

ЛОКАЛИЗАЦИЯ СЕРТОНИНА И ЕГО МЕМБРАННОГО ТРАНСПОРТЕРА В ЯИЧНИКЕ МЫШИ¹

LOCALIZATION OF SEROTONIN AND ITS MEMBRANE TRANSPORTER IN THE MOUSE OVARIES

**D. Nikishin
N. Alyoshina
M. Semenova
Yu. Shmukler**

Summary. Serotonin uptake by the membrane transporter Sert is a possible mechanism for the accumulation of the transmitter in oocytes and ovarian tissues. Serotonin is localized in developing ovarian follicles, and in a larger concentration is contained in oocytes. The content of the transmitter increases with the preliminary subcutaneous administration of exogenous serotonin. The expression of serotonin transporter Sert mRNA is detected in ovarian follicles, especially in granulosa cells. Sert represented in cells of the developing ovarian follicle, and detected in the oocytes to a greater extent. The obtained results indicate the presence and functional activity of the serotonin transporter in developing ovarian follicles.

Keywords: ovary, ovarian follicle, oocyte, serotonin, serotonin transporter, Sert.

Никишин Денис Александрович

К.б.н, н.с., Институт биологии развития
им. Н. К. Кольцова РАН; Московский государственный
университет имени М. В. Ломоносова
denisnikishin@gmail.com

Алёшина Нина Максимовна

Московский государственный университет имени
М. В. Ломоносова

Семенова Мария Львовна

Д.б.н., профессор, Московский государственный
университет имени М. В. Ломоносова

Шмуклер Юрий Борисович

Д.б.н., в.н.с., Институт биологии развития
им. Н. К. Кольцова РАН

Аннотация. Захват серотонина с помощью мембранного транспортера Sert является возможным механизмом накопления трансммиттера в ооцитах и тканях яичника. Выявлено, что серотонин локализован в развивающихся овариальных фолликулах, и в большей концентрации содержится в ооцитах. Содержание трансммиттера увеличивается при предварительном подкожном введении экзогенного серотонина. Экспрессия мРНК транспортера серотонина Sert выявляется в овариальных фолликулах, особенно в клетках гранулезы. Sert представлен в клетках развивающихся овариальных фолликулов, в большей степени выявляясь в ооцитах. Полученные результаты указывают на наличие и функциональную активность транспортера серотонина в развивающихся овариальных фолликулах.

Ключевые слова: яичник, овариальный фолликул, ооцит, серотонин, транспортер серотонина, Sert.

Введение

Серотонин, наряду с другими классическими нейротрансммиттерами, является универсальным сигнальным веществом, контролирующим процессы развития [1, 2]. Участие серотонина в регуляции процессов роста и созревания женских половых клеток показано для широкого ряда животных, в том числе млекопитающих [3], и, по всей видимости, является одной из его консервативных функций. В яичнике млекопитающих серотонин определяется в физиологических концентрациях, в частности, в ооцитах, клетках кумулюса [4] и в фолликулярной жидкости [5]. На различных моделях показано, что серотонин обладает стимулирующим действием на функцию фолликулярных клеток [6, 7, 8].

Потенциальными источниками экзогенного по отношению к овариальному фолликулу серотонина являются тромбоциты кровяного русла, тучные клетки, локализующиеся в строме яичника, а также немногочисленные нервные волокна, сопровождающие крупные медуллярные сосуды [9]. Не исключен и синтез серотонина в самом яичнике [10], однако прямыми методами он не показан. Одним из вероятных механизмов накопления серотонина в тканях яичника является его захват из межклеточной среды с помощью специфического мембранного транспортера *Sert* (*Slc6a4*). Известно, что этот транспортер экспрессируется и обладает специфической активностью в зрелых ооцитах, доимплантационных эмбрионах и клетках кумулюса [4]. Однако пока неизвестно, в каких конкретно клеточных

¹ Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП ИБР им. Н. К. Кольцова РАН, при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-34-60250 мол_а_дк и гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК-1304.2017.4.

компонентах яичника экспрессируется транспортер серотонина и активен ли он на ранних стадиях оогенеза. Тем не менее, существуют литературные данные о возможной роли мембранного транспорта серотонина в регуляции функциональной активности яичника. Так, у самок костистой рыбы *Danio rerio* ингибитор обратного захвата серотонина флуоксетин приводит к уменьшению количества икры и содержания эстрадиола в яичниках, а также к снижению уровня экспрессии мРНК овариальной ароматазы и рецепторов к гонадотропным гормонам [11], аналогичные данные получены на млекопитающих [12]. Более того, у мышей, нокаутных по гену *Sert*, угнетена экспрессия ароматазы и, как следствие, уменьшается содержание эстрадиола в крови [13]. Приведенные данные, однако, не отвечают на вопрос, каким образом реализуются эти эффекты — непосредственно путем прямого воздействия на яичник или косвенно через мозг и гипоталамо-гипофизарную систему.

Целью настоящей работы стало исследование экспрессии и функциональной активности мембранного транспортера серотонина *Sert* в яичнике мыши.

Материал и методика

В работе использовали мышей-гибридов F1 линий C57BL/6J и CBA/J. Работу проводили с использованием стандартных методик [14] и с соблюдением правил проведения работ с использованием экспериментальных животных. Для исследования функциональной активности мембранного транспорта серотонина мышам ежедневно в течение 5 дней подкожно вводили серотонин (Sigma Aldrich, 25 мг/кг). Яичники фиксировали в 4% параформальдегиде, после чего получали криосрезы толщиной 10 мкм. Процедуру гибридизации *in situ* проводили согласно опубликованному протоколу [15]. Смысловой и антисмысловой РНК-зонды, меченые дигоксигенином, синтезировали путем транскрипции *in vitro* с помощью набора HiScribe™ T7 (New England Biolabs). В качестве матрицы использовали линейаризованную плазмиду pAL2-T (Евроген), в которую был клонирован продукт ПЦР (1033 пн), полученный с помощью следующих праймеров: прямой 5'-GGGATGAAGCGCCACACTCTACG-3' и обратный 5'-TCTTTGGCCACCTCGGACACG-3'. Иммуногистохимическое окрашивание криосрезов проводили поликлональными антителами кролика против серотонина (AB938 Milipore) или против *Sert* (ab174770 Abcam), и вторичными антителами козы против иммуноглобулинов кролика, конъюгированными с дальним красным флуорофором Alexa Fluor® 647 (ab150079 Abcam). Препараты просматривали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica SP5.

Результаты и обсуждение

В ходе процесса оогенеза происходит не только рост и созревание яйцеклетки, но и подготовка к дальнейшему эмбриональному развитию. Интересным фактом является накопление в яйцеклетках большинства животных низкомолекулярных сигнальных молекул, участвующих в процессе нейротрансмиссии — серотонина и других моноаминергических трансмисмиттеров (дофамина и норадреналина). Их регуляторная роль в раннем эмбриональном развитии хорошо известна [2], но изучена далеко не полно. Показано, что серотонин, накапливающийся в яйцеклетках и функционально активный на ранних стадиях эмбрионального развития, является материнским по происхождению [16]. Следует предполагать, что для накопления серотонина в яйцеклетках происходит за счет активности системы мембранного транспорта в ооцитах и окружающих его фолликулярных клетках.

При иммуногистохимическом окрашивании криосрезов яичника мыши антителами против серотонина было выявлено, что трансмисмиттер локализуется в овариальных фолликулах — как в ооцитах, так и в окружающих его клетках гранулезы и теки (Рис. 1 А). Иммунореакция против серотонина также выявляется в строме яичника — в кровеносных сосудах и тучных клетках. При предварительном введении серотонина подкожно в течение пяти дней наблюдается увеличение степени иммунореактивности, но локализация серотонина при этом остается неизменной. Таким образом, мембранный транспорт серотонина активен в яичнике и локализуется в развивающихся овариальных фолликулах. Специфичность иммуногистохимического окрашивания подтверждается отсутствием выраженного сигнала в клетках яичника при исключении из процедуры окрашивания первичных антител (Рис. 1 Г).

Экспрессия и активность мембранного транспортера серотонина ранее показана для зрелых ооцитов и клеток кумулюса млекопитающих [4]. Мы провели исследование экспрессии транспортера *Sert* в яичнике на более ранних этапах оогенеза. Для подтверждения наличия экспрессии мРНК мембранного транспортера серотонина в яичнике была проведена гибридизация *in situ*. Позитивная реакция выявляется как в овариальных фолликулах на всех стадиях фолликулярного роста, так и в желтых телах (Рис. 1 Б). Интересно, что в пределах фолликула интенсивность реакции больше в клетках гранулезы, но гораздо менее выражена в ооцитах и клетках теки. Контрольная гибридизация, проведенная со смысловым зондом, подтвердила специфичность реакции (Рис. 1 Д). Иммуногистохимическое окрашивание антителами против *Sert* выявило, что транспортер локализуется в овариальных фолликулах, причем в гораздо

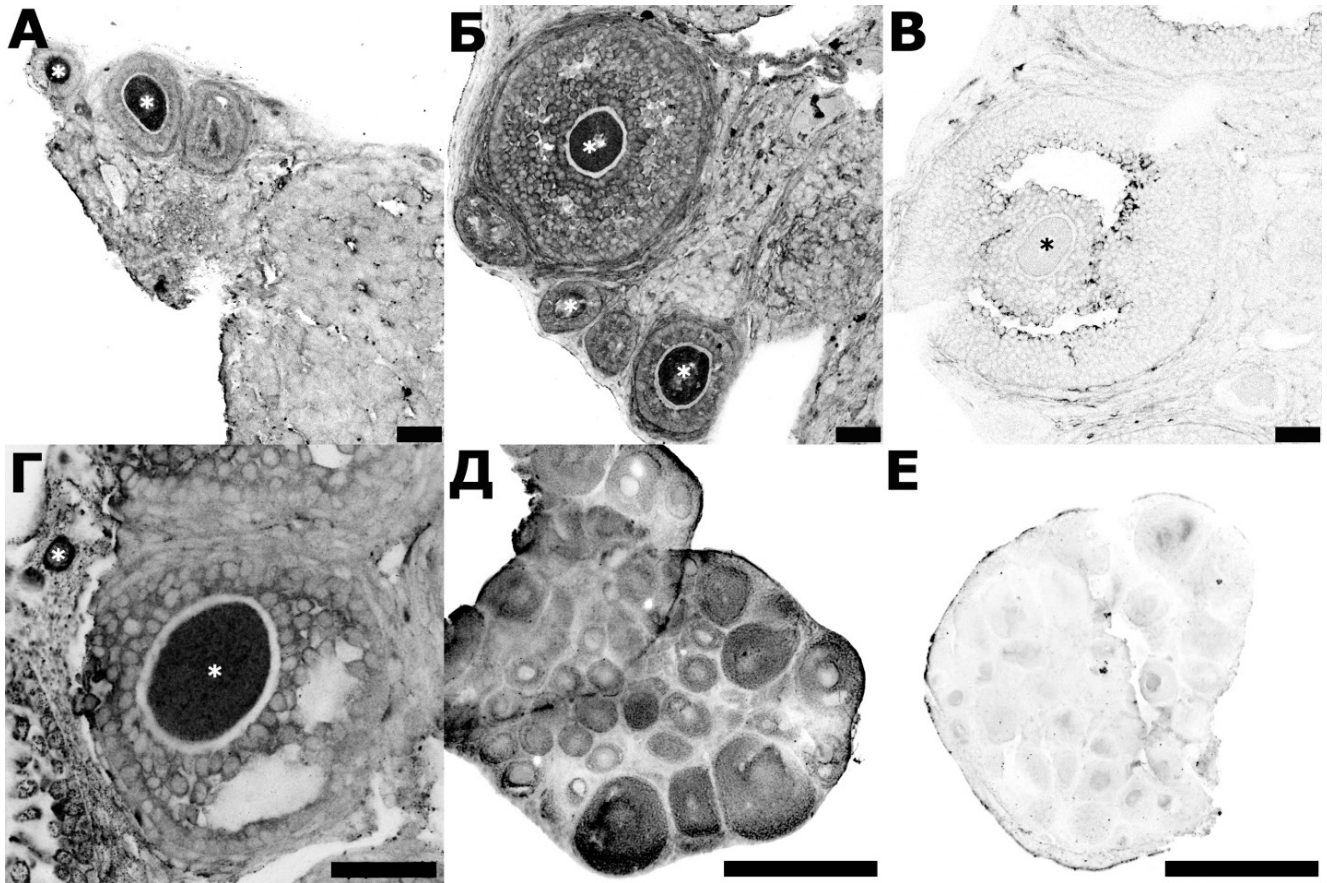


Рис 1. Серотонин и его мембранный транспортер Sert в яичнике мыши. А-Б — иммуноокрашивание серотонина в нативном яичнике (А) и в яичнике самки после 5-дневного системного введения серотонина (Б); В — негативный контроль иммуногистохимического окрашивания без первичных антител; Г — иммуноокрашивание мембранного транспортера серотонина Sert; Д — выявление экспрессии мРНК Sert в яичнике методом гибридизации *in situ*; Е — негативный контроль гибридизации *in situ* с использованием смыслового зонда. * — ооциты. Масштабный отрезок: А-Г — 50 мкм; Д-Е — 500 мкм.

большей степени иммунореактивность представлена в ооцитах (Рис. 1 В). Иммунореактивность наблюдается как в растущих ооцитах, так и в ооцитах примордиальных фолликулов, находящихся в состоянии блока мейоза. Контрольное окрашивание без первичных антител подтвердило специфичность иммунореакции (Рис. 1 Е).

Полученные результаты демонстрируют, что в овариальных фолликулах выявляется как мРНК транспортера серотонина, так и сам мембранный белок, а также его функциональная активность. Несмотря на то, что мРНК транспортера в большей степени выявляется в клетках

гранулезы, белок и его активность выявляются на более высоком уровне в ооцитах. По всей вероятности, в данном случае имеет место регуляция экспрессии этого гена на уровне трансляции. Полученные результаты указывают на наличие и функциональную активность транспортера серотонина в развивающихся овариальных фолликулах и позволяют предполагать, что его регуляторная роль появляется уже на самых ранних этапах оо- и фолликулогенеза. Это представляет особый интерес в связи с потенциальным влиянием широко распространенных антидепрессантов из ряда ингибиторов обратного захвата серотонина на репродуктивную функцию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бузников Г. А. Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития. М.: Наука; 1967.
2. Бузников Г. А. Донервные транмиттеры как регуляторы эмбриогенеза. Современное состояние проблемы. Онтогенез. 2007;38(4):262–270.

3. Sheng Y., Wang L., Liu X. S.J.S., et al. A serotonin receptor antagonist induces oocyte maturation in both frogs and mice: evidence that the same G protein-coupled receptor is responsible for maintaining meiosis arrest in both species. *J Cell Physiol.* 2005;202(3):777–786.
4. Amireault P., Dubé F. Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos. *Biol Reprod.* 2005;73(2):358–365.
5. Bòdis J., Bognàr Z., Hartmann G., Török A., Csaba I. F. Measurement of noradrenaline, dopamine and serotonin contents in follicular fluid of human graafian follicles after superovulation treatment. *Gynecol Obstet Invest.* 1992;33(3):165–167.
6. Tanaka E., Baba N., Toshida K., Suzuki K. Serotonin stimulates steroidogenesis in rat preovulatory follicles: involvement of 5-HT₂ receptor. *Life Sci.* 1993;53(7):563–570.
7. Koppan M., Bodis J., Verzar Z., Tinneberg H.-R., Torok A. Serotonin may alter the pattern of gonadotropin-induced progesterone release of human granulosa cells in superfusion system. *Endocrine.* 2004;24(2):155–159.
8. Graveleau C., Paust H. J., Schmidt-Grimminger D., Mukhopadhyay A. K. Presence of a 5-HT₇ receptor positively coupled to adenylate cyclase activation in human granulosa-lutein cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(3):1277–1286.
9. 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. *Anat Rec.* 1992;233(3):478–484.
10. Dubé F., Amireault P. Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos. *Life Sci.* 2007;81(25–26):1627–1637.
11. 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. *Aquat Toxicol.* 2009;95(4):320–329.
12. Moore C.J., DeLong N.E., Chan K.A., Holloway A.C., Petrik J.J., Sloboda D.M. Perinatal Administration of a Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Induces Impairments in Reproductive Function and Follicular Dynamics in Female Rat Offspring. *Reprod Sci.* 2015;22(10):1297–1311.
13. Zha W., Ho H.T.B., Hu T., Hebert M. F., Wang J. Serotonin transporter deficiency drives estrogen-dependent obesity and glucose intolerance. *Sci Rep.* 2017;7(1):1137.
14. Дыбан А.П., Пучков В.Ф., Баранов В.С., Самошкина Н.А., Чеботарь Н.А. Лабораторные млекопитающие: мышь *Mus musculus*, крыса *Rattus norvegicus*, кролик *Oryctolagus cuniculus*, хомячок *Cricetus griseus*. In: *Объекты Биологии Развития.* М.: Наука; 1975:505–566.
15. Braissant O., Wahli W. A Simplified In Situ Hybridization Protocol Using Non-radioactively Labeled Probes to Detect Abundant and Rare mRNAs on Tissue Sections. *Biochemica.* 1998;1(1):10–16.
16. Côté F., Fligny C., Bayard E., et al. Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(1):329–334.

© Никишин Денис Александрович (denisnikishin@gmail.com), Алёшина Нина Максимовна,
Семенова Мария Львовна, Шмуклер Юрий Борисович.
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Главное здание МГУ им. М.В. Ломоносова