

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН
(ИБР РАН)

УДК 577.353

Рег. № ГЗ 0088-2021-0020

Рег. № НИОКТР АААА-А21-121011490123-3

УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБР РАН
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН



А.В. Васильев

« 28 » декабря 2021 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

НЕЙРОГУМОРАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ И АКТИВАЦИИ
АДАПТИВНЫХ РЕСУРСОВ ОРГАНИЗМА

(промежуточный)

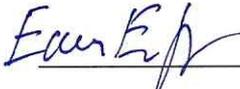
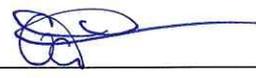
Руководитель НИР,
заведующий лабораторией,
доктор биологических наук

Е.Е. Воронежская

28.12.2021
подпись, дата

Москва 2021

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, заведующий лабораторией, доктор биологических наук	 _____	Е.Е. Воронежская 28.12.2021
	подпись, дата	
Исполнители: Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук	 _____	Л.П. Незлин 28.12.2021
	подпись, дата	
Младший научный сотрудник	 _____	А.Л. Обухова 28.12.2021
	подпись, дата	
Младший научный сотрудник	 _____	А.М. Соколова 28.12.2021
	подпись, дата	
Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук	 _____	В.И. Мельникова 28.12.2021
	подпись, дата	
Научный сотрудник, кандидат биологических наук	 _____	С.Н. Воронова 28.12.2021
	подпись, дата	
Научный сотрудник, кандидат биологических наук	 _____	А.И. Куртова 28.12.2021
	подпись, дата	
Нормоконтроль, руководитель информационно-аналитического отдела, кандидат биологических наук	 _____	Е.Б. Абрамова 28.12.2021
	подпись, дата	

РЕФЕРАТ

Отчет 39 с., 12 рисунков, 40 источников, 8 отчетных публикаций.

МОЛЛЮСКИ, ГУБКИ, АРХИАННЕЛИДЫ, МОРСКИЕ ЕЖИ, БЛАСТОЦИСТЫ МЫШИ, ЭМБРИОИДНЫЕ ТЕЛА, ЗАРОДЫШЕВОЕ РАЗВИТИЕ, ПОДВИЖНЫЕ РЕСНИЧКИ, СЕРОТОНИН, ДОФАМИН, РЕЦЕПТОРЫ СЕРОТОНИНА, НЕНЕЙРОНАЛЬНЫЕ МОНОАМИН-СОДЕРЖАЩИЕ СТРУКТУРЫ

Целью исследования является детализация механизмов действия моноаминов, обеспечивающих долговременные эффекты, проявляющиеся в процессе развития и лежащие в основе нейрогуморальной регуляции и активации адаптивных ресурсов организма. Исследовались эффекты моноаминов, осуществляющиеся как через активацию мембранных рецепторов, так и через накопление моноаминов во внутриклеточных нервных структурах.

В качестве модельных объектов использовались зародыши пресноводных моллюсков, личинки губок и морских ежей, эмбрионидные тела и ранние эмбрионы (бластоцисты) мыши, жгутиковые клетки взрослых губок (хоаноциты), подвижные реснички архианнелиды динофилюса.

В работе использовали современные методы экспериментальной эмбриологии, фармакологические воздействия; морфологический анализ целых эмбрионов и их структур, а также эмбрионидных тел; иммунохимическое маркирование и конфокальную микроскопию; анализ внутриклеточных структур с помощью электронной микроскопии.

Показано, что изменение уровня серотонина в материнском организме отражает сезонные изменения, а также физиологическое состояние матери. В зависимости от этих условий яйцеклетка, оплодотворенная зигота и ранний эмбрион экспонируются к различному уровню серотонина. Активация мембранных рецепторов серотонина и образование серотонилированных белков внутри бластомеров приводит к долговременным отложенным изменениям в темпах развития эмбрионов и поведении ювенильных особей. Комбинация различных механизмов действия серотонина при последовательном прохождении стадий эмбрионального (зародышевого) развития позволяет зародышу тонко адаптироваться к внешним условиям, с которыми он встречается после рождения или вылупления. У личинок и ювенильных губок моноамины (дофамин и серотонин) сосредоточены в основании подвижных ресничек, ассоциированы с аппаратом Гольджи, и, по всей видимости, обеспечивает регуляцию локомоторной и пищевой активности. У архианнелиды динофилюса за пищедобывательную активность отвечает комплекс локомоторных тяжей прототроха. Эксперименты на личинках морских ежей подтвердили важность наличия 4-метоксифенильного фрагмента в молекуле

диарилпирролдкарбоксамидов для проявления антимитотического действия. Предполагается, что клеточной мишенью этого вещества может служить компонент сигнального пути Nodal. Показано, что используемая в экспериментах методика повышения уровня серотонина внутри клеток за счет инкубации в предшественнике серотонина – 5-НТР – не является токсичной в физиологическом диапазоне концентраций для эмбрионов позвоночных.

Полученные данные раскрывают клеточные и молекулярные механизмы участия моноаминов: серотонина и дофамина – в тонкой адаптационной регуляции процессов развития и активности подвижных ресничек, важных для локомоции и захвата пищи, у личинок и ювенильных особей представителей животных разных филогенетических групп.

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	7
РАЗДЕЛ 1 МОНОАМИН-ОПОСРЕДОВАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ДРОБЛЕНИЯ И ОНТОГЕНЕЗА РЕСНИЧНЫХ СТРУКТУР У МОДЕЛЬНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ.....	7
1.1 Введение	7
1.2 Материалы и методы	9
1.3 Результаты и обсуждение.....	13
1.4 Список использованных источников	23
РАЗДЕЛ 2 НЕЙРОГУМОРАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТИВНОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ В ОНТОГЕНЕЗЕ МОДЕЛЬНЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ.....	25
2.1 Введение.....	25
2.2 Материалы и методы	26
2.3 Результаты и обсуждение.....	28
2.4 Список использованных источников	34
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	36
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ	38

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяются следующие сокращения и обозначения

ДА – дофамин

ДМСО - диметилсульфоксид

5-НТ – серотонин

5-НТР – непосредственный биохимический предшественник синтеза серотонина

LCSM – лазерный сканирующий конфокальный микроскоп

L-DOPA – непосредственный биохимический предшественник синтеза дофамина

Ноеchst – ядерный краситель Хёкст

DAPI – ядерный краситель ДАПИ

PI – пропидий йодид

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

РАЗДЕЛ 1 МОНОАМИН-ОПОСРЕДОВАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ДРОБЛЕНИЯ И ОНТОГЕНЕЗА РЕСНИЧНЫХ СТРУКТУР У МОДЕЛЬНЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

1.1 Введение

Серотонин (5-гидрокситриптамин, 5-НТ) - это биогенный амин, который можно найти в большинстве живых организмов. Это хорошо известный нейротрансмиттер и нейромодулятор в нервной системе позвоночных и беспозвоночных животных, влияющий на такие важные аспекты жизни, как обучение и память, агрессия, сон, реакция возбуждения, потребление пищи и многие другие [1]. Он также обнаружен в периферических тканях и органах, где он служит нейрогормоном, регулирующим кровяное давление и тромбоцит-зависимое свертывание, метаболизм глюкозы и регуляцию веса у млекопитающих [2, 3]. Серотонинергическая система включает ферменты синтеза и деградации 5-НТ, рецепторы и связанные G-белки, мембранные и везикулярные транспортеры. Несмотря на значительные различия, существующие между позвоночными и беспозвоночными животными, а также между различными таксонами и видами [1, 4], можно отметить общие организационные принципы для серотонинергической системы. Во-первых, нейроны, содержащие 5-НТ, составляют довольно небольшую часть всего комплекса нейронных элементов. Однако эти элементы дают широко разветвленную сеть отростков, контактирующих с многочисленными клеточными мишенями. Во-вторых, рецепторы и транспортеры серотонина присутствуют в клеточной мембране почти всех тканей и органов и реагируют на окружающий серотонин как на гормон даже вдали от участков высвобождения 5-НТ. В-третьих, все компоненты серотонинергических систем, по-видимому, очень пластичны как по своей анатомической структуре, так и по активности различных молекулярных компонентов серотонинергической системы, которые могут изменяться в разные периоды жизни или в различных условиях окружающей среды. Такие особенности серотонинергической системы позволили предположить, что 5-НТ действует больше как базовый модулятор или интегрирующая молекула [5, 6] на уровне всего организма, чем просто как локальный медиатор, передающий сигнал между нервными/гормональными клетками и их мишенями. Более того, серотонин был обнаружен на самых ранних стадиях развития животных: в ооцитах, зиготах и делящихся бластомерах [7, 8, 9]. Позже в развитии серотонин влияет на эмбриональные события, связанные с нейрогенезом и созреванием гормональных систем [10, 11, 12, 13]. Серотонин эволюционно появляется до образования

первых нейронов и является компонентом древних и архетипических сигнальных систем [14, 15]. Таким образом, серотонин является перспективной кандидатной молекулой, позволяющей связать сигналы из внешней среды, физиологическое состояние материнского организма и формирование определенных паттернов развития и поведения потомства, которые определяют жизненную стратегию поколения в целом.

В своей работе мы объединили экспериментальные данные, полученные на зародышах модельных пресноводных моллюсков: *Lymnaea stagnalis* и *Helisoma trivolvis* (Mollusca; Gastropoda). Кроме этого, мы проанализировали наличие моноаминергической системы у самых древних многоклеточных – губок – у которых не только нет нервных клеток, но в геноме известных видов не обнаруживаются рецепторы к моноаминам [16]. Мы также исследовали действие синтетических химических агентов на митотическую активность на ранних стадиях развития личинок морского ежа, детально описали формирование ресничных структур в онтогенезе архианнелиды *Dimorphilus gyrociliatus*, которые эта интерстициальная полихета использует для питания.

1.2 Материалы и методы

При выполнении запланированных работ использовалась комбинация классических эмбриологических методов в сочетании с современными методами экспериментальной биологии развития, высокочувствительных методов специфического иммунохимического маркирования, совмещенных с конфокальной микроскопией, электронно-микроскопических методов.

Объекты исследования. Личинок морских ежей получали индуцированным оплодотворением половозрелых морских ежей *Paracentrotus lividus* L. Животных содержали в аквариумах с аэрируемой морской водой, нерест стимулировали инъекцией в полость тела животных 1–2 мл 0.5 М KCl. Полученные яйцеклетки отмывали профильтрованной через нейлоновый фильтр морской водой и оплодотворяли добавлением нескольких капель разбавленной спермы. Зародышей (400–2000/мл) инкубировали в профильтрованной морской воде при комнатной температуре (18–23°C) до стадии перехода к активному питанию (36–40 ч, средний плутеус 2). В течение всего периода инкубации суспензию зародышей перемешивали с помощью лопасти из оргстекла со скоростью вращения 60 об/мин, приводимой в движение электромотором.

Личинок пресноводной губки *Eunapius fragilis* (Leidy, 1851) собирали в Московском канале с 15 июня 2018 г. по 15 июля 2021 г. Наличие личинок в губках определяли визуально, затем части губок отделяли от субстрата и помещали их в емкость с пресной водой. Через несколько часов личинки покидали ткани тела матери. Личинок собирали из воды с помощью стеклянной пипетки Пастера.

Зародышей большого прудовика *Lymnaea stagnalis* L и катушки *Helisoma trivolvis* получали при сборе кладок из культуральной лабораторной культуры моллюсков. Культура половозрелых животных поддерживается в проточной системе аквариумов на базе ИБР РАН. Животных регулярно кормили листьями салата, световой режим 16:8, температура постоянная $+22\pm 1^\circ\text{C}$.

Культура *Dimorphilus gyrociliatus* поддерживается на базе ИБР РАН. Животные содержатся в небольших пластиковых резервуарах с искусственной морской водой (33 ‰ солености) при температуре $+22\pm 1^\circ\text{C}$ без аэрации, с регулярным кормлением гомогенизированными замороженными листьями крапивы (*Urtica* sp.) и регулярной сменой воды. Кокон *Dimorphilus gyrociliatus* содержат 1–9 крупных зародышей (самки) и 1–3 маленьких зародышей (карликовые самцы). Карликовые самцы умирают вскоре после вылупления, а также лишены как непрерывных цилиарных полос, так и пищеварительной системы. Таким образом, взрослую популяцию представляют только самки, поэтому мы исследовали только самок *D. gyrociliatus*, которых изучали на различных этапах

онтогенеза: стадиях трохофоры (1,5–4 дня после яйцекладки, дрo), ювенильной (5–7 дрo), взрослой (14–30 дрo) и старшей (71–80 дрo). Яичные коконы собирали сразу после их появления, ежедневно наблюдали за ними и через день переносили в новые чашки Петри. Такой подход позволил детально проанализировать каждую развивающуюся особь.

Функциональные эксперименты. Функциональные фармакологические эксперименты проводили с экспериментальными объектами отобранных стадий развития. Инкубирование образцов в растворах целевых веществ позволяло моделировать уровень серотонина и дофамина в клетках экспериментальных образцов: зародышах большого прудовика и катушки, личинках морских ежей, в тканях личинок губок и архианнелид. Тестировалось действие как самого серотонина и дофамина, так и их непосредственных биохимических предшественников – 5-НТР и L-DOPA. Для каждой конкретной модели концентрации действующих веществ подбирались индивидуально и составляли 1-10 мкМ для моноаминов, 100 мкМ - 1мМ – для биохимических предшественников. Для предотвращения окисления при длительных инкубациях к растворам добавлялась аскорбиновая кислота. Растворы менялись раз в сутки.

Тестируемые растворы гидрофобных химических соединений готовили в ДМСО, после чего разводили в 10 раз 96% этанолом. Такая процедура способствует увеличению растворимости веществ в содсодержащих средах, в том числе в морской воде. Растворимость исследуемых соединений контролировали с помощью стереомикроскопа МБС-10, позволяющего визуально определять выпадение кристаллов или помутнение инкубационного раствора. Обработку веществами проводили в 6-луночных культуральных планшетах или ч. Петри. В каждую лунку помещали 5 мл суспензии яйцеклеток или зародышей и добавляли соответствующий объем раствора исследуемого вещества для достижения требуемой конечной концентрации. При этом максимальная концентрация растворителя не превышала предельно допустимую (1% для этанола и 0.1% для ДМСО. Отсутствие эффекта таких растворов было многократно доказано ранее).

Для оценки антимиотической активности яйцеклетки обрабатывали веществами через 8–15 мин после оплодотворения, и через 2.5 и 5.5 ч регистрировали нарушение и/или остановку дробления. В тестах использовали последовательно понижающиеся в два раза концентрации веществ до исчезновения эффекта. Активность оценивали по наименьшей (пороговой) концентрации ЕС (MEC), вызывающей соответствующий биологический эффект. Наблюдения проводили с помощью оптического микроскопа Биолам ЛОМО (г. Санкт-Петербург, Россия) до перехода к активному питанию (средний плутеус 2).

Морфологический анализ. Трансмиссионная электронная микроскопия. Образцы префиксировали в 0,25% растворе тетроксидом осмия, приготовленного на 0,1М какодилатном буфере для пресноводных губок и разбавленном в 4 раза 0,1М буфере для морских (3 мин.). Затем проводили фиксацию 2,5% раствором глутарового альдегида, приготовленного на том же буфере (1 ч.) и постфиксацию 4% раствором тетроксидом осмия (1 ч.) и отмывку в буфере. После этого образцы будут переводили в спирт (30-50-70 %), затем постепенно в ацетон и смолу Spurr. Методики фиксации уже были отработаны нами в ходе предыдущих работ. Смоляные блоки резали на полутонкие (для ориентирования в препарате) и ультратонкие срезы и монтировали на бленды с формваровой подложкой. Затем срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали под трансмиссионным электронным микроскопом (ТЭМ). Особое внимание уделяли строению кинетида, расположению и числу митохондрий, расположению и форме аппарата Гольджи, структуре внешней мембраны клетки, наличию, расположению и структуре клеточных контактов.

Иммуноцитохимическое маркирование проводили по методике, отработанной для личинок. Образцы фиксировали в 4% параформе, приготовленном на 0,01 М фосфатном буфере для зародышей моллюсков и пресноводных губок и буфере с 10% морской воды для морских губок и личинок морских ежей. Затем образцы отмывали буфером, инкубировали в растворе первичных антител с детергентом Triton, снова отмывали и инкубировали в растворе вторичных антител с флуоресцентными маркерами Alexa. При необходимости присунокоединяли маркирование актина фаллоидином и ядерными маркерами DAPI/ToTo. Изготовленные тотальные препараты заключали в глицерин.

Для иммунохимического маркирования использовали антитела против серотонина, дофамина, ацетилированного альфа-тубулина (маркера жгутиков зрелых хоаноцитов и локомоторных ресничек личинок). Для маркирования контуров клеток, длины и формы воротничков хоаноцитных клеток использовали меченный Alexa 488 фаллоидин. Первичные антитела визуализировали соответствующими вторичными антителами с флуоресцентной меткой Alexa. Ядра клеток подкрашивали DAPI или ToTo, в зависимости от флуоресцентных маркеров вторичных антител.

Анализ препаратов проводили с использованием лазерного конфокального микроскопа Zeiss 880, оснащенного модулем суперразрешения Airyscan (Карл Цайсс, Германия), что позволило идентифицировать тонкие структуры на всех стадиях развития личинки, взаимное расположение иммунопозитивных элементов. Полученные иммунофлуоресцентные многоцветные препараты исследовали с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии и последующим 3D-моделированием с

помощью оригинального программного обеспечения (Zeiss, ImageJ). Проведенное двойное и тройное иммуномечение, сочетающее окраску нескольких систем на последовательных стадиях развития, позволило установить паттерн распределения выявленных элементов на ключевых стадиях развития, а также их изменение после определенных фармакологических воздействий.

Статистическая достоверность полученных результатов определялась повторением экспериментов как минимум в трех независимых группах, с последующим стандартным иммунохимическим маркированием, выполнением всех необходимых контролей и анализом полученных препаратов двойным слепым методом.

1.3 Результаты и обсуждение

1.3.1 Участие материнского серотонина в формировании паттернов развития и поведенческой стратегии потомства моллюсков

Серотонин обнаруживается в локальной сети, окружающей созревающие яйцеклетки, в гонадах большого прудовика (рисунок 1). В процессе созревания позитивная реакция с антителами к серотонину выявляется в цитоплазме яйцеклетки (рисунок 1). Повышение уровня моноаминов в материнском организме (в определенное время года или фармакологически-индуцированное) приводит к повышению уровня моноаминов в формирующихся яйцеклетках и затем в бластомерах.

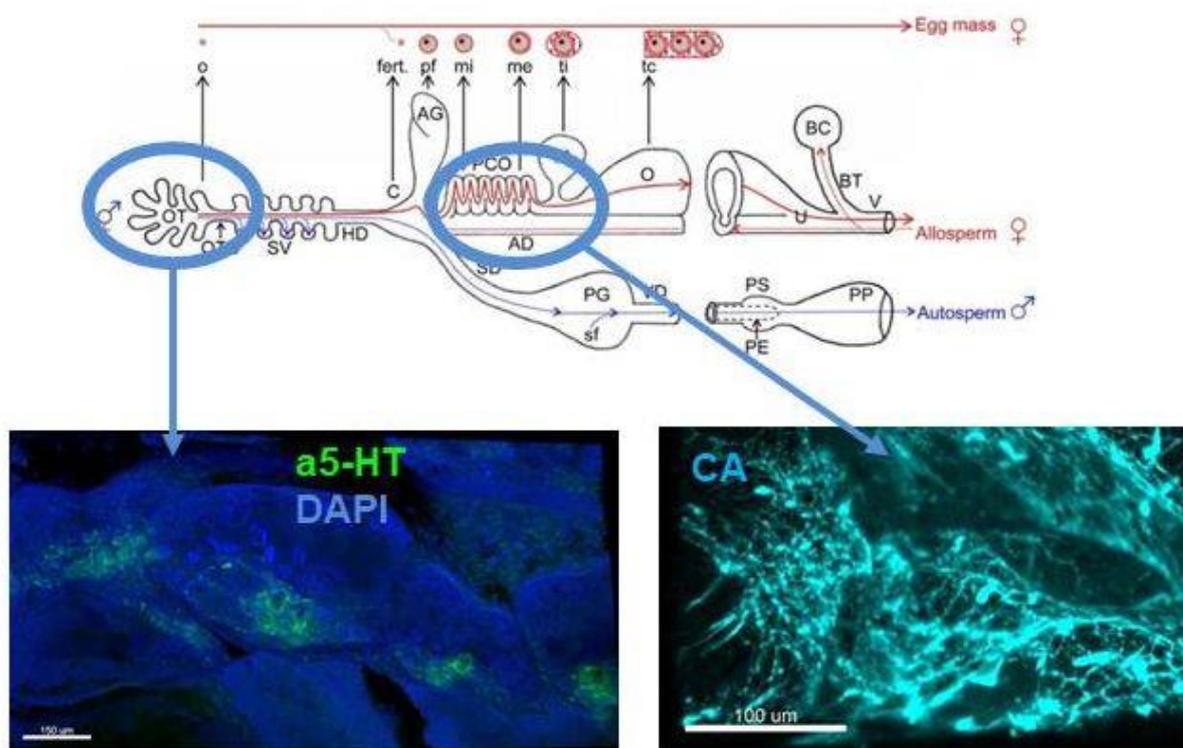


Рисунок 1 - Моноамины в локальной нервной сети в женской части половой системы большого прудовика

Позитивная реакция к серотонину в яйцеклетке показана зеленым, гистохимическая реакция на катехоламины в нейронах – цианом, ядра клеток – синим.

Результаты наших многолетних исследований позволили свести регуляционные эффекты серотонина на разных этапах развития в единую картину [17]. Мы установили, что женская репродуктивная система представляет собой место тесного контакта материнской серотонин-высвобождающей сети с ооцитом и зиготой. Сезонные факторы и факторы окружающей среды приводят к модуляции уровня серотонина в материнском

организме и последующим изменениям внутри развивающегося эмбриона. Высокий уровень серотонина в делящихся бластомерах обеспечивает субстрат для трансглутаминазы, в результате чего происходит серотонилирование определенных белков (рисунок 2). В результате происходящих долговременных изменений появляется потомство с более быстрым развитием и активной локомоцией, негативным геотаксисом, повышенной выживаемостью и продуктивностью. Все эти признаки можно объединить в комплекс поведения, свойственный «мигрантным» особям.

На более поздней стадии развития дифференцируются эмбриональные сенсорные нейроны. Такие эмбриональные апикальные нейроны реагируют на водные химические сигналы, испускаемые взрослыми в неблагоприятных условиях (химическая сигнализация «взрослый-зародыш»). Серотонин, высвобождаемый апикальными нейронами, активирует специфические рецепторы к серотонину, расположенные на мембранах эмбриональных клеток и меняют темпы эмбрионального развития. В процессе развития изменяется экспрессия как определенных рецепторов серотонина, так и связанных с ними G-белков. Мы обнаружили, что по крайней мере четыре типа рецепторов к 5-НТ участвуют в подобных регуляциях. Активация 5-НТ₁- и 5-НТ₅-подобных рецепторов и соответствующего связанного G_i-белка вызывает ускорение развития, в то время как активация 5-НТ₄- и 5-НТ₇-подобных рецепторов и соответствующих G_s-белков приводит к замедлению развития. Хотя все типы рецепторов серотонина экспрессируются как на ранних, так и на поздних стадиях эмбрионального развития, их пропорции варьируются в зависимости от стадии. Рецепторы 5-НТ и соответствующие G-белки, активация которых вызывает задержку развития (5-НТ₄-подобные, 5-НТ₇-подобные, G_s), преобладают на ранних стадиях. Напротив, рецепторы 5-НТ и G-белки, активация которых вызывает ускорение развития (5-НТ₁-подобные, 5-НТ₅-подобные, G_i), предпочтительно экспрессируются на поздних стадиях. Таким образом, серотонин, синтезируемый апикальными сенсорными нейронами в ответ на внешние стимулы, замедляет или ускоряет темпы развития в зависимости от конкретной стадии развития (рисунок 2).

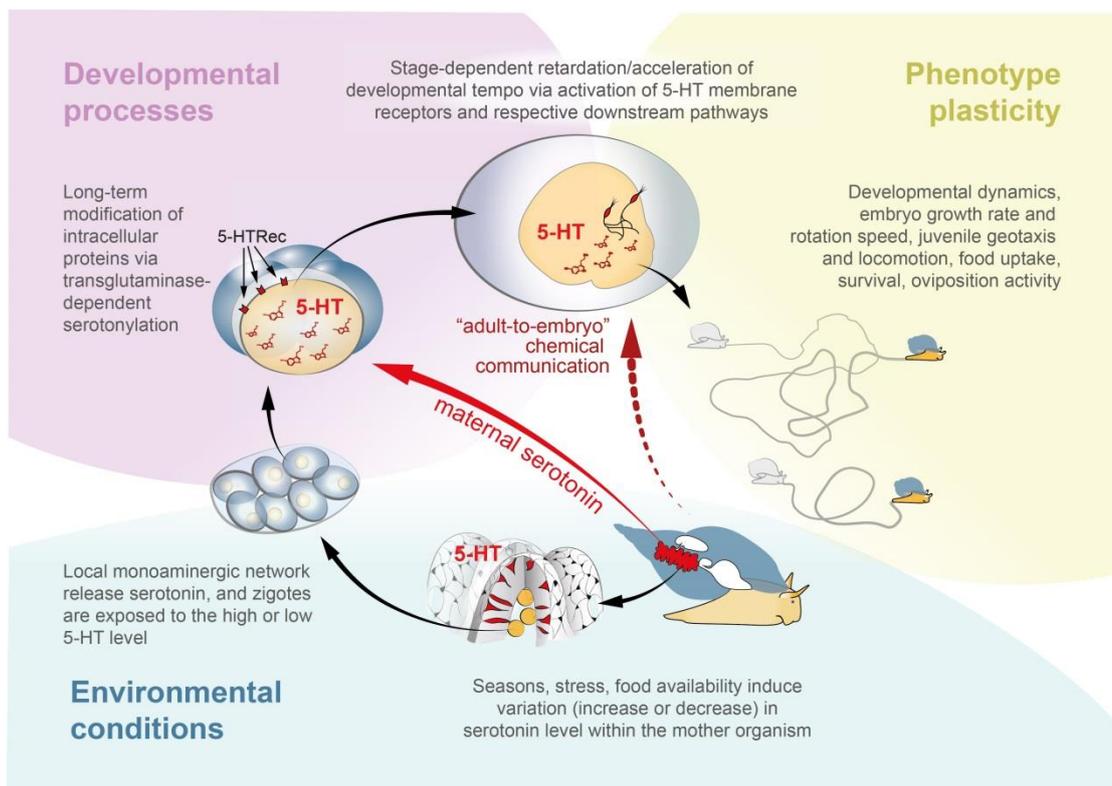


Рисунок 2 - Схематическое представление адаптационных подстроек в жизненных стратегиях потомства, основанных на серотонин-опосредованных регуляторных механизмах во время жизненного цикла пресноводных брюхоногих моллюсков. Сплошная красная стрелка представляет прямое действие материнского серотонина на развивающиеся ооциты и зиготы. Пунктирная красная стрелка представляет химические сигналы, передаваемые через воду от взрослых, которые активируют высвобождение серотонина из апикальных сенсорных нейронов эмбриона.

Результаты нашей работы позволяют заключить, что сочетание серотонин-зависимых механизмов в процессе развития лежит в основе соответствующего адаптивного выбора жизненной стратегии потомства, что обеспечивает репродуктивный успех популяции и широкое распространение пресноводных моллюсков, занимающих практически весь Голарктический регион [17].

1.3.2 Внутриклеточные дофамин-содержащие структуры у личинок губок

Губки занимают особое место среди беспозвоночных животных, используемых в качестве модельных объектов для анализа роли моноаминов в адаптивной пластичности. Как древнейший тип многоклеточных животных, возникший более 500 млн лет назад, губки - Porifera стоят у истоков происхождения всех многоклеточных животных. Геномные и транскриптомные исследования показали, что биохимический инструментарий, необходимый для метаболизма моноаминов, у губок представлен не полностью, а рецепторов к моноаминам нет вовсе [16]. При этом показано присутствие отдельных элементов пути синтеза моноаминов в исследованных транскриптомах и

геномах губок [16], также несомненным является факт, что губки реагируют на аппликацию внешних моноаминов [18]. Такой набор свойств позволяет использовать губок как уникальную модель, позволяющую отделить эффекты, обусловленные активацией мембранных рецепторов, от внутриклеточных эффектов моноаминов.

Биоинформационный анализ показал, что в геноме модельной пресноводной губки *Ephydatia muelleri* присутствуют ферменты, необходимые для синтеза моноаминов. При этом наиболее вероятным путем синтеза оказался путь, ведущий к дофамину. Проведенный анализ образцов показал, что дофамин встречается в пробах значительно чаще, чем серотонин. Поэтому в своих исследованиях пресноводной губки *Eunapius fragilis* мы основное внимание уделяли именно дофамину [19].

У личинок пресноводных губок маркирование антителами к дофамину и серотонину выявлялось в покровных клетках. Метка располагалась сбоку от апикального выроста ядра, в непосредственной близости от жгутика. Сканирование дофаминовой метки с использованием суперразрешения AiryScan показало, что дофамин-позитивная структура состоит из трёх-четырёх компартментов. В зависимости от проекции компартменты либо располагались по кругу, либо были выстроены в изогнутую линию (рисунок 3 А-Г). Одновременное маркирование антителами к дофамину и маркеру аппарата Гольджи (белку 58К/ FTCD) продемонстрировало близкое расположение обеих меток сбоку от апикального выроста ядра (рисунок 3 Д-Е). При этом метки не совпадают, но соседствуют, и дофамин-позитивная метка расположена базальнее по отношению к 58К-позитивной метке.

Сопоставление локализации иммунопозитивных гранул и расположения внутриклеточных органелл указывает на аппарат Гольджи, как наиболее вероятное место конденсации ненейрональных внутриклеточных моноамин-содержащих структур.

Ультраструктурный анализ подтвердил такое предположение. У личинок *Eunapius fragilis* расположение моноамин-позитивных меток соответствовало расположению аппарата Гольджи (рисунок 4).

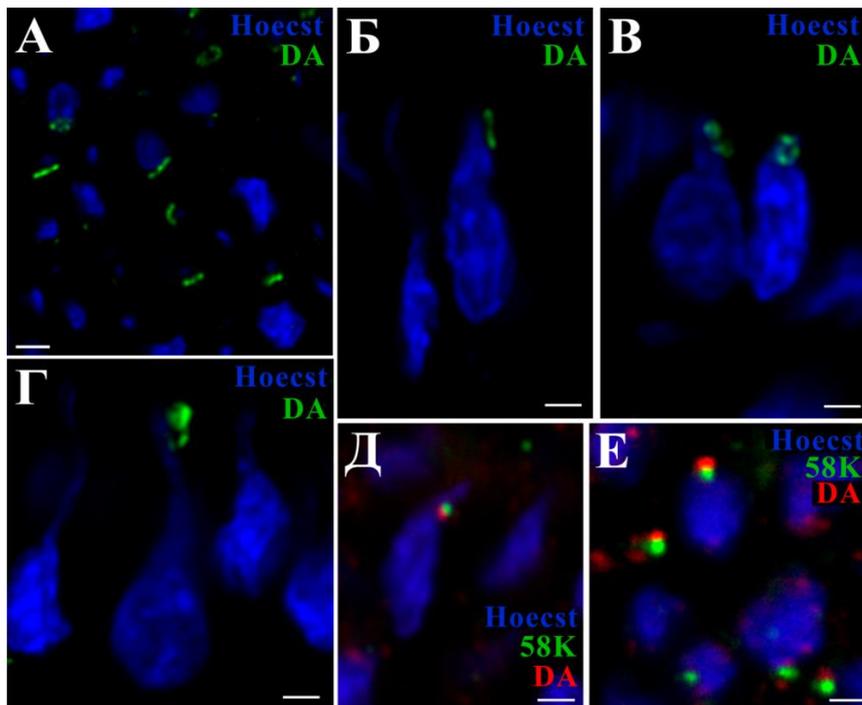


Рисунок 3 - Иммунофлуоресцентное маркирование покровных клеток личинок пресноводной губки *Eunapius fragilis*

А-Г - Маркирование антителами к дофамину (DA) и ядерным красителем (Hoechst). Д-Е - Маркирование антителами к дофамину и белку аппарата Гольджи 58К. Масштабные линейки 1 мкм.

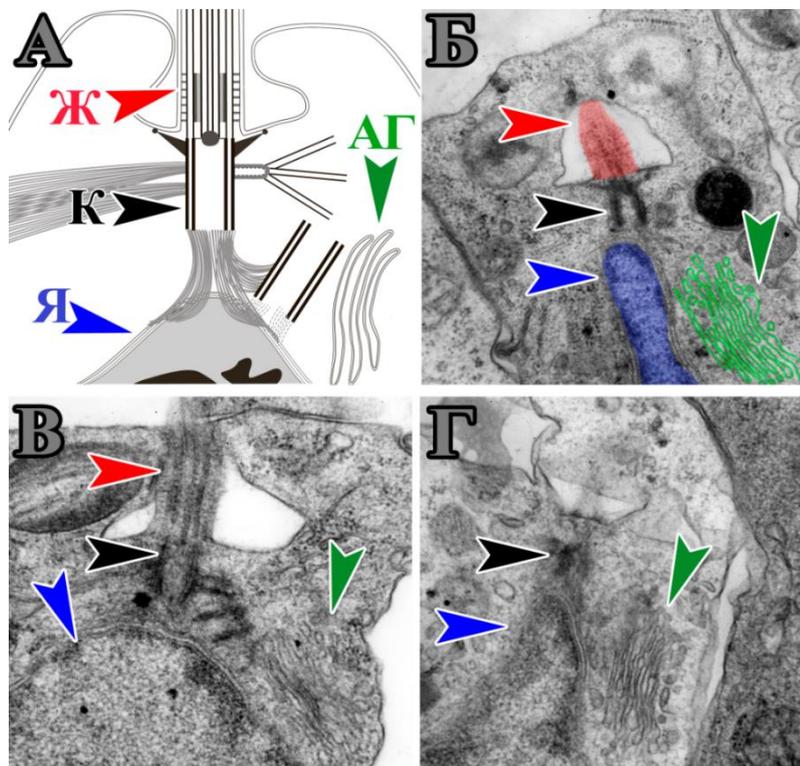


Рисунок 4 - Ультраструктурный анализ покровных клеток личинок пресноводных губки *Eunapius fragilis*

А - Схема взаимного расположения жгутикового аппарата, аппарата Гольджи и ядра. Б-Г -Электронogramмы срезов через ядро и кинетосому. АГ – аппарат Гольджи, Ж – жгутик, К – кинетосома, Я – ядро.

В ходе электронно-микроскопических исследований мы показали, что пространство под жгутиком может существенно различаться по организации как у губок из разных филогенетических групп, так и на разных стадиях жизненного цикла одного вида, а также в разных типах клеток одной личинки. В результате скрининга строения связанных со жгутиком клеточных элементов мы реконструировали вероятный ход эволюции жгутикового аппарата личинок губок и выявили наиболее перспективные виды для последующего изучения моноаминергической регуляции жгутиковой активности. Так, мы выяснили, что личинки пресноводных губок обладают жгутиковым аппаратом, очень близким по строению к исходному предковому варианту, что делает их особенно интересными в контексте изучения регуляции функциональной активности жгутиков [20, 21].

1.3.3. Изучение антипролиферативных свойств 3,4-диарилпиррол-2-карбоксамидов на модели зародышей морского ежа

Зародыши морского ежа являются адекватной экспериментальной моделью для скрининга химических соединений и определения их биологической активности. Возможность получения большого количества гамет, простота искусственного оплодотворения и выращивания, крупные размеры яйцеклеток, быстрое синхронное деление клеток на ранних стадиях развития, высокая проницаемость для различных веществ, прозрачность зародышей и личинок обеспечили широкое применение данной тест-модели в в медико-биологических исследованиях. Хорошо изученные процессы дифференцировки и морфогенеза зародышей морского ежа позволяет интерпретировать наблюдаемые нарушения развития и в ряде случаев охарактеризовать механизм действия испытуемых агентов. Разработанный нами ранее фенотипический метод скрининга на модели зародышей морского ежа позволяет быстро идентифицировать молекулы, способные нарушать деление клеток, и дает информацию о природе антимитотической активности. Так, были выявлены десятки веществ-антимитотиков, действие которых обусловлено дестабилизацией микротрубочек. Метод дает хорошо воспроизводимые результаты, которые подтверждаются данными испытаний на общепринятых тест-системах, таких как культуры опухолевых клеток и полимеризация очищенного тубулина *in vitro*.

Эксперименты на развивающихся зародышах морских ежей подтвердили важность наличия 4-метоксифенильного фрагмента в молекуле диарилпирролдкарбоксамидов для проявления антимитотического действия [22]. Механизм действия наиболее активного антимитотика N-этилкарбоксамид (I) заключался в дестабилизации микротрубочек.

Другой механизм действия был обнаружен для соединения (II) с незамещенным фенильным кольцом. Это вещество не влияло на развитие зародышей морского ежа до стадии гастролы, а далее вызывало радиализацию зародышей. Предполагается, что клеточной мишенью этого вещества может служить компонент сигнального пути Nodal (рисунок 5).

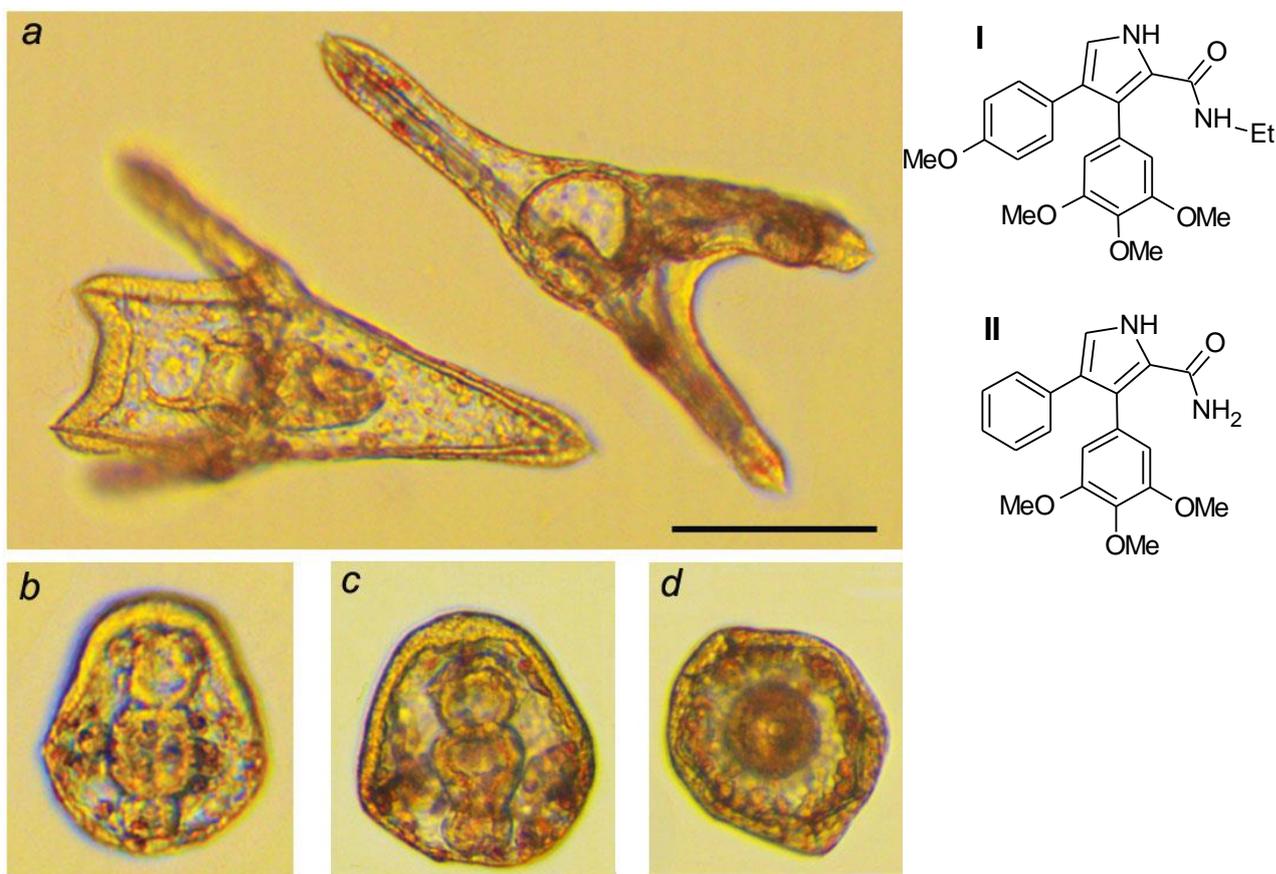


Рисунок 5 - Действие пирролкарбоксамидов на развитие зародышей морского ежа *Paracentrotus lividus*

Интактные плутеусы (a); приобретение зародышем колоколообразной формы вследствие нарушения симметрии и угнетения формирования личиночного скелета при действии ингибитора Nodal-сигнализации RepSox в концентрации 1 μM (b) и пирролкарбоксамидов в концентрации 4 μM (c, d) (d — вид со стороны бластопора). Обработку осуществляли на стадии оплодотворенной яйцеклетки; микрофотосъемку производили через 35 ч после оплодотворения. Перед микрофотосъемкой зародышей обездвиживали 5-[(6,7-диметокси-1,3-бензодиоксол-5-ил)метил]-3-(4-метоксифенил)-4,5-дигидроизоксазолом в концентрации 2 μM в течение 20 мин. Масштабная линейка: 115 μm .

1.3.4. Ресничные структуры в онтогенезе архианнелиды

Прототрох — характерная личиночная структура, консервативная в ряду трохофорных животных. Прототрох появляется как первая заметная ресничная структура в эмбриогенезе, используется личинкой для локомоции и питания, а затем дегенерирует или модифицируется в процессе метаморфоза. Используя современную конфокальную микроскопию, мы детально описали область прототроха у *Dimorphilus gyrotilatus* от

момента возникновения до последних дней существования особи, и показали, что она устроена значительно сложнее, чем считалось ранее.

Первый ряд ресничных клеток появляется в развитии на стадии трохофоры. К стадии вылупления в районе простомиума обнаруживаются три ресничных тяжа: передний, с длинными ресничками (14–16 μm); средний, с короткими ресничками (3–4 μm); и задний с ресничками средней длины (9–10 μm). Каждый тяж состоит из двух рядов клеток, несущих реснички (рисунок 6). Мы полагаем, что верхние ряды ресничек представляют собой то, что обычно считается собственно прототрохом. В то время как срединный желобок с короткими ресничками гомологичен адоральной ресничной зоне, а нижний ряд ресничных клеток гомологичен метатроху (рисунок 7). Ресничный аппарат сохраняется в процессе онтогенеза и обнаруживается у возрастных особей в самом конце жизни. С возрастом реснички в прототрохе и метатрохе становятся в два раза короче, однако, прототрох включает уже четыре ряда ресничных клеток.

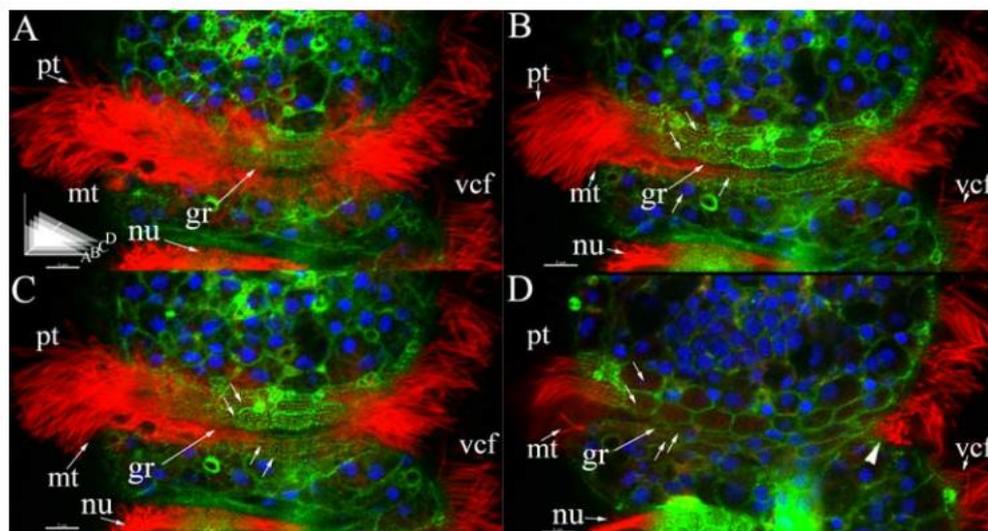


Рисунок 6 - Ювенильная особь *Dimorphilus gyrocilatus*, непосредственно перед вылуплением, вид сбоку (5 d.p.o.)

Четыре последовательных оптических среза. А — вид поверхности с передним и задним рядами клеток, несущими длинные и средние реснички, соответственно, и промежуточный желобок; В–С — более глубокий срез, демонстрирующий клеточную структуру всех трех ресничных рядов. Каждый из рядов состоит из двух слоев клеток. Основания ресничек промаркированы фаллоидином; D — более глубокий срез, видны клетки прототроха, метатроха и желобка. Красный — тубулин, зеленый — актин, синий — ядра. Обозначения: ast — акротрох; gr — пищевой желобок; mo — рот; mt — метатрох; nu — нухальный орган; pt — прототрох; два ряда клеток перед желобком и два ряда клеток после желобка отмечены двойными стрелками. Масштабная линейка: 5 μm .

Интересно отметить, что после ингибирования мышечной активности глоточного бульбуса вылупившиеся ювенили сохраняют способность захватывать пищевые частицы. Этот эксперимент подтверждает ранее высказанную гипотезу об использовании

ресничного аппарата области простомиума взрослыми динофилюсами для фильтрации, в дополнение к скребущей мышечной активности бульбуса,. Таким образом, мы уточнили организацию цилиарных тяжей *D. gyrociliatus*, расположенных в простомиальной области, продемонстрировали их сохранение в процессе онтогенеза, а также подтвердили участие цилиарного аппарата в активном захвате пищевых частиц (рисунок 8).

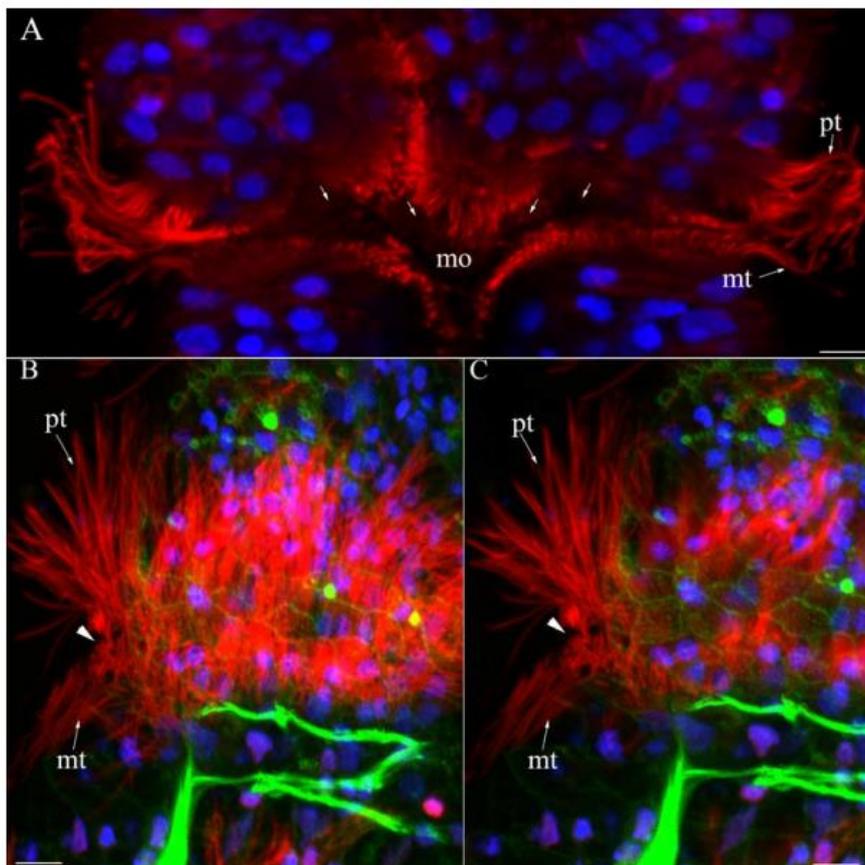


Рисунок 7 - Взрослая особь *Dimorphilus gyrociliatus* (25 d.p.o.), вентральный и латеральный вид

А — оптический срез с вентральной стороны, демонстрирующий ресничный желобок (промаркирован четырьмя стрелками); В–С — взрослая особь, вентральный вид, демонстрирующий длинные и средние реснички прототроха и метатроха, соответственно, и короткие реснички между ними (четыре стрелки). Красный — тубулин, зеленый — актин, синий — ядра. Обозначения: gr — желобок; mo — рот; mt — метатрох; pt — протрох. Масштабная линейка: А — 15 мкм; В, С — 10 мкм.

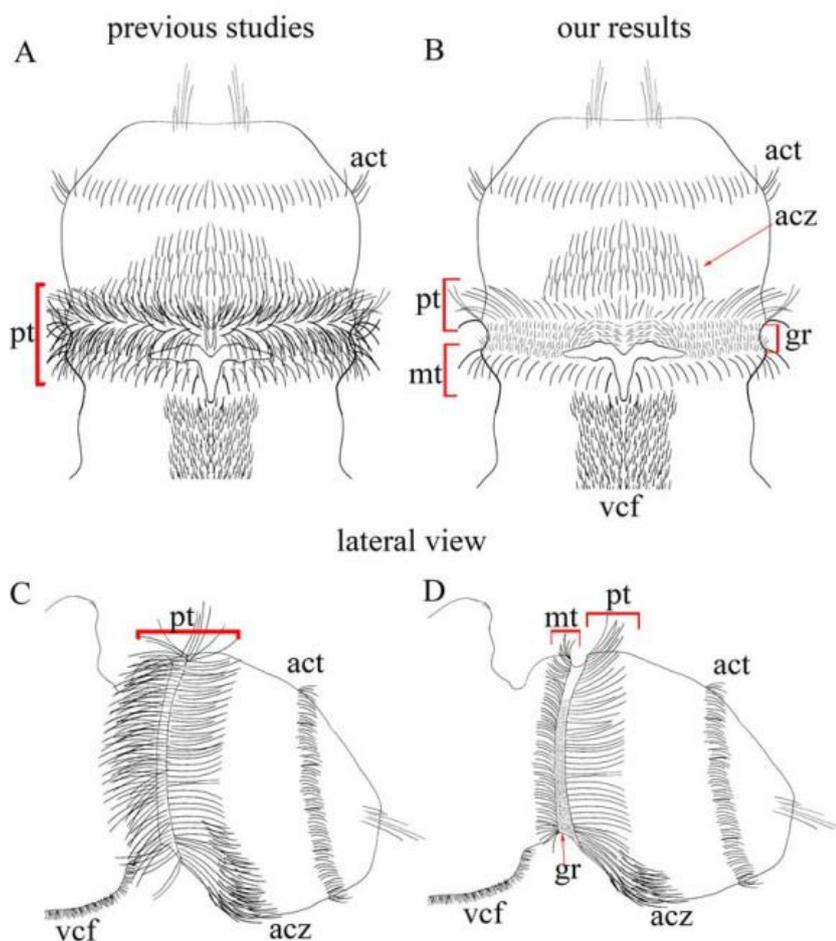


Рисунок 8 - Схематичное изображение пищедобывающего аппарата *D. gyrotilius*. А, С — раннее представление, мощный прототрох с длинными ресничками, расположенный над ротовым отверстием; В, D — наши результаты, показывающие прототрох с длинными ресничками, адоральную ресничную зону и метатрох с короткими ресничками, представляющие downstream механизм. Обозначения: act — акротрох; acz — передняя ресничная зона; gr — желобок; ro — ротовое отверстие; mt — метатрох; pt — прототрох.

В целом наши морфологические и экспериментальные данные указывают на то, что *Dimorphilus gyrotilius* использует ресничный аппарат простомиальной области для поглощения частиц в дополнение к скребущей активности мышечного бульбуса на протяжении всей жизни. Активность обеих этих структур находится под контролем серотонинергической системы и может служить удобной моделью для анализа серотонина в адаптации пищевого поведения [23].

1.4 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Müller C.P., Cunningham K.A. Handbook of the behavioral neurobiology of serotonin. 2nd Edition. – Academic Press. – 2020. – Volume 31 – 1042 p.
2. Muma N.A., Mi Z. Serotonylation and transamidation of other monoamines // ACS Chem. Neurosci. – 2015 – Vol. 6 – P. 961–969. doi:10.1021/cn500329r.
3. Pilowsky P.M. Serotonin in central cardiovascular regulation // Elsevier Inc. – 2018. doi:10.1016/B978-0-12-800050-2.00016-4.
4. Schmidt-Rhaesa A., Harzsch S., and Purschke G. Structure and Evolution of Invertebrate Nervous Systems // Struct. Evol. Invertebr. Nerv. Syst. – 2016. doi:10.1093/acprof:oso/9780199682201.001.0001
5. Sakharov D.A. Integrative function of serotonin common to distantly related invertebrate animals. In: Gustafsson M, Reuter M (eds) The early brain. – Abo Akademi, Abo. – 1990. – pp 73–88.
6. Moroz L.L., Romanova D.Y., Kohn A.B. Neural versus alternative integrative systems: Molecular insights into origins of neurotransmitters // Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. – 2021. – P. 376. doi:10.1098/rstb.2019.0762
7. 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 // Embryol. exp. Morph – 1964. – Vol. 12 – P. 563–573.
8. Buznikov G.A., Lambert W.H., Lauder, J.M. Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis // Cell Tissue Res.- 2001. – Vol. 305. – P. 177–186. doi:10.1007/s004410100408.
9. Dubé F., Amireault P. Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos // Life Sci. – 2007. – Vol. 81. – P. 1627–1637. doi:10.1016/j.lfs.2007.09.034.
10. Buznikov G.A. (1991) The biogenic amines as regulators of early (pre-nervous) embryogenesis: new data // Adv. Exp. Med. Biol. – 1991. – Vol. 296. – P. 33-48.
11. Bonnin A., Levitt P. Fetal, maternal and placental sources of serotonin and new implications for developmental programming of the brain // Neuroscience. – 2011. – Vol. 197. – P. 1-7.
12. Bonnin A., Goeden N., Chen K., Wilson M.L., King J., Shih J.C., et al. A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain // Nature. – 2011. – Vol. 472. – P. 347–350. doi:10.1038/nature09972.

13. Vitalis T., Ansorge M.S., Dayer A.G. . Serotonin homeostasis and serotonin receptors as actors of cortical construction: Special attention to the 5-HT_{3A} and 5-HT₆ receptor subtypes // *Front. Cell. Neurosci.* – 2013. – Vol. 7. – P. 1–20. doi:10.3389/fncel.2013.00093.
14. Turlejski K. Evolutionary ancient roles of serotonin: Long-lasting regulation of activity and development // *Acta Neurobiol. Exp. (Wars).* – 1996. – Vol. 56. – P. 619–636.
15. Azmitia E.C. Evolution of Serotonin: Sunlight to Suicide. Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin. – Elsevier B.V. – 2010. – pp. 3-22. doi:10.1016/s1569-7339(10)70069-2.
16. Riesgo A., Farrar N., Windsor P.J., Giribet G., Leys S.P. The analysis of eight transcriptomes from all poriferan classes reveals surprising genetic complexity in sponges // *Mol Biol Evol.* –2014 – Vol.31, N 5 – P. 1102-1120.
17. Voronezhskaya E.E. Maternal Serotonin: Shaping Developmental Patterns and Behavioral Strategy on Progeny in Molluscs // *Frontiers in Ecology and Evolution.* – 2021. – Vol. 9. – P. 739787. DOI: 10.3389/fevo.2021.739787.
18. Leys S.P. Elements of a ‘nervous system’ in sponges // *J Exp Biol.* –2015 – Vol. 218 – P. 581-591.
19. Sokolova A.M., Voronezhskaya E.E. Dopamine-like immunoreactivity in sponge larvae // *Invertebrate Zoology.* – 2021. – Vol. 18. – No 3. – P 345-354.
20. Sokolova A.M., Aksenova O.V., Bepalaya Y.V., Gofarov M.Y., Kondakov A.V., Konopleva E.S., Tomilova A.A., Travina O.V., Tanmuangpak K., Tumpeesuwan S., Vikhrev I.V., Bolotov I.N. Integrative taxonomy and biogeographic affinities of the first freshwater sponge and mollusc association discovered in tropical Asia // *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research.* – 2021. DOI 10.1111/jzs.12504.
21. Sokolova A.M., Palatov D.M., Masuda Y., Itskovich V.B. Investigation of the spongillid *Spongilla alba* Carter, 1849 reveals a new group of brackish-water sponges // *Systematics and Biodiversity.* – 2021. DOI: 10.1080/2f14772000.2021.1958948.
22. Сильянова Е.А., Самет А.В., Семенова М.Н.1, Семенов В.В. Синтез и антипролиферативные свойства 3,4-диарилпиррол-2-карбоксамидов // *Известия Академии наук. Серия химическая.* – 2021. – № 3. – С. 498-509. DOI: 10.1007/s11172-021-3115-5.
23. Fofanova E.G., Voronezhskaya E.E. Ciliary bands in the prostomium region of *Dimorphilus gyrotilatus* (Annelida: Dinophiliformia) and their involvement in food uptake // *Invertebrate Zoology.* – 2021. – Vol. 18. – Is. 3. – P. 223-239. DOI:10.15298/invertzool.18.3.03.

РАЗДЕЛ 2 НЕЙРОГУМОРАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТИВНОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ В ОНТОГЕНЕЗЕ МОДЕЛЬНЫХ ПОЗВОНОЧНЫХ

2.1 Введение

С момента открытия нейрональных моноаминов – серотонина и дофамина – в середине XX века ученые нашли огромное количество функций, в которых участвуют эти вещества. Пожалуй, трудно найти такой физиологический процесс во взрослом организме, в котором серотонин и дофамин не были бы задействованы в той или иной степени. У человека это такие жизненно важные функции, как регуляция сна и бодрствования, агрессия и тревожность, пищеварение, воспаление и многое другое. Исследованию механизмов, обеспечивающих многогранные регуляторные функции моноаминов, посвящено огромное количество работ. На сегодняшний день изучены на молекулярном уровне процессы синтеза и деградации серотонина и дофамина, мембранный транспорт, упаковка и выброс из везикул, особенности работы широкого спектра рецепторов. В последние десятилетия было показано, что регулярные механизмы действия моноаминов также включают в себя сложные многокомпонентные системы, в которых важную роль играет баланс моноаминов внутри и снаружи клеток [1, 2, 3]. Такие системы могут существовать как в пределах единичных клеток, так и быть разнесены на тканевом, органном и даже организменном уровне [4], позволяя говорить о моноаминах как о системных интегративных модуляторах [5], в частности, для нейральных процессов [6, 7]. В своей работе мы представляем моноамины, как одно из звеньев адаптаций на уровне формирующегося организма, позволяющее увеличить разнообразие физиологических реакций отдельных особей, происходящее на базе одной и той же генетической программы (без изменения базовой генетической основы). Увеличение пластичности в процессе развития приводит к расширению (или направленному сдвигу) границ реакции в пределах всей популяции, и таким образом повышает устойчивость её существования при меняющихся внешних условиях. Именно в контексте значения для формирования экологической приспособленности и будет рассмотрена роль моноаминов в период раннего развития эмбриона или зародыша.

В своей работе мы собрали литературные данные о присутствии и роли моноаминов в раннем развитии, возможных механизмах долговременных моноамин-зависимых регуляций, являющихся основой адаптаций на уровне всего организма, рассмотрели перспективы подхода к моноаминам с точки зрения их отложенного действия при формировании паттернов развития и поведения как у беспозвоночных, так и у позвоночных животных. Показали, что используемая в экспериментах методика

повышения уровня серотонина внутри клеток за счет инкубации в предшественнике серотонина – 5-НТР – не является токсичной для эмбрионов позвоночных в физиологическом диапазоне концентраций.

2.2 Материалы и методы

Животные. Мышей линии C57Bl/6 в возрасте 7–8 недель получали из животноводческого комплекса-филиала «Пушино» Института биоорганической химии РАН. Животных содержали в стандартных условиях с контрольным режимом освещения (свет с 5 до 19 часов). Эксперименты проводились в течение всего года. При выполнении исследований все манипуляции, проводившиеся с экспериментальными животными, методы обезболивания, эвтаназии и ухода за животными до и после экспериментальных вмешательств соответствовали международным нормам по биоэтике. План экспериментов одобрен Комиссией по биоэтике ИБР им Н.К. Кольцова РАН (экспертное заключение №22 от 15 марта 2018 г.). Выделение экспериментального материала выполняли под изофлурановым ингаляционным наркозом.

Для суперовуляции самкам мышей вводили гонадотропин в сыворотке крови беременных кобыл (5 ед. внутривенно; Folligon, Intervet International, Boxmeer, Голландия) и, 46 ч спустя, с хорионическим гонадотропином человека (7 ед. перитонеально; Chorulon, Intervet International, Boxmeer, Holland). Для получения эмбрионов самок ссаживали с самцами на ночь и наличие вагинальных пробок тестировали на следующее утро (эмбриональная стадия E0.5).

Для получения эмбрионов на стадиях E2,5 – E4,5 оплодотворенных самок умерщвляли цервикальной дислокацией, доставали яйцеводы и матку и промывали средой M2 с NEPEs (M7167; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Эмбрионов культивировали в Knock-Out DMEM (10829018; Gibco / Thermo Fisher Scientific, USA), который содержал 2 mM L-глутамин (A2916801; Gibco / Thermo Fisher Scientific, USA), 1% заменимых аминокислот (11140050; Gibco / Thermo Fisher Scientific, USA), 0,1 mM β-меркаптоэтанола (M3148; Sigma-Aldrich, St.Луис, Миссури, USA) и 15% заменителя сыворотки KnockOut Serum Replacement (A3181501; Gibco / Thermo Fisher Scientific, USA). Культивирование проводили во влажной камере с 5% CO₂ при 37 °C. Эмбрионы на стадиях E2.0 – E3.5 культивировали в четырехлуночной планшете Nunclon (Nalge Nunc International, USA) в среде без добавления и с добавлением 5-НТР в течение 24 часов. Стадии E4.5 бластоцисты предварительно культивировали в восьмилуночной камере Lab-Tek II Chamber Slide System (Nalge Nunc International, США) в течение 24 часов (E5.5). до стадии вылупления,

прикрепления и распластывания и затем подвергали воздействию 5-НТР в течение 24 часов.

Сбор бластоцист для транскриптного анализа. Для повышения уровня серотонина на предимплантационных стадиях самки мышей получали перорально предшественник серотонина 5-гидрокситриптофан (5-НТР) в дозе 1 мг/кг в течение 3х дней до зачатия и в течение 3х дней после. Контролем служили интактные беременные самки. Для последующего транскриптного анализа отбирали бластоцисты на стадии E3,5 путем вымывания из матки специальной средой для бластоцист. Вымытые бластоцисты тщательно отмывали от крови путем 10-ти кратного перенесения в чистые капли среды для бластоцист. Затем собранные бластоцисты замораживали на -80°C и хранили до проведения анализа. Анализ генетической информации образцов был проведен ЗАО «Геноаналитика».

Анализ клеточной гибели. Для обнаружения гибели клеток использовали выявление активности каспаз с помощью стандартного кита Image-iT LIVE Green Poly Caspase Detection (V35117, Molecular Probes/Termo Fisher Scientific). Все манипуляции проводили согласно инструкции производителя. После маркирования и промывки PBS препараты помещали на 15-луночные μ -слайды (81506; Ibidi, Мартинсрид, Германия) и сразу же исследовали под конфокальным микроскопом.

Чтобы проанализировать гибель клеток в эмбрионах, процент апоптотических (Casp +) и некротических (PI +) клеток у эмбрионов каждой экспериментальной группы подсчитывался и нормализовывался к общему количеству ядер (Hoechst +). Все измерения проводили с помощью инструмента автоматического подсчета клеток в ImageJ Software (<https://imagej.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html>). Подсчет клеток основывался на идентификации клетки маркированной одним из ядерных красителей: Hoechst, FLIKA / A488 и PI.

Анализ изображений проводили с помощью конфокального микропа Leica TSC SP5 (Германия) или Zeiss 880 (Карл Цайсс, Германия) при соответствующих флуорофору настройках возбуждения и эмиссии. В каждом конфокальном изображении z-стека, окрашенные клетки подсчитывали в два отдельных канала: Hoechst-A488 и Hoechst-PI. Для каждого конфокального z-стека было обработано не менее 50 изображений. Процент мертвых клеток на каждом изображении определялся по отношению маркированных FLIKA и PI ядер к общему количеству ядер. Средний процент высчитывался для каждой экспериментальной группы.

Статистическую обработку данных проводили с помощью компьютерных программ Excel и Statistica 7.0. Данные представлены в виде: среднее значение \pm

стандартная ошибка. Достоверность различий оценивали с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни.

2.3 Результаты и обсуждение

Проблема влияния моноаминов на процесс развития актуален как для беспозвоночных, так и для позвоночных животных, включая млекопитающих и человека. Моноаминергическая система является высоко консервативной, что дает возможность не только соотносить данные, полученные на далеко отстоящих в филогенетическом отношении организмов, но и проводить прямые параллели между экспериментами на модельных организмах и отклонениями в экспрессии компонентов моноаминергической системы у человека [8]. Значение активности моноаминергической системы во время раннего развития изучено менее всего и часто не учитывается в разработке подходов к терапии взрослого организма.

Уже на самых ранних этапах онтогенеза, подобно беспозвоночным животным с анцестральным типом развития, созревающий ооцит, зигота и ранний зародыш млекопитающих находятся под непосредственным влиянием моноаминов материнского организма. Серотонин в физиологических концентрациях определяется в гонадах и половых путях млекопитающих [9, 10]. Созревающий ооцит и ранний зародыш способны захватывать серотонин из окружающей среды [11]. В дальнейшем (на постимплантационных стадиях развития), ведущим источником серотонина для плода становится плацента. Экспрессия обоих ферментов синтеза серотонина (триптофангидроксилазы 1 и декарбоксилазы ароматических аминокислот), а также синтез серотонина были подтверждены в плаценте с 10 дня эмбрионального развития у мышей [12] и около 11-й гестационной недели у человека [12]. В этот период материнский триптофан (и, возможно, 5-НТР, непосредственный биохимический предшественник синтеза серотонина) могут служить источником серотонина у плода. Плацента непроницаема для серотонина матери, что было подтверждено экспериментами на животных с нокаутами SERT и прямой перфузией плаценты *ex vivo* [13, 14]., но сама способна синтезировать серотонин из поступающих из материнского организма биохимических предшественников. Ведущая роль плаценты в поддержании необходимого уровня серотонина у плода сохраняется у мышей в период с 10-го по 15-й день эмбрионального развития. Позднее возрастает синтез серотонина собственными тканями плода, в частности клетками мозга и желудочно-кишечного тракта. Таким образом, в

развитии млекопитающих происходит прогрессивное переключение источников серотонина с материнского на плацентарный и на эндогенные источники плода.

Существенно, что каждый из этих этапов по-разному чувствителен к внешним факторам: как сигналам, поступающим из организма матери, так и к сигналам из окружающей среды. Например, показано, что умеренный стресс или воспаление у матери приводит к повышению синтеза серотонина в плаценте и возрастанию его уровня в тканях плода [14, 15]. При этом именно плацентарный серотонин, поступающий к формирующимся корковым структурам плода значительно раньше, чем серотонин, синтезируемый нервными клетками самого эмбриона, оказывает ключевое влияние на формирование нейрональных структур в коре [16].

Плюрипотентные стволовые клетки воспроизводят *in vitro* ранние стадии развития и считаются адекватными клеточными моделями для исследований токсичности различных веществ в процессе развития. Мы оценили в эксперименте токсические реакции на предшественник серотонина - 5-гидрокситриптофан (5-НТР), который часто используется в экспериментах по повышению уровня серотонина у экспериментальных животных [17]. Было протестировано действие нескольких концентраций 5-НТР (0,5–2 мМ) на развитие ранних эмбрионов мыши (E2.5 – E5.5) (рисунок 9) и на дифференцировку эмбрионидных тел в трехмерной (3D) культуре *in vitro* (рисунок 10).

Сравнительный анализ токсических реакций у ранних эмбрионов и эмбрионидных тел выявил аналогичное дозозависимое и зависящее от стадии развития снижение токсических эффектов 5-НТР во время развития и дифференцировки. Интегральные токсические ответы у ранних эмбрионов и эмбрионидных тел в значительной степени зависели от их трехмерной архитектуры и клеточного состава. Обработка 5-НТР в высоких концентрациях – 1-2 мМ - вызывала задержку развития, ингибирование роста и повышенную гибель клеток у ранних эмбрионов без трофобластов (E2.5), а также у эмбрионов с поврежденными трофобластами и в ранних эмбрионидных телах, тогда как более поздние эмбрионы и эмбрионидные тела были более устойчивы за счет защиты внеэмбриональных тканей.

Напротив, действие 5-НТР в дозах ниже 1 мМ, не вызывало никаких нарушений развития в обеих моделях (рисунок 11). Данные результаты подтверждают, что используемые в наших экспериментах концентрации 5-НТР являются физиологичными и не приводят к токсическим эффектам во время развития, начиная с его самых ранних стадий.

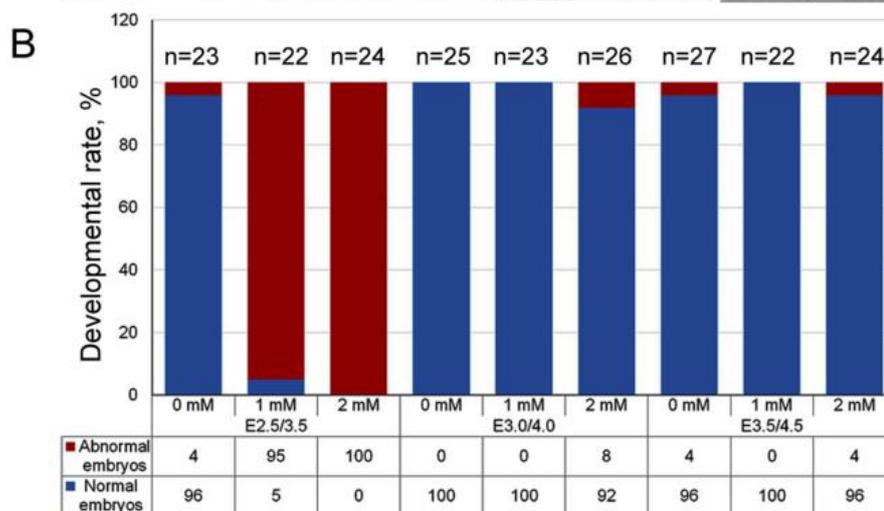
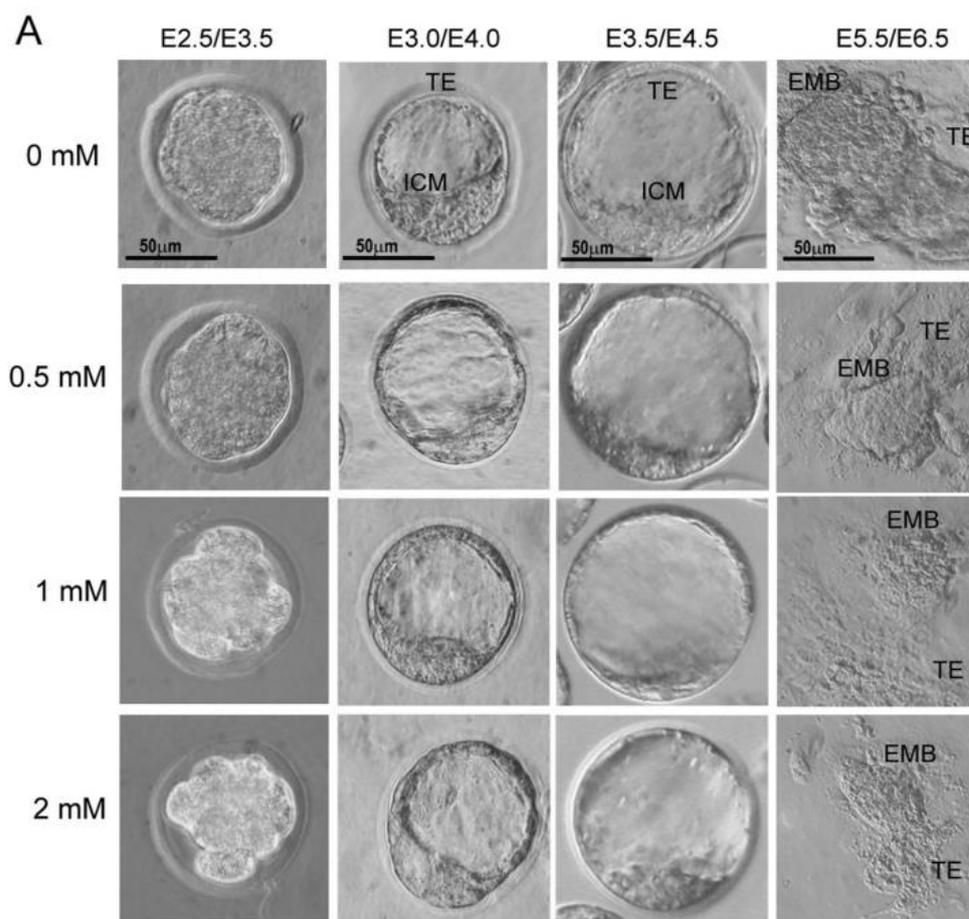


Рисунок 9 – Эффекты 5-НТР на развитие *in vitro* преимплантационных эмбрионов мышей А - морулы на стадии E2.5 и E3.0, бластоцисты E3.5 и прикрепленные эмбрионы E5.5, обработанные 0,5, 1 и 2 мМ 5-НТР. Морфологические изменения, жизнеспособность и отклонения в развитии через 24 ч воздействия 5-НТР. TE трофоэктодерма, внутренняя ICM клеточная масса, эмбриобласт EMB. В- количественный анализ развития эмбрионов на E2,5. Стадии E3.0 и E3.5 после воздействия 5-НТР. Процент (%) нормального и ненормального развития оценивали в каждой экспериментальной группе. (n)- общее число проанализированных эмбрионов.

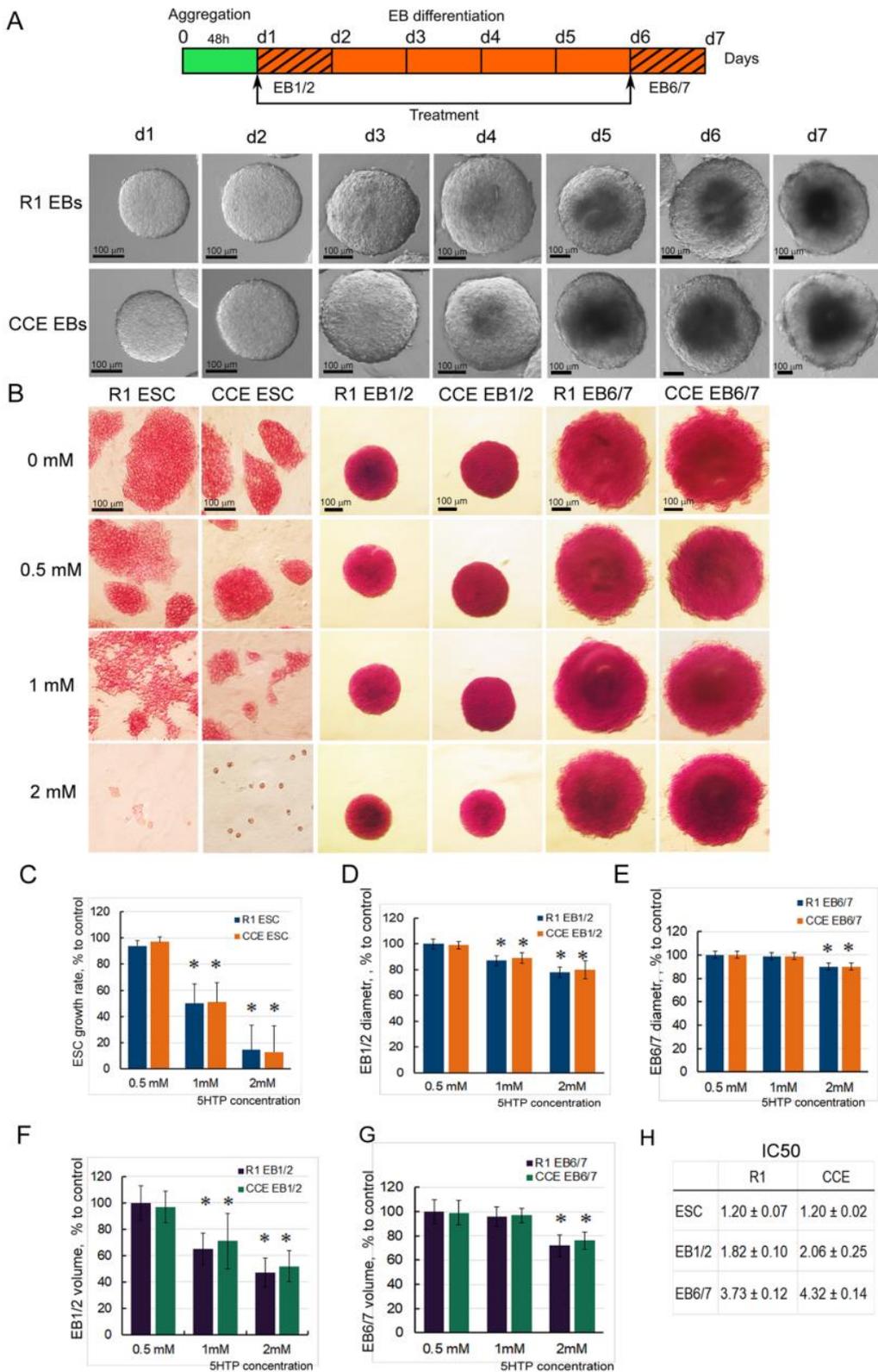


Рисунок 10 – Действие 5-НТР (0,5–2 мМ) на дифференцировку эмбрионных тел в трехмерной (3D) культуре *in vitro*

А - оценка токсичности 5-НТР на развитие на рост эмбрионных тел в условиях 3D-культивирования в течение 7 дней. В - морфологические изменения, активность алкалинфосфатазы и рост клеток после воздействия 5-НТР (0,5, 1 и 2 мМ) в течение 24 часов. Высокая активность алкалинфосфатазы обнаружена у плюрипотентных клеток в

необработанных и обработанных колониях; однако рост всех колоний снижался после обработки 5-НТР. С – G - зависимое от концентрации ингибирование роста клеток было обнаружено для обеих линий эмбрионов мышей и их эмбрионидных тел после 24 ч инкубации в 5-НТР. С - изменения в группах после воздействия разных концентраций 5-НТР (0,5, 1 и 2 мМ) относительно контрольной группы. D – G - изменение диаметров (D, E) и объема (E, G), разных конгломератов после обработки 0,5, 1 и 2 мМ 5-НТР относительно контрольных групп. Данные представлены в виде средних значений \pm SD, * $p < 0,05$, ANOVA. H - рассчитанное среднее значение IC 50 5-НТР для разных конгломератов. Данные представлены в виде средних значений \pm SEM.

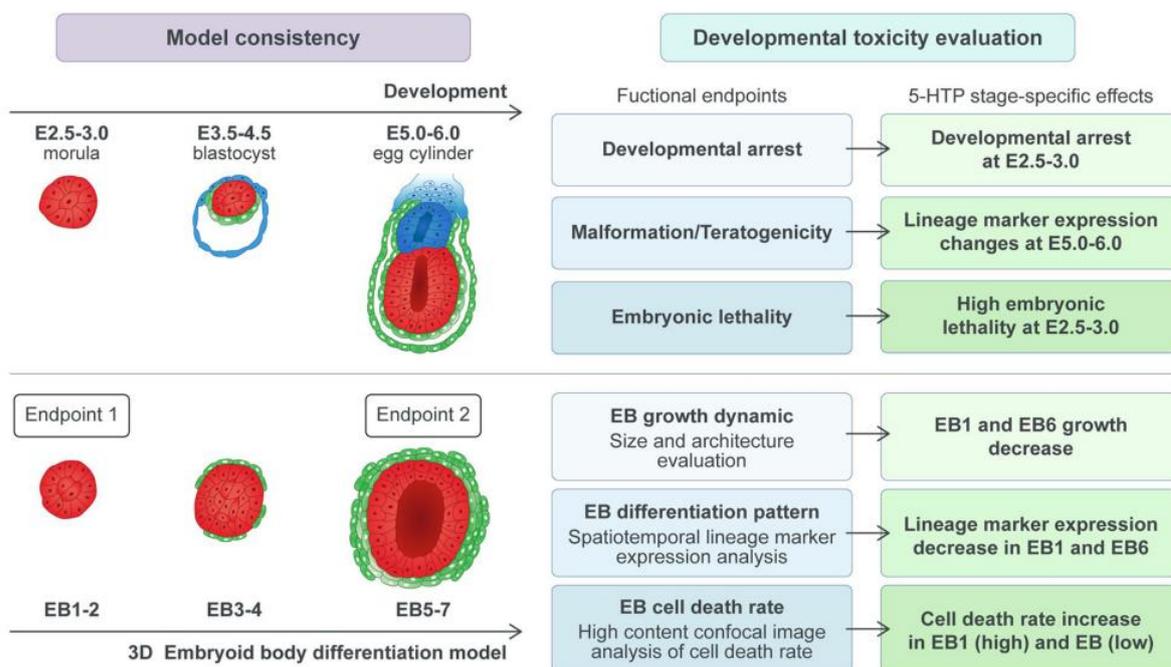
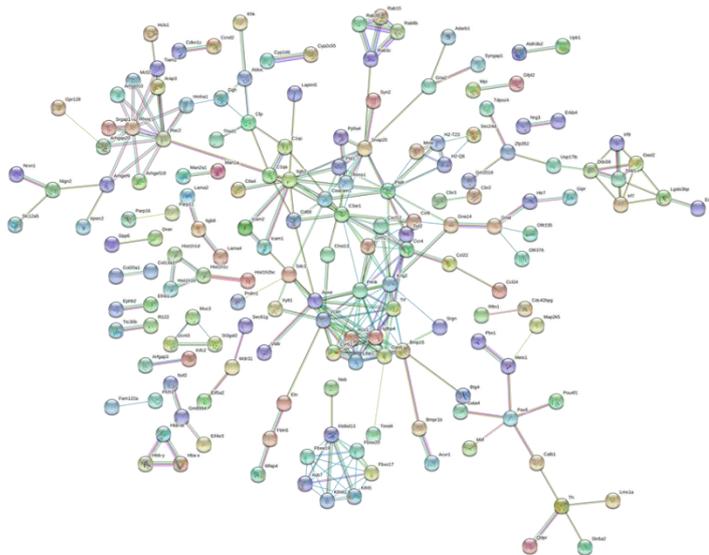


Рисунок 11 – Сравнение действия различных концентраций предшественника серотонина – 5-НТР – на раннее развитие эмбриона мыши и формирование эмбрионидных тел в 3D-культуре *in vitro*

Мы использовали эти данные для проведения эксперимента по анализу действия 5-НТР (в физиологических концентрациях) на экспрессию генов в бластоцистах мыши при действии 5-НТР на предимплантационных стадиях развития (рисунок 12).



Developmental protein
 Serine/threonine-protein kinase
 Inorganic anion transport
 Tissue homeostasis
 Specification of symmetry
 Synapse
 Zinc finger protein
 Etc.

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ 600 БЛАСТОЦИСТ НА СТАДИИ Е3, 5 ВЫЯВИЛ 245 ГЕНОВ, НА ЭКСПРЕССИЮ КОТОРЫХ ВЛИЯЕТ СЕРТОНИН

Рисунок 12 - Результаты транскриптомного анализа бластоцист мышей после повышения уровня серотонина в организме матери на предимплантационной стадии развития

Результаты транскриптомного анализа, полученные в нашей лаборатории, показывают, что модуляция уровня материнского серотонина на самых ранних стадиях развития млекопитающих способна оказывать значимое влияние на уровень экспрессии большого количества генов в бластоцистах мышей, вовлеченных в процессы миграция, клеточной адгезии, ионного транспорта [8]. Все перечисленные выше факты позволяют говорить о мономинах, и, в первую очередь, о серотонине, как о значимых эпигенетических факторах в процессе развития. При этом конкретный эффект действия определяется стадией развития эмбриона, моментом дифференцировки определенных структур и экспрессией рецепторов и транспортеров моноаминов на специфических клетках.

2.4 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Walther D.J., Peter J.U., Winter S., Holtje M., Paulmann N., Grohmann M., Vowinckel J., Alamo-Bethencourt V., Wilhelm C.S., Ahnert-Hilger G., Bader M. Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release // *Cell*. – 2003b. – Vol. 115, N 7. – P. 851–862.
2. Walther D.J., Stahlberg S., Vowinckel J. Novel roles for biogenic monoamines: from monoamines in transglutaminase-mediated post-translational protein modification to monoaminylation deregulation diseases // *FEBS J*. – 2011. – Vol. 278, N 24. – P. 4740–4755.
3. Duerschmied D, Bode C. The role of serotonin in haemostasis // *Hamostaseologie*. – 2009. – Vol. 29. – No 4. – P. 356-359.
4. Paulmann N., Grohmann M., Voigt J.P., Bert B., Vowinckel J., Bader M., Skelin M., Jevsek M., Fink H., Rupnik M., Walther D. J. Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation // *PLoS Biol*. – 2009. – Vol. 7. – No 10. – P. e1000229.
5. Sakharov D. A. Integrative function of serotonin common to distantly related invertebrate animals. *Early Brain*. Ed. Gustafsson M. Reuter M. – Abo: Abo Akademi Press. – 1990. – 73-88 pp.
6. Сахаров Д.А. Множественность нейротрансмиттеров: функциональное значение // *Журн. эвол. биохим. физиол.* – 1990. – Т. 26. – С. 733-740.
7. Сахаров Д.А. Биологический субстрат генерации поведенческих актов // *Ж. общ. биол.* – 2012. – Т. 73. – No 5. – С. 334-348.
8. Воронежская Е.Е., Мельникова В.И., Ивашкин Е.Г. Моноамины как адаптивные регуляторы развития: феномен и механизмы действия // *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. – 2021. – Т. 71. – No 3. – С. 295-305. DOI: 10.31857/S0044467721030126.
9. Amireault P., Dubé F. Serotonin and its Antidepressant-Sensitive Transport in Mouse Cumulus-Oocyte Complexes and Early Embryos // *Biol. Reprod.* – 2005. – Vol. 73. – P. 358–365.
10. Dubé F., Amireault P. Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos // *Life Sci.* – 2007. – Vol. 81. – P. 1627–1637. doi:10.1016/j.lfs.2007.09.034.
11. Никишин Д.А., Алешина Н.М., Шмуклер Ю.Б. Синтез и мембранный транспорт серотонина в развивающемся овариальном фолликуле мыши // *ДАН*. – 2018. – Т. 478. – No 1. – С. 103-106.

12. 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. – Vol. 472. – P. 347-350.
13. Bonnin A., Levitt P. Fetal, maternal and placental sources of serotonin and new implications for developmental programming of the brain // *Neuroscience*. – 2011. – Vol. 197. – P. 1-7.
14. St-Pierre J., Laurent L., King S., Vaillancourt C. Effects of prenatal maternal stress on serotonin and fetal development // *Placenta*. – 2016. – Vol. 48. – No 1. – P. S66-S71.
15. Chen H.J., Antonson A.M., Rajasekera T.A., Patterson J.M., Bailey M.T., Gur T.L. Prenatal stress causes intrauterine inflammation and serotonergic dysfunction, and long-term behavioral deficits through microbe- and CCL2-dependent mechanisms // *Transl. Psychiatry*. – 2020. – Vol. 10. – No 1. – P. 191.
16. Vitalis T., Ansorge M.S., Dayer A.G. Serotonin homeostasis and serotonin receptors as actors of cortical construction: special attention to the 5-HT3A and 5-HT6 receptor subtypes // *Front. Cell. Neurosci.* – 2013. – Vol. 7. – P. 93.
17. Gordeeva O., Gordeev A. Comparative assessment of toxic responses in 3D embryoid body differentiation model and mouse early embryos treated with 5-hydroxytryptophan // *Archives of Toxicology*. – 2021. – Vol. 95. – Is. 1. – P. 253-269. DOI: 10.1007/s00204-020-02909-w.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Задачи этапа 2021 г темы НИР решены полностью.

Обобщены данные по модулирующей роли серотонина на разных стадиях жизненного цикла у модельных пресноводных моллюсков. Показано, что на ранних стадиях развития задействованы как классические механизмы действия серотонина через мембранные рецепторы, так и неканонический внутриклеточный путь реализации эффектов серотонина – через посттрансляционную модификацию внутриклеточных белков. На стадии формирования нервных клеток эффект действия серотонина реализуется по классическому рецепторному механизму – через активацию мембранных рецепторов и связанных G-белков. Модификация внутриклеточных белков на стадиях дробления лежит в основе долговременных отложенных эффектов серотонина в процессе развития. Модуляция уровня серотонина в организме матери зависит от сезонных факторов и функционального состояния в конкретный период. Таким образом, серотонин служит связующим звеном между внешними факторами, воздействующими на организм матери, и эпигенетическими изменениями в программах развития и поведения потомков. Сочетание различных серотонин-зависимых механизмов в процессе развития лежит в основе соответствующего адаптивного выбора жизненной стратегии потомства, что обеспечивает репродуктивный успех популяции

Впервые показано наличие ненейрональных моноамин-содержащих структур в ассоциации с подвижной ресничкой (жгутиком) у представителей древнейших многоклеточных – губок. Наличие таких структур в тесной ассоциации с аппаратом Гольджи, позволяет предположить важное физиологическое значение внутриклеточных моноаминов в функционировании локомоторной реснички. Показано, что реснички прототроха у полихет архианнелид формируют сложную структуру, обеспечивающую захват пищевых частиц как у личинок, так и у взрослых особей. Эксперименты на развивающихся зародышах морских ежей подтвердили важность наличия 4-метоксифенильного фрагмента в молекуле диарилпирролдкарбоксамидов для проявления антимитотического действия. Выявленный антимитогенный эффект синтезированных химических соединений указывает на их перспективность для дальнейшей оптимизации при разработке новых химиотерапевтических лекарственных средств.

Отработанный нами метод повышения уровня серотонина с помощью инкубации или перорального введения его биохимического предшественника – 5-НТР – не является токсичным для развития ранних эмбрионов позвоночных в пределах физиологических концентраций. Повышение уровня серотонина на предимплантационных стадиях развития приводит к изменению экспрессии генов в бластоцистах мышей, вовлеченных в

процессы миграция, клеточной адгезии, ионного транспорта. Все перечисленные выше факты позволяют говорить о моноaminaх, и в первую очередь, о серотонине, как о значимых эпигенетических факторах в процессе развития. При этом конкретный эффект действия определяется стадией развития эмбриона, моментом дифференцировки определенных структур и экспрессией рецепторов и транспортеров моноаминов на специфических клетках.

Таким образом, активация разных мембранных рецепторов, повышение внутриклеточного уровня серотонина (моноаминов) за счет работы транспортеров, моноаминилирование структурных и регуляторных белков, зависимость уровня моноаминов матери и плода от внешних факторов – совокупность и взаимосвязь этих механизмов создает молекулярно-биохимическую основу для формирования адаптивной пластичности в процессе развития. Можно считать, что в настоящее время открывается новая страница в исследовании эффектов моноаминов. Становится понятным в каком месте искать механизмы, лежащие в основе их отставленных долговременных эффектов, которые невозможно было объяснить, основываясь только на их классическом рецепторном действии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ

1. **Воронежская Е.Е.¹, Мельникова В.И.¹, Ивашкин Е.Г.³** Моноамины как адаптивные регуляторы развития: феномен и механизмы действия//Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2021. Т. 71. № 3. С. 295-305. DOI: 10.31857/S0044467721030126. – R. – **Voronezhskaya E.E.¹, Melnikova V.I.¹, Ivashkin E.G.³** Monoamines as Adaptive Developmental Regulators: Phenomenon and Mechanisms of Action//Zhurnal Vysshei Nervnoi Deyatelnosti Imeni I P Pavlova. 2021. Vol. 71. Is. 3. P. 295-305. DOI: 10.31857/S0044467721030126. – Q4.
2. Сильянова Е.А., Самет А.В., **Семенова М.Н.¹**, Семенов В.В. Синтез и антипролиферативные свойства 3,4-диарилпиррол-2-карбоксамидов//Известия Академии наук. Серия химическая. 2021. № 3. С. 498-509. – R. – Silyanova, E.A., Samet, A.V., **Semenova M.N.¹**, Semenov V.V. Synthesis and antiproliferative properties of 3,4-diarylpyrrole-2-carboxamides//Russian Chemical Bulletin. 2021. Vol. 70. Is. 3. P. 498-509. DOI: 10.1007/s11172-021-3115-5. – Q4.
3. **Gordeeva O.¹**, Gordeev A. Comparative assessment of toxic responses in 3D embryoid body differentiation model and mouse early embryos treated with 5-hydroxytryptophan // Archives of Toxicology. – 2021. – Vol. 95. – Is. 1. – P. 253-269. DOI: 10.1007/s00204-020-02909-w. – Q1
4. **Sokolova A.M.¹**, Aksenova O.V., Bepalaya Y.V., Gofarov M.Y., Kondakov A.V., Konopleva E.S., Tomilova A.A., Travina O.V., Tanmuangpak K., Tumpeesuwan S., Vikhrev I.V., Bolotov I.N. Integrative taxonomy and biogeographic affinities of the first freshwater sponge and mollusc association discovered in tropical Asia // Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. – 2021. DOI 10.1111/jzs.12504. – Q1
5. **Sokolova A.M.¹**, Palatov D.M., Masuda Y., Itskovich V.B., "Investigation of the spongillid *Spongilla alba* Carter, 1849 reveals a new group of brackish-water sponges // Systematics and Biodiversity. – 2021. DOI: 10.1080/2f14772000.2021.1958948. – Q2
6. **Sokolova A.M.¹, Voronezhskaya E.E.¹** Dopamine-like immunoreactivity in sponge larvae // Invertebrate Zoology. – 2021. – Vol. 18. – Is. 3. – P 345-354. DOI 10.15298/invertzool.18.3.08. – S
7. **Fofanova E.G.¹, Voronezhskaya E.E.¹** Ciliary bands in the prostomium region of *Dimorphilus gyrotilatus* (Annelida: Dinophiliformia) and their involvement in food uptake // Invertebrate Zoology. – 2021. – Vol. 18. – Is. 3. – P. 223-239. DOI:10.15298/invertzool.18.3.03. – S.

8. **Voronezhskaya E.E.**1 Maternal Serotonin: Shaping Developmental Patterns and Behavioral Strategy on Progeny in Molluscs // *Frontiers in Ecology and Evolution*. – 2021. – Vol. 9. – Art. no 739787. DOI: 10.3389/fevo.2021.739787. – Q1

Отчет по теме утвержден решением Ученого совета ИБР РАН «28» декабря 2021 г.,
Протокол № 14.