. The role of serotonin in ischemic cellular damage and the infarct size-reducing effect of sarpogrelate, a 5-hydroxytryptamine-2 receptor blocker, in rabbit hearts // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2002. – V. 40. – №. 7. – P. 1347-1355.
- 214) Shin M., Wang Y., Borgus J.R., Jill Venton B. Electrochemistry at the Synapse // *Annual Review of Analytical Chemistry*. – 2019. – T. 12. – P. 297-321.
- 215) Shmukler Y. B., Buznikov G. A., Whitaker M. J. Action of serotonin antagonists on cytoplasmic calcium levels in early embryos of sea urchin *Lytechinus pictus* // *International Journal of Developmental Biology*. – 1999. – V. 43. – P. 179-182.
- 216) Shmukler Y., Nikishin D. Transmitters in Blastomere Interactions // *Cell Interactions* (ed. S. Gowder). – 2012. – Ch. 2. – P. 31-65.
- 217) Shmukler Y.B. A “Micromere Model” of Cell–Cell Interactions in Sea Urchin Early Embryos // *Biophysics*. – 2010. – V. 55. – № 3. – P. 399 – 406.
- 218) Shmukler Y.B. Possibility of membrane reception of neurotransmitter in sea urchin early embryos // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*:

Pharmacology, Toxicology and Endocrinology. – 1993. – V. 106. – №. 1. – P. 269-273.

219) Shmukler Y.B., Alyoshina N.M., Malchenko L.A., Nikishin D.A. The Serotonin System in Mammalian Oogenesis // Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2022. – V. 52. – №. 1. – P. 52-61.

220) Shmukler Y.B., Nikishin D.A. Non-neuronal transmitter systems in bacteria, non-nervous eukaryotes, and invertebrate embryos // Biomolecules. – 2022. – V. 12. – №. 2. – P. 271.

221) 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.

222) Shmukler Y.B., Tosti E. Serotonergic-induced ion currents in cleaving sea urchin embryos // Invertebrate reproduction & development. – 2002. – V. 42. – №. 1. – P. 43-49.

223) Shuey D.L., Sadler T.W., Tamir H., Lauder J.M. Serotonin and morphogenesis // Anatomy and embryology. – 1993. – V. 187. – №. 1. – P. 75-85.

224) Sinenko S.A., Kuzmin A.A., Skvortsova E.V., Ponomartsev S.V., Efimova E.V., Bader M., Alenina N., Tomilin A.N. Tryptophan hydroxylase-2-mediated serotonin biosynthesis suppresses cell reprogramming into pluripotent state // International journal of molecular sciences. – 2023. – V. 24. – №. 5. – P. 4862.

225) Singh S., Johnson P.I., Javed A., Gray T.S., Lonchyna V.A., Wurster R.D. Monoamine- and histamine-synthesizing enzymes and neurotransmitters within neurons of adult human cardiac ganglia // Circulation. – 1999. – V. 99. – № 3. – P. 411–419.

226) Sourbron J., Lagae L. Serotonin receptors in epilepsy: Novel treatment targets? // Epilepsia Open. – 2022. – V. 7. – №. 2. – P. 231-246.

227) Sozen B., Can A., Demir N. Cell fate regulation during preimplantation development: a view of adhesion-linked molecular interactions // Developmental biology. – 2014. – T. 395. – №. 1. – C. 73-83.

- 228) Sparber S.B., Rizzo A., Berra B. Excessive stimulation of serotonin<sub>2</sub> (5-HT<sub>2</sub>) receptors during late development of chicken embryos causes decreased embryonic motility, interferes with hatching, and induces herniated umbilici // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. – 1996. – V. 53. – №. 3. – P. 603-611.
- 229) Stępińska U., Kuwana T., Olszańska B. Serotonin receptors are selectively expressed in the avian germ cells and early embryos // *Zygote*. – 2015. – V. 23. – №. 3. – P. 394-405.
- 230) 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.
- 231) Südhof T.C. The presynaptic active zone // *Neuron*. – 2012. – № 75(1). – P. 11–25.
- 232) Svoboda P. Mammalian zygotic genome activation // *Seminars in cell & developmental biology*. – 2018. – V. 84. – P. 118-126.
- 233) Takeda N. The metabolism of biogenic monoamines during embryogenesis and metamorphosis in two anuran species // *General and comparative endocrinology*. – 1997. – V. 106. – №. 3. – P. 361-373.
- 234) Tanabe T., Osada M., Kyozuka K., Inaba K., Kijima A. A novel oocyte maturation arresting factor in the central nervous system of scallops inhibits serotonin-induced oocyte maturation and spawning of bivalve mollusks // *General and comparative endocrinology*. – V. 147. – № 3. – P. 352-361.
- 235) Terranova P.F., Uilenbroek J.T.J., Saville L., Horst D., Nakamura Y. Serotonin enhances oestradiol production by hamster preovulatory follicles in vitro: effects of experimentally induced atresia // *Journal of endocrinology*. – 1990. – V. 125. – №. 3. – P. 433-438.
- 236) Thibeault A.A.H., Laurent L., Duy S.V., Sauvé S., Caron P., Guillemette C., Sanderson J.T., Vaillancourt C. Fluoxetine and its active metabolite norfluoxetine disrupt estrogen synthesis in a co-culture model of the fetoplacental unit // *Molecular and cellular endocrinology*. – 2017. – V. 442. – P. 32-39.

- 237) Tinikul Y., Mercier A.J., Soonklang N., Sobhon P. 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* // *General and Comparative Endocrinology*. – 2008. – V. 158. – №. 3. – P. 250-258.
- 238) Tkachenko M.D., Alyoshina N.M., Nikishina Y.O., Frolova V.S., Nikishin D.A. Impact of Chronic Fluoxetine Exposure on Oocyte Development and Reproductive Outcomes in a Mouse Model // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2025. – V. 26. – №. 10. – P. 4858.
- 239) Tomy S., Saikrithi P., James N., Balasubramanian C.P., Panigrahi A., Otta S.K., Subramoniam T., Ponniah A.G. Serotonin induced changes in the expression of ovarian gene network in the Indian white shrimp, *Penaeus indicus* // *Aquaculture*. – 2016. – V. 452. – P. 239-246.
- 240) Torres G., Gainetdinov R. & Caron M. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2003. – V. 4. P. 13–25.
- 241) Trueta C., Méndez B., De-Miguel F.F. Somatic exocytosis of serotonin mediated by L-type calcium channels in cultured leech neurons // *The Journal of physiology*. – 2003. № 547(2). – P. 405–416.
- 242) Tsugeno Y., Ito A. A key amino acid responsible for substrate selectivity of monoamine oxidase A and B // *The Journal of biological chemistry*. – 1997. – V. 272. – № 22. – P. 14033-14036.
- 243) Tuteja G., Chung T., Bejerano G. Changes in the enhancer landscape during early placental development uncover a trophoblast invasion gene-enhancer network // *Placenta*. – 2016. – V. 37. – P. 45-55.
- 244) Tutton P.J.M., Barkla D.H. Neural control of colonic cell proliferation // *Cancer*. – 1980. – V. 45. – №. S5. – P. 1172-1177.
- 245) Tutton P.J.M., Barkla D.H. The influence of serotonin on the mitotic rate in the colonic crypt epithelium and in colonic adenocarcinoma in rats // *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. – 1978. – V. 5. – №. 1. – P. 91-94.

- 246) Ugun-Klusek A., Tamang A., Loughna P., Billett E., Buckley G., Sivasubramaniam S. Reduced placental vascular reactivity to 5-hydroxytryptamine in pre-eclampsia and the status of 5HT<sub>2A</sub> receptors // *Vascular Pharmacology*. – 2011. – V. 55. – №. 5-6. – P. 157-162.
- 247) Vacquier V.D., Mazia D. Twinning of sand dollar embryos by means of dithiothreitol. The structural basis of blastomere interactions // *Experimental cell research*. – 1968. – V. 52. – № 2. – P. 209-219.
- 248) van Doorninck J.H., van der Wees J., Karis A., Goedknecht E., Engel J.D., Coesmans M., Rutteman M., Grosveld F., De Zeeuw C.I. GATA-3 is involved in the development of serotonergic neurons in the caudal raphe nuclei // *The Journal of Neuroscience*. – 1999. – V. 19. – №. 12. – P. RC12.
- 249) Vesela J., Rehak P., Mihalik J., Czikkova S., Pokorny J., Koppel J. Expression of serotonin receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos // *Physiological Research*. – 2003. – V. 52. – P. 223-228.
- 250) Veselovska L., Smallwood S.A., Saadeh H., Stewart K.R., Krueger F., Maupetit-Méhouas S., Arnaud P., Tomizawa S.-I., Andrews S., Kelsey G. Deep sequencing and de novo assembly of the mouse oocyte transcriptome define the contribution of transcription to the DNA methylation landscape // *Genome biology*. – 2015. – V. 16. – №. 1. – P. 209.
- 251) Viau M., Lafond J., Vaillancourt C. Expression of placental serotonin transporter and 5-HT<sub>2A</sub> receptor in normal and gestational diabetes mellitus pregnancies // *Reproductive biomedicine online*. – 2009. – V. 19. – №. 2. – P. 207-215.
- 252) Vorbrodt A., Konwinski M., Solter D., Koprowski H. Ultrastructural cytochemistry of membrane-bound phosphatases in preimplantation mouse embryos // *Developmental Biology*. – 1977. – V. 55. – №. 1. – P. 117-134.
- 253) Voronezhskaya E.E. Maternal serotonin: shaping developmental patterns and behavioral strategy on progeny in molluscs // *Frontiers in Ecology and Evolution*. – 2021. – V. 9. – 739787.

- 254) Voronezhskaya E.E., Khabarova M.Y., Nezlin L.P., Ivashkin E.G. Delayed action of serotonin in molluscan development // *Acta Biologica Hungarica*. – 2012. – V. 63. – P. 210-216.
- 255) Wallace J.A. Monoamines in the early chick embryo: Demonstration of serotonin synthesis and the regional distribution of serotonin-concentrating cells during morphogenesis // *American Journal of Anatomy*. – 1982. – V. 165. – №. 3. – P. 261-276.
- 256) Walther D.J., Bader M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform // *Biochemical pharmacology*. – 2003. – V. 66. – № 9. – P. 1673-1680.
- 257) Walther D.J., Peter J.U., Bashammakh S., Hörtnagl H., Voits M., Fink H., Bader M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform // *Science*. – 2003. – V. 299. – № 5603. – P. 76.
- 258) Wang A., Han Y., Li Y., Zhang Y., Mao Y., Yun C., Yang R., Zhang B., Wang Y., Jiang D., Zhang X., Tang B. The effects of serotonin (5-hydroxytryptamine) on histone acetylation in early porcine embryos // *Animals and Zoonoses*. – 2025.
- 259) Wang C.C., Borchert A., Ugun-Klusek A., Tang L.Y., Lui W.T., Chu C.Y., Billett E., Kuhn H., Ufer C. Monoamine oxidase a expression is vital for embryonic brain development by modulating developmental apoptosis // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – V. 286. – №. 32. – P. 28322-28330.
- 260) Wang Q., He M. Molecular characterization and analysis of a putative 5-HT receptor involved in reproduction process of the pearl oyster *Pinctada fucata* // *General and Comparative Endocrinology*. – 2014. – V. 204. – P. 71-79.
- 261) Wang Y., Zhang P., Chao Y., Zhu Z., Yang C., Zhou Z., Li Y., Long Y., Liu Y., Li D., Wang S., Qu Q. Transport and inhibition mechanism for VMAT2-mediated synaptic vesicle loading of monoamines // *Cell research*. – 2024. – V. 34. – №. 1. – P. 47-57.
- 262) Watson A.J., Barcroft L.C. Regulation of blastocyst formation // *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. – 2001. – V. 6. – P. 708.
- 263) Wells B.K. Teratogenic Effects of Cannabinoid and Serotonin Receptor Disruption on Neural Crest Development. – 2022.

- 264) Wu H.H., Choi S., Levitt P. Differential patterning of genes involved in serotonin metabolism and transport in extra-embryonic tissues of the mouse // *Placenta*. – 2016. – V. 42. – P. 74-83.
- 265) Xia Y., Wang D., Zhang N., Wang Z., Pang L. Plasma serotonin level is a predictor for recurrence and poor prognosis in colorectal cancer patients // *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. – 2018. – V. 32. – №. 2. – e22263.
- 266) Xing L., Huttner W.B. Neurotransmitters as Modulators of Neural Progenitor Cell Proliferation During Mammalian Neocortex Development // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2020. – V. 8 – P. 391.
- 267) Yamamoto K., Vernier P. The evolution of dopamine systems in chordates // *Frontiers in neuroanatomy*. – 2011. – V. 5. – P. 21.
- 268) Yan W., Wilson C.C., Haring J.H. 5-HT<sub>1a</sub> receptors mediate the neurotrophic effect of serotonin on developing dentate granule cells // *Developmental Brain Research*. – 1997. – V. 98. – №. 2. – P. 185-190.
- 269) Yang X., Noor a Z., Guo S., Zhao Z., Cai B., Huang G., Ma H., Qin Y., Yu Z., Li G., Zhang Y. Analysis of molecular identity and function of putative serotonin receptors in the Giant clam (*Tridacna crocea*) and the potential role of 5-HT<sub>1D</sub>-like receptor in reproduction // *Aquaculture*. – 2024. – V. 593. – 741247.
- 270) Yavarone M.S., Shuey D.L., Sadler T.W., Lauder J.M. Serotonin uptake in the ectoplacental cone and placenta of the mouse // *Placenta*. – 1993. – V. 14. – №. 2. – P. 149-161.
- 271) Ye D., Xu H., Tang Q., Xia H., Zhang C., Bi F. The role of 5-HT metabolism in cancer // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. – 2021. – V. 1876. – №. 2. – P. 188618.
- 272) Yu J., Wang Z., Chen Y., Dong Y. Restraint Stress Disrupted Intestinal Homeostasis via 5-HT/HTR7/Wnt/ $\beta$ -Catenin/NF- $\kappa$ B Signaling // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2025. – V. 26. – №. 9. – P. 4021.
- 273) Yu Z., Huang P., Wang L., Meng F., Shi Q., Huang X., Qiu L., Wang H., Kong S., Wu J. Monoamine oxidases activity maintains endometrial monoamine

- homeostasis and participates in embryo implantation and development // *BMC biology*. – 2024. – V. 22. – №. 1. – P. 166.
- 274) Zamani A., Qu Z. Serotonin activates angiogenic phosphorylation signaling in human endothelial cells // *FEBS letters*. – 2012. – V. 586. – №. 16. – P. 2360-2365.
- 275) Zha W., Hu T., Hebert M.F., Wang J. Effect of pregnancy on paroxetine-induced adiposity and glucose intolerance in mice // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2019. – V. 371. – №. 1. – P. 113-120.
- 276) Zhang D., Lei C., Zhang W. Up-regulated monoamine oxidase in the mouse uterus during the peri-implantation period // *Archives of gynecology and obstetrics*. – 2011. – V. 284. – №. 4. – P. 861-866.
- 277) Zhang Y., Han Y., Yang R., Zhang B.Y., Zhao Y.S., Wang Y.Q., Jiang D.Z., Wang A.T., Zhang X.M., Tang B. Effect of Serotonin (5-Hydroxytryptamine) on Follicular Development in Porcine // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – V. 25. – №. 17. – 9596.
- 278) Zhao H., Chen S., Hu K., Zhang Z., Yan X., Hao G., Du W., Zheng H. 5-HTP decreases goat mammary epithelial cells apoptosis through MAPK/ERK/Bcl-3 pathway // *Gene*. – 2021. – V. 769. – P. 145240.
- 279) Zill P., Büttner A., Eisenmenger W., Müller J., Moller H.J., Bondy B. Predominant expression of tryptophan hydroxylase 1 mRNA in the pituitary: a postmortem study in human brain // *Neuroscience*. – 2009. – V. 159. – P. 1274–1282.
- 280) Zlatanova J.S., Srebrevna L.N., Banchev T.B., Tasheva B.T., Tsanev R. G. Cytoplasmic pool of histone H1 in mammalian cells // *Journal of Cell Science*. – 1990. – T. 96. – №. 3. – C. 461-468.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает особую благодарность своему научному руководителю – к.б.н. Д.А. Никишину за неоценимую помощь и поддержку, оказанные при подготовке данного исследования.

Автор благодарит всех коллег из группы эмбриофизиологии лаборатории проблем регенерации Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН за содействие в проведении экспериментов, многократное обсуждение результатов и ценные правки по улучшению работы.

Автор выражает благодарность:

- Коллективу кафедры эмбриологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова за предоставленную возможность обучаться и реализовывать свой научный потенциал;
- Центру коллективного пользования ИБР РАН за помощь в исследованиях методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии;
- Оппонентам – за ценные комментарии и объективную критику;
- Своим коллегам – А.И. Богомолу, Е.А. Сазоновой и А.Д. Хан за ценные советы, реактивы и поддержку в особо критичные моменты.
- Своим многочисленным друзьям за моральную поддержку на всех этапах этой работы.

Особую благодарность автор выражает своей семье и супругу за возможность работать на научном поприще и поддержку на каждом пройденном этапе. Эту работу автор посвящает вам.