
ОРИГИНАЛЬНЫЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 57.017.642, 57.05

Статья посвящена 120-летию
со дня рождения выдающегося российского генетика,
академика Бориса Львовича Астаурова

ВСЕ ТРАНСМИТТЕРЫ В ОДНОЙ ЯЙЦЕКЛЕТКЕ: ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТРАНСМИТТЕРНЫХ СИСТЕМ

© 2025 г. Ю. Б. Шмуклер^{a, *}, Н. М. Алешина^a, Ю. О. Никишина^a, В. С. Фролова^b,
Д. А. Никишин^{a, b}

^a Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва

^b Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,
биологический факультет, кафедра эмбриологии, Москва

*e-mail: yurishmukler@yahoo.com

Поступила в редакцию 06.02.2025 г.

После доработки 21.02.2025 г.

Принято к публикации 29.02.2025 г.

В статье рассматривается вопрос о потенциальном компонентном составе донервных трансмиссивных систем в клетках доимплантационных эмбрионов млекопитающих. Ряд классических нейротрансмиссивов проявляют функциональную активность на ранних этапах развития многоклеточных организмов, включая млекопитающих. Мы провели анализ экспрессии ключевых компонентов нейротрансмиссивных систем на ранних стадиях развития мыши, используя доступные данные, полученные с применением технологии секвенирования нового поколения и транскриптомики. Результаты указывают на наличие у ооцитов и эмбрионов рецепторов и других компонентов ряда трансмиссивных систем, включая серотонинергическую, дофаминергическую, адренергическую, холинергическую, ГАМК-ергическую и глутаматную, а также гистаминовую. Обнаруженное многообразие предполагает возможность конвергенции различных трансмиссивных систем в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки и морфогенеза на уровне общих конечных звеньев внутриклеточных сигнальных каскадов и эффекторов. Данные результаты открывают новые перспективы для дальнейших исследований взаимодействий между различными трансмиссивами и их ролью в регуляции клеточной дифференцировки и морфогенеза.

Ключевые слова: ооцит, эмбрион, транскриптом, нейротрансмиссив, рецептор, транспортер, серотонин, дофамин, адреналин, ацетилхолин, ГАМК, глутамат, гистамин

DOI: 10.31857/S0475145025010019, **EDN:** KVHGQD

ВВЕДЕНИЕ

Представления о функциях нейротрансмиссивов значительно эволюционировали с момента их открытия как межклеточных передатчиков в нервной системе (Loewi, 1921). Изначально считалось, что они играют роль исключительно в передаче сигналов между нейронами, однако последующие исследования показали их присутствие и функциональную значимость в безнервных организмах, включая бактерии и одноклеточные эукариоты (см. Shmukler, Nikishin, 2022). Более того, нейротрансмиссивы были обнаружены в процессах оогенеза и эмбриогенеза на донервных стадиях развития многоклеточных

организмов, что свидетельствует о более широкой роли этих молекул в биологических системах.

Установление множественности эмбриональных трансмиссивов на уровне единственной эмбриональной клетки стало важным этапом в понимании сложности раннего эмбриогенеза (Buznikov, 1990). Такая множественность сопровождается разнообразием их функций, которые могут реализовываться как одновременно, так и последовательно в ходе ранних стадий развития. К таким функциям относятся запуск и регуляция клеточного цикла, контроль сократительного аппарата клетки, а также участие

в процессах межбластомерных взаимодействий, которые являются ключевыми для корректного формирования зародыша (Shmukler, Nikishin, 2012). Эти данные указывают на то, что нейротрансмиттеры выполняют регуляторные функции не только в зрелой нервной системе, но и на самых ранних этапах развития многоклеточных организмов.

Дополнительным подтверждением роли нейротрансмиттеров в раннем эмбриогенезе стала демонстрация одновременной экспрессии мРНК нескольких типов серотониновых рецепторов в одноклеточном зародыше шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (Nikishin et al., 2012; Shmukler, Nikishin, 2012, 2018). Это наблюдение породило гипотезу о возможности одновременной экспрессии различных рецепторных белков к одному и тому же трансмиссеру в пределах одной клетки на ранних стадиях развития. Недавние исследования предоставили экспериментальное подтверждение этой гипотезы: иммунохимические методы выявили одновременную экспрессию белков 5-HT_{1D}- и 5-HT_{2B}-рецепторов в ранних эмбрионах мыши (Frolova et al., 2024). Это достижение раскрывает новый уровень сложности трансмиссерной регуляции в раннем эмбриогенезе.

Современные технологии секвенирования и анализа транскриптома предоставляют обширный и принципиально новый материал для понимания трансмиссерной регуляции онтогенеза и раннего эмбриогенеза. Анализ транскриптомных данных позволяет выявить трансмиссерные системы, мРНК которых экспрессируются на существенном уровне в эти критические периоды развития. Такие системы потенциально способны формировать функциональные комплексы, включающие рецепторы, которые могут влиять на различные процессы клеточной пролиферации, дифференцировки и морфогенеза.

В данной работе мы сосредоточились на идентификации и анализе трансмиссерных систем, активно экспрессирующихся в оогенезе и раннем эмбриогенезе мыши. Для определения компонентов трансмиссерных систем, вовлеченных в оогенез и ранние стадии эмбриогенеза, был проведен комплексный анализ транскриптомных данных, отражающих динамику экспрессии мРНК на разных стадиях доимплантационного развития мыши (Qiao et al., 2020). Мышь была выбрана в качестве модельного организма ввиду

своей высокой степени генетической и физиологической схожести с человеком, что позволяет максимально информативно оценить механизмы, действующие у млекопитающих.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализ трансмиссерных систем осуществлялся комплексно, что подразумевало выявление уровней транскриптов ферментов, ответственных за синтез и деградацию нейротрансмиттеров, а также специфических рецепторов и транспортеров, вовлеченных в передачу сигналов. Такой подход позволяет получить полное представление о функциональной активности каждой системы на различных этапах эмбрионального развития.

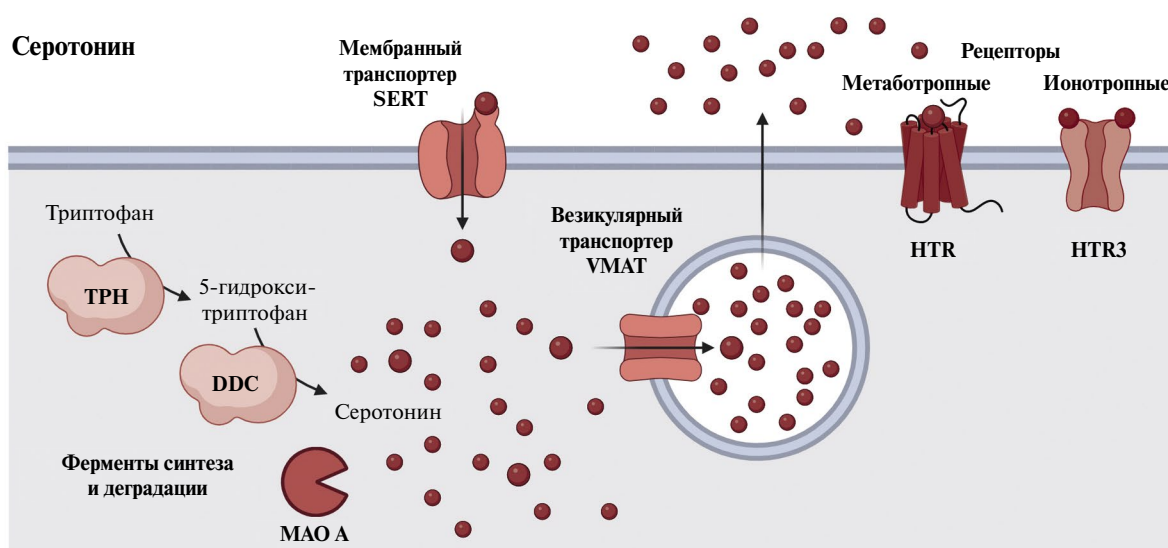
Для обеспечения достоверности результатов и определения существенного уровня экспрессии тех или иных компонентов трансмиссерных систем транскриптомные данные подвергались нормализации. В данном процессе использовался среднегеометрический коэффициент экспрессии пяти генов домашнего хозяйства (Geometric mean of the expression of Housekeeping Genes, GHG), включающих глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу *Gapdh*, орнитиндекарбоксилазу *Odc*, гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазу *Hprt*, ТАТА-связывающий белок *Tbp*, β -актин *Actb* и рибосомальный белок L4 *Rpl4*. Такой метод нормализации позволяет корректно учитывать вариации в общих уровнях экспрессии генов и обеспечивает сравнимость данных между различными образцами.

Определение порогового значения функционально значимого уровня экспрессии основано на работе Ту и соавторов (Tu et al., 2014), где был предложен порог в 300 транскриптов на эмбрион (ФРКМ ~ 5). Этот порог соответствует коэффициенту 0.003 после нормализации данных и служит нижним пределом для учета значимой экспрессии генов. Применение данного порога позволяет исключить фоновую шумовую активность и сфокусироваться на тех компонентах трансмиссерных систем, которые имеют биологическое значение в контексте изучаемых процессов. Примененный подход позволяет обоснованно выявить ключевые компоненты трансмиссерных систем, которые могут играть значительную роль в оогенезе и ранних стадиях эмбриогенеза мыши.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия компонентов серотонинергической системы широко представлена в ооцитах и ранних эмбрионах мыши (рис. 1). В ооцитах и до стадии четырехклеточного эмбриона наблюдается экспрессия мРНК триптофангидроксилазы *Tph2*, ключевого фермента первого этапа биохимической цепочки синтеза серотонина. В то же время уверенная экспрессия второго фермента, декарбоксилазы ароматических аминокислот *Ddc*, фиксируется лишь на стадии бластоцисты. Этот факт ставит под сомнение возможность синтеза серотонина на ранних этапах эмбрионального развития, до активации зи-

готического генома. При этом из 14 серотониновых рецепторов, идентифицированных у мыши, несколько экспрессируются уже в ооцитах и ранних эмбрионах, включая метаботропные рецепторы *Htr1d*, *Htr5a*, *Htr5b* и *Htr7*, а также субъединицу *Htr3a*, которая способна сформировать функционально активный канальный рецептор 5-НТ₃. Дополнительно наблюдается кратковременная экспрессия *Htr2b* на стадии четырехклеточного эмбриона. Это указывает на наличие рецепторных систем, чувствительных к серотонину, который может поступать из внешних источников до момента, когда эмбрион начнет самостоятельно его синтезировать. Уровень экспрессии мРНК серотониновых рецепторов



	Ооцит	Зигота	2 кл.	4 кл.	8 кл.	Бластоциста	Scale:
<i>Tph1</i> синтез	0.0000	0.0000	0.0024	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
<i>Tph2</i> синтез	0.0840	0.1080	0.0231	0.0032	0.0003	0.0001	0.1000
<i>Ddc</i> синтез	0.0000	0.0006	0.0103	0.0018	0.0013	0.0039	0.0600
<i>Maoa</i> д	0.0036	0.0049	0.0177	0.0037	0.0019	0.0119	0.0300
<i>Htr1a</i> рецепторы	0.0000	0.0000	0.0004	0.0000	0.0000	0.0000	0.0100
<i>Htr1d</i> рецепторы	0.0027	0.0043	0.0007	0.0002	0.0000	0.0006	0.0060
<i>Htr2b</i> рецепторы	0.0000	0.0000	0.0000	0.0032	0.0014	0.0015	0.0030
<i>Htr3a</i> рецепторы	0.0045	0.0037	0.0003	0.0000	0.0001	0.0001	0.0010
<i>Htr4</i> рецепторы	0.0002	0.0003	0.0003	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<i>Htr5a</i> рецепторы	0.0180	0.0224	0.0034	0.0002	0.0001	0.0000	
<i>Htr5b</i> рецепторы	0.0341	0.0225	0.0271	0.0220	0.0170	0.0141	
<i>Htr7</i> рецепторы	0.0085	0.0130	0.0029	0.0022	0.0005	0.0000	
<i>Slc6a4 (Sert)</i> мт	0.0058	0.0100	0.0079	0.0051	0.0039	0.0002	
<i>Slc18a1 (Vmat1)</i> вт	0.0280	0.0106	0.0325	0.0041	0.0138	0.0186	
<i>Slc18a2 (Vmat2)</i> вт	0.1915	0.0826	0.0515	0.0314	0.0042	0.0008	

Рис. 1. Компоненты серотонинергической системы и их экспрессия в раннем развитии мыши. Данные представлены в виде значений, нормированных на референсный коэффициент GHG. Обозначения в таблице: синтез — гены, кодирующие белки ферменты синтеза, д — деградации, рецептор — белков рецепторов к серотонину, мт — мембранный транспортер и вт — везикулярные транспортеры. Иллюстрация создана с помощью biorender.com.

варьируется в диапазоне от 0.003 до 0.022 GHG, что свидетельствует о значительной активности серотонергической системы на ранних стадиях.

Помимо рецепторов, в период доимплантационного развития активно экспрессируются мембранный транспортер серотонина *Sert* (*Slc6a4*) и везикулярные транспортеры моноаминов *Vmat1* (*Slc18a1*) и *Vmat2* (*Slc18a2*). Ключевой фермент деградации серотонина, моноаминоксидаза А *Maoa*, также демонстрирует высокую экспрессию на протяжении всего раннего развития. Эти данные указывают на наличие полноценной системы регуляции уровня серотонина, включающей его синтез, транспорт, рецепцию и деградацию, что может играть важную роль в регуляции эмбриональных процессов.

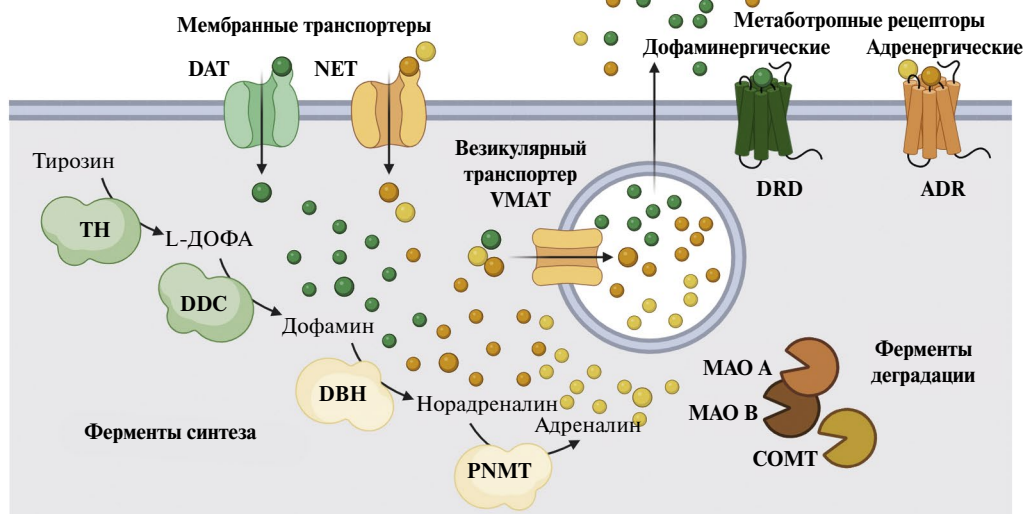
Наряду с серотонергической системой, существенная экспрессия мРНК наблюдается и у множества других трансмиссерных систем, некоторые из которых ранее не ассоциировались с регуляцией раннего эмбриогенеза. При этом дофаминергическая система, присутствие и активность которой выявлена в эмбриогенезе морских ежей (Nikishin et al., 2016), в транскриптоме мыши представлена неожиданно слабо (рис. 2). Например, фермент синтеза предшественника дофамина L-ДОФА тирозингидроксилаза активно экспрессируется с стадии ооцита до четырехклеточного эмбриона, причем пик экспрессии наблюдается после оплодотворения. Однако аналогично серотонину синтез дофамина становится возможным лишь на стадии бластоцисты с появлением экспрессии *Ddc*, которая также участвует и в синтезе дофамина. При этом единственный дофаминовый рецептор *Drd3* и транспортер дофамина *Dat* (*Slc6a3*) экспрессируются лишь временно на ранних стадиях, что предполагает ограниченную роль дофаминовой системы в начальных этапах развития.

Адренергическая система демонстрирует более сложную картину экспрессии (рис. 2). Ферменты синтеза дофамин-β-гидроксилаза (*Dbh*) и фенилэтанол-амин N-метилтрансфераза (*Pnmt*) проявляют значимый уровень экспрессии лишь на стадии зиготы. При этом на одноклеточной стадии наблюдается значительная экспрессия мРНК α2b- (*Adra2b*) и β3-адренорецепторов (*Adrb3*), а также транспортера норадреналина *Net* (*Slc6a2*). На двухклеточной стадии экспрессия α2b- и β3-рецепторов увеличивается на порядок и дополнительно появляется экспрессия

β1- и β2-адренорецепторов, что может быть связано с активацией зиготического генома и более сложной регуляцией адренергической системы. Экспериментальные данные подтверждают чувствительность доимплантационных эмбрионов к адреналину: инкубация зародышей в присутствии агонистов адреналиновых рецепторов вызывает снижение количества клеток на стадии бластоцисты (Čikoš et al., 2005; Čikoš et al., 2007). При этом ферменты деградации катехоламинов моноаминоксидаза В (*Maob*) и катехол-О-метилтрансфераза (*Comt*) на высоком уровне представлены в транскриптоме раннего развития мыши, как и ранее описанный фермент *Maoa*. Можно предположить, что высокая чувствительность к адреналину, его активный транспорт и деградация в эмбрионах необходимы для поддержания баланса уровня материнского адреналина в окружающей среде при передаче стресс-сигналов от матери зародышу.

Холинергическая система также была рассмотрена в рамках данного исследования (рис. 3). Экспрессия фермента синтеза ацетилхолина, холинацетилтрансферазы, по всей видимости, отсутствует в раннем развитии эмбриона мыши. Мускариновые рецепторы ацетилхолина (ACh) представлены m3- и m4-рецепторами (*Chrm3*, *Chrm4*), с экспрессией мРНК на уровне 0.011 и 0.003 GHG соответственно. Также экспрессируется набор субъединиц никотиновых ACh-рецепторов (α5- (*Chrna5*), α7- (*Chrna7*), β1- (*Chrb1*), γ- (*Chrng*) и δ-субъединицы (*Chrnd*)) в диапазоне 0.003–0.025 GHG, что обеспечивает возможность формирования как гетеромерных, так и гомомерных рецепторов. На двухклеточной стадии, при активации зиготического генома, наблюдается расширение репертуара субъединиц, включая α1- (*Chrna1*), α3- (*Chrna3*), α9- (*Chrna9*), α10- (*Chrna10*) и ε-субъединицы (*Chrne*). Такой набор субъединиц вполне может обеспечивать сборку функционально активного никотинового рецептора. Известно, что ацетилхолин способен снимать так называемый двухклеточный блок (возникающий при *in vitro* культивировании мышечных эмбрионов) путем активации инозитол-фосфатного пути и запуска цитоплазматического выброса кальция (Cho et al., 2009). Можно предположить, что в этом процессе могут участвовать рецепторы, мРНК которых уже экспрессируются до двухклеточной стадии. Примечательно отсутствие экспрессии везикулярного транспортера ацетилхолина *Vacht* (*Slc18a3*) и ацетилхолинэстеразы на ранних стадиях.

Дофамин и адреналин



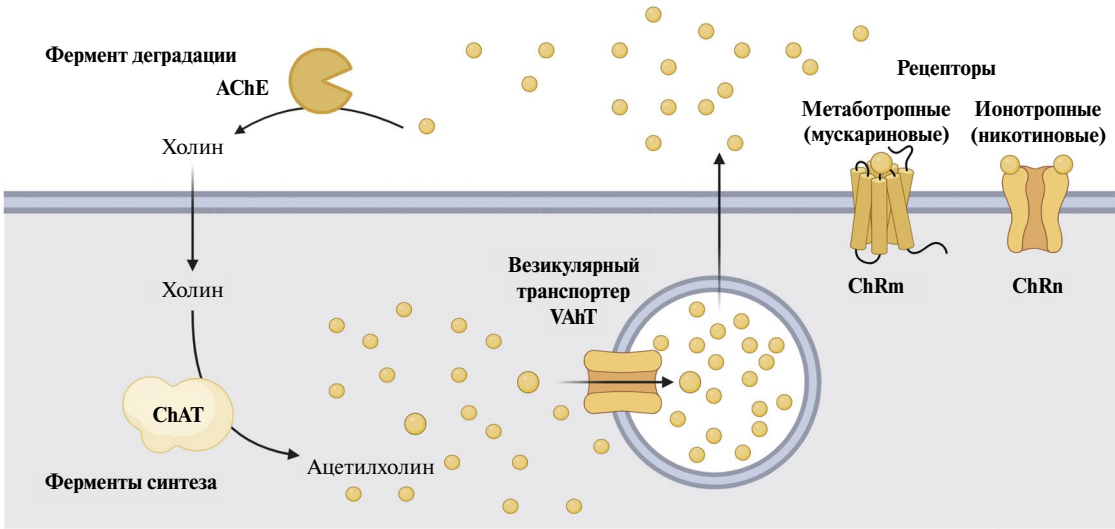
	Ооцит	Зигота	2 кл.	4 кл.	8 кл.	Бластоциста	Scale:
<i>Th</i> синтез	0.0763	0.1032	0.0651	0.0063	0.0000	0.0001	1.0000
<i>Ddc</i>	0.0000	0.0006	0.0103	0.0018	0.0013	0.0039	0.1000
<i>Dbh</i>	0.0011	0.0025	0.0019	0.0004	0.0000	0.0000	0.0600
<i>Pnmt</i>	0.0000	0.0036	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0300
<i>Htr1a</i> д	0.0036	0.0049	0.0177	0.0037	0.0019	0.0119	0.0100
<i>Htr1d</i>	0.0581	0.0526	0.0518	0.0023	0.0000	0.0000	0.0060
<i>Htr2b</i>	0.0280	0.0106	0.0325	0.0041	0.0138	0.0186	0.0030
<i>Drd3</i> рецепторы	0.0000	0.0006	0.0037	0.0054	0.0025	0.0001	0.0010
<i>Adra1d</i>	0.0000	0.0005	0.0055	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<i>Adra2b</i>	0.0016	0.0244	0.0261	0.0006	0.0003	0.0002	
<i>Adrb1</i>	0.0000	0.0000	0.0064	0.0221	0.0000	0.0001	
<i>Adrb2</i>	0.0013	0.0130	0.0973	0.0049	0.0024	0.0023	
<i>Adrb3</i>	0.0000	0.0100	0.2209	0.0143	0.0029	0.0062	
<i>Slc6a3 (Dat)</i> мт	0.0000	0.0106	0.0031	0.0000	0.0000	0.0000	
<i>Slc6a2 (Net)</i>	0.0000	0.0826	0.2209	0.0143	0.0029	0.0062	
<i>Slc18a1 (Vmat1)</i> вт	0.0280	0.0106	0.0325	0.0041	0.0138	0.0186	
<i>Slc18a2 (Vmat2)</i>	0.1915	0.0826	0.0515	0.0314	0.0042	0.0008	

Рис. 2. Компоненты дофамин- и адренергической систем и их экспрессия в раннем развитии мыши. Данные представлены в виде значений, нормированных на референсный коэффициент GHG. Обозначения в таблице: синтез — гены, кодирующие белки ферменты синтеза, д — деградации, рецептор — белков рецепторов к дофамину и адреналину, мт — мембранные транспортеры и вт — везикулярные транспортеры. Иллюстрация создана с помощью biorender.com.

ГАМК-ергическая система также демонстрирует сложный паттерн экспрессии (рис. 4). Экспрессия мРНК глутаматдекарбоксилазы (*Gad1*), ответственной за синтез ГАМК в раннем эмбриогенезе слабо выражена. В одноклеточном зародыше мыши экспрессируются $\alpha 3$ - (*Gabra3*), $\beta 3$ - (*Gabrb3*) и π -субъединицы (*Gabrp*) канального пентамерного ГАМК А-рецептора, обеспечивая потенциал для формирования функционального канального рецептора. На двухклеточной стадии добавляются субъединицы $\alpha 2$ - (*Gabra2*), $\alpha 4$ - (*Gabra4*), $\alpha 5$ - (*Gabra5*), $\beta 1$ - (*Gabrb1*), ϵ - (*Gabre*)

и θ - (*Gabrq*), однако наблюдается значительно более высокая экспрессия связанных с ГАМК А-рецепторами белков *Gabarapl1* и *Gabarapl2*, что может указывать на дополнительные регуляторные механизмы. Особый подкласс гомомерных ГАМК А-рецепторов, сформированный ρ -субъединицами, представлен только $\rho 3$ -субъединицей (*Gabrr3*) с существенной экспрессией на одноклеточной стадии. Также экспрессируется метаботропный В3-рецептор ГАМК, что расширяет функциональные возможности ГАМК-ергической системы на ранних этапах развития.

Ацетилхолин



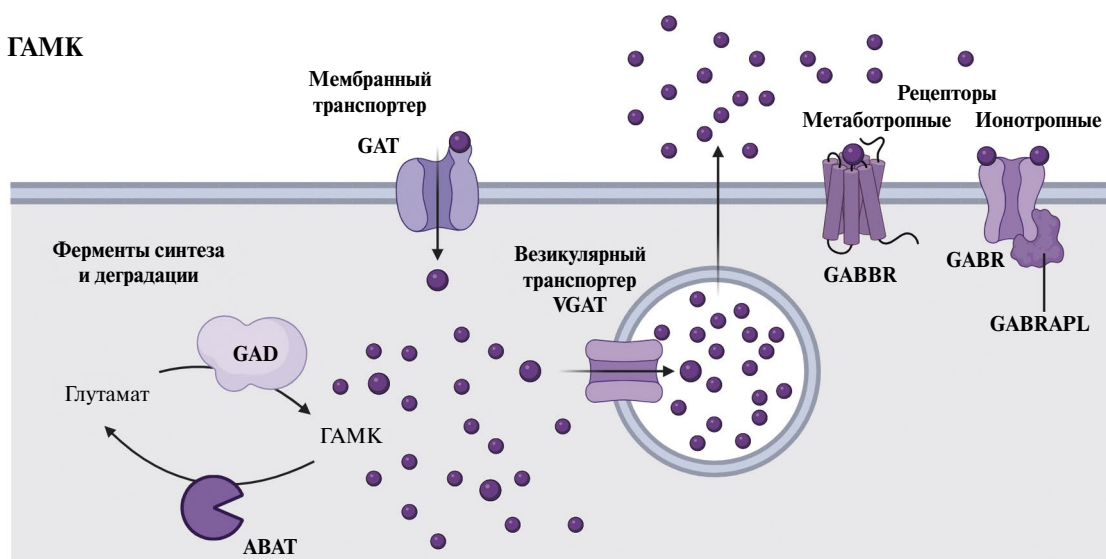
	Ооцит	Зигота	2 кл.	4 кл.	8 кл.	Бластоциста	Scale:
<i>Chrm3</i> мр	0.0376	0.0117	0.0105	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
<i>Chrm4</i> мр	0.0004	0.0033	0.0011	0.0001	0.0000	0.0000	0.1000
<i>Chrna1</i> субъединицы ир	0.0013	0.0026	0.0048	0.0038	0.0047	0.0046	0.0600
<i>Chrna3</i> субъединицы ир	0.0000	0.0006	0.0033	0.0006	0.0004	0.0003	0.0300
<i>Chrna5</i> субъединицы ир	0.0000	0.0033	0.0344	0.0030	0.0006	0.0002	0.0100
<i>Chrna7</i> субъединицы ир	0.0017	0.0030	0.0011	0.0007	0.0001	0.0000	0.0060
<i>Chrna9</i> субъединицы ир	0.0000	0.0000	0.0133	0.0203	0.0104	0.0009	0.0030
<i>Chrna10</i> субъединицы ир	0.0000	0.0000	0.0937	0.0348	0.0028	0.0001	0.0010
<i>Chrb1</i> субъединицы ир	0.0064	0.0072	0.0139	0.0073	0.0012	0.0006	0.0000
<i>Chrng</i> субъединицы ир	0.0087	0.0202	0.0053	0.0002	0.0001	0.0001	
<i>Chrnd</i> субъединицы ир	0.0084	0.0253	0.0068	0.0078	0.0009	0.0000	
<i>Chrne</i> субъединицы ир	0.0004	0.0111	0.0093	0.0109	0.0033	0.0012	
<i>Slc18a3 (Vacht)</i> вт	0.0000	0.0104	0.0094	0.0006	0.0000	0.0000	

Рис. 3. Компоненты холинергической системы и их экспрессия в раннем развитии мышцы. Данные представлены в виде значений, нормированных на референсный коэффициент GHG. Обозначения в таблице: мр — гены, кодирующие белки метаботропных (мускариновых) рецепторов, субъединицы ир — субъединицы ионотропных (никотиновых) рецепторов, вт — везикулярный транспортер. Иллюстрация создана с помощью biorender.com.

Как транспортер ГАМК *Slc6a1*, так и фермент катаболизма ГАМК-трансаминаза (*Abat*) выявляются почти на всех стадиях доимплантационного развития. Обнаружено, что инкубации в присутствии ГАМК и агонистов рецепторов к ней вызывают увеличение количества мертвых клеток в бластоцисте (Kovářková et al., 2023). Эти эффекты сходны с описанным выше для адренергической системы, когда активны процессы внутриклеточного накопления и деградации адреналина. В совокупности эти данные могут свидетельствовать о специфических путях трансмиссивной материнской регуляции ранних эмбрионов, замедляющих их развитие.

Глутаматная система, редко упоминаемая в контексте регуляции раннего эмбриогенеза, демонстрирует богатое присутствие в транскриптоме (рис. 5). На одноклеточной стадии активно экспрессируется только субъединица 4 (*Gria4*) канального AMPA-рецептора, а уровень экспрессии белка *Grip2*, взаимодействующего с AMPA-рецептором, значительно превышает экспрессию самого рецептора, что исключает возможность его активности. Метаботропные глутаматные рецепторы представлены несколькими видами мРНК, включая *Grm1*, *Grm2*, *Grm4* и *Grm8*, что указывает на возможность разнообразных функций глутаматной сигнализации.

ГАМК



		Ооцит	Зигота	2 кл.	4 кл.	8 кл.	Бластоциста	Scale:
<i>Gad1</i>	с	0.0000	0.0032	0.0023	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
<i>Abat</i>	д	0.0044	0.0036	0.0103	0.0050	0.0025	0.0021	0.1000
<i>Gabra1</i>	субъединицы ир	0.0023	0.0014	0.0000	0.0003	0.0000	0.0040	0.0600
<i>Gabra2</i>		0.0044	0.0023	0.0030	0.0012	0.0006	0.0001	0.0300
<i>Gabra3</i>		0.0123	0.0306	0.0434	0.0040	0.0004	0.0000	0.0100
<i>Gabra4</i>		0.0000	0.0000	0.0111	0.0011	0.0000	0.0000	0.0060
<i>Gabra5</i>		0.0028	0.0015	0.0037	0.0003	0.0000	0.0000	0.0030
<i>Gabrb3</i>		0.0170	0.0045	0.0153	0.0037	0.0051	0.0006	0.0010
<i>Gabrb1</i>		0.0000	0.0000	0.0051	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<i>Gabrd</i>		0.0000	0.0000	0.0289	0.0168	0.0391	0.0019	
<i>Gabre</i>		0.0004	0.0006	0.0065	0.0005	0.0001	0.0000	
<i>Gabrq</i>		0.0005	0.0030	0.0101	0.0003	0.0001	0.0010	
<i>Gabrp</i>	ср	0.0047	0.0184	0.0028	0.0021	0.0027	0.0000	
<i>Gabrr3</i>		0.0030	0.0052	0.0019	0.0003	0.0001	0.0000	
<i>Gabrr2</i>	мр	0.0000	0.0000	0.0020	0.0000	0.0000	0.0000	
<i>Gabarapl1</i>		0.0059	0.0070	0.0055	0.0139	0.0656	0.0314	
<i>Gabarapl2</i>	вт	0.2394	0.1387	1.0219	3.7094	5.0652	3.0754	
<i>Gabbr1</i>	мр	0.0058	0.0000	0.0006	0.0000	0.0000	0.0046	
<i>Gabbr2</i>		0.0005	0.0008	0.0045	0.0003	0.0004	0.0001	
<i>Gabbr3</i>		0.0030	0.0052	0.0019	0.0003	0.0001	0.0000	
<i>Slc6a1 (Gat1)</i>	вт	0.0033	0.0011	0.0076	0.0023	0.0023	0.0008	

Рис. 4. Компоненты ГАМК-ергической системы и их экспрессия в раннем развитии мыши. Данные представлены в виде значений, нормированных на референсный коэффициент GHG. Обозначения в таблице: с — гены, кодирующие белки ферменты синтеза, д — деградации, субъединицы ир — субъединицы ионотропных (ГАМК-А) рецепторов, ср — связанных с ГАМК-А рецепторами белков, мр — метаботропные рецепторы, вт — везикулярный транспортер. Иллюстрация создана с помощью biorender.com.

В то же время экспрессия NMDA-рецепторов ограничена лишь мРНК *Grin2b* на одноклеточной стадии, с последующей экспрессией *Grin1* на двухклеточной стадии, что позволяет формирование полноценного функционального рецептора только позже. Экспрессия субъединицы *Grik5* также не обеспечивает возможность

формирования функционального канального каинатного рецептора. Высокий уровень экспрессии транспортера глутамата *Slc1a1* подчеркивает значительную роль глутаматной системы в регуляции эмбриональных процессов. Показано, что глутамат способен накапливаться в эмбрионах мыши (Winkle Van, Campione, 1996),

а также снижать качество бластоцист, по всей видимости, посредством AMPA, каинатных и метаботропных рецепторов (Špírková et al., 2022). Важно отметить, что авторы последнего исследования упоминают, что для проявления негативных эффектов на развитие необходимы относительно высокие концентрации глутамата в среде, предполагая, что часть глутамата захватывается внутрь клетки, становясь неактивной для мембранных рецепторов, что согласуется с теорией о регуляции зародышем локальных концентраций транмиттеров в сообщении с материнским организмом.

В завершение мы провели анализ экспрессии компонентов гистаминовой системы ранних эмбрионов мыши (рис. 6). Гистаминовые рецепторы представлены только *Hrh1* и *Hrh3* со значимой экспрессией лишь на одноклеточной и двухклеточной стадиях соответственно. Несмотря на отсутствие экспрессии фермента синтеза гистамина гистидиндекарбоксилазы (*Hdc*) на ранних стадиях, присутствует мРНК фермента деградации гистамина — гистамин N-метилтрансферазы *Hnmt*, что указывает на потенциальные пути регуляции уровня экзогенного гистамина. Известно, что матка способна се-

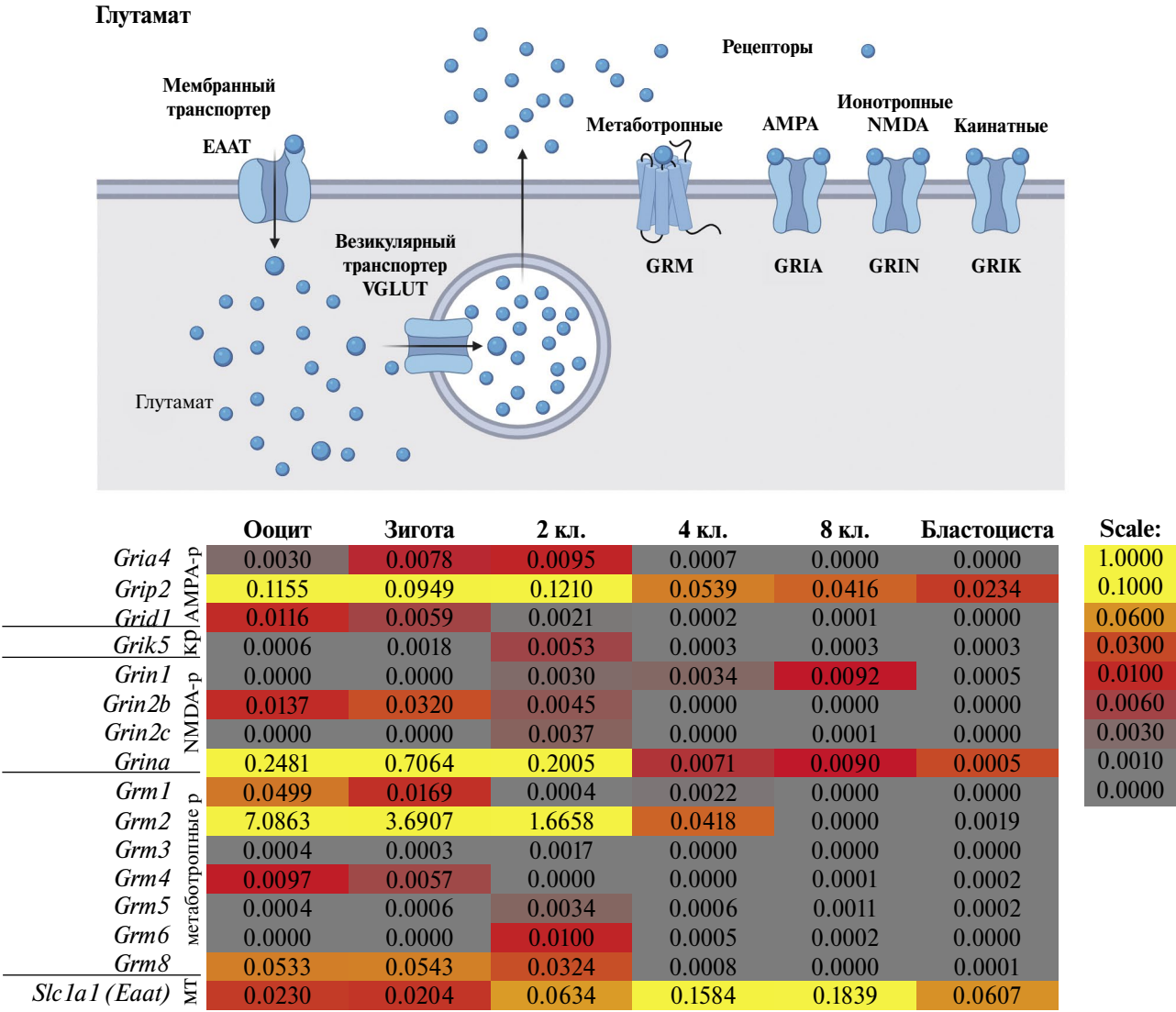


Рис. 5. Компоненты глутаматергической системы и их экспрессия в раннем развитии мыши. Данные представлены в виде значений, нормированных на референсный коэффициент GHG. Обозначения в таблице: AMPA-р — гены, кодирующие белки субъединицы AMPA-рецептора и белки, взаимодействующие с этим рецептором, кр — субъединицы каинатных рецепторов, NMDA-р — субъединицы NMDA-рецепторов, метаботропные р — метаботропные рецепторы, мт — мембранный транспортер. Иллюстрация создана с помощью biorender.com.

Гистамин

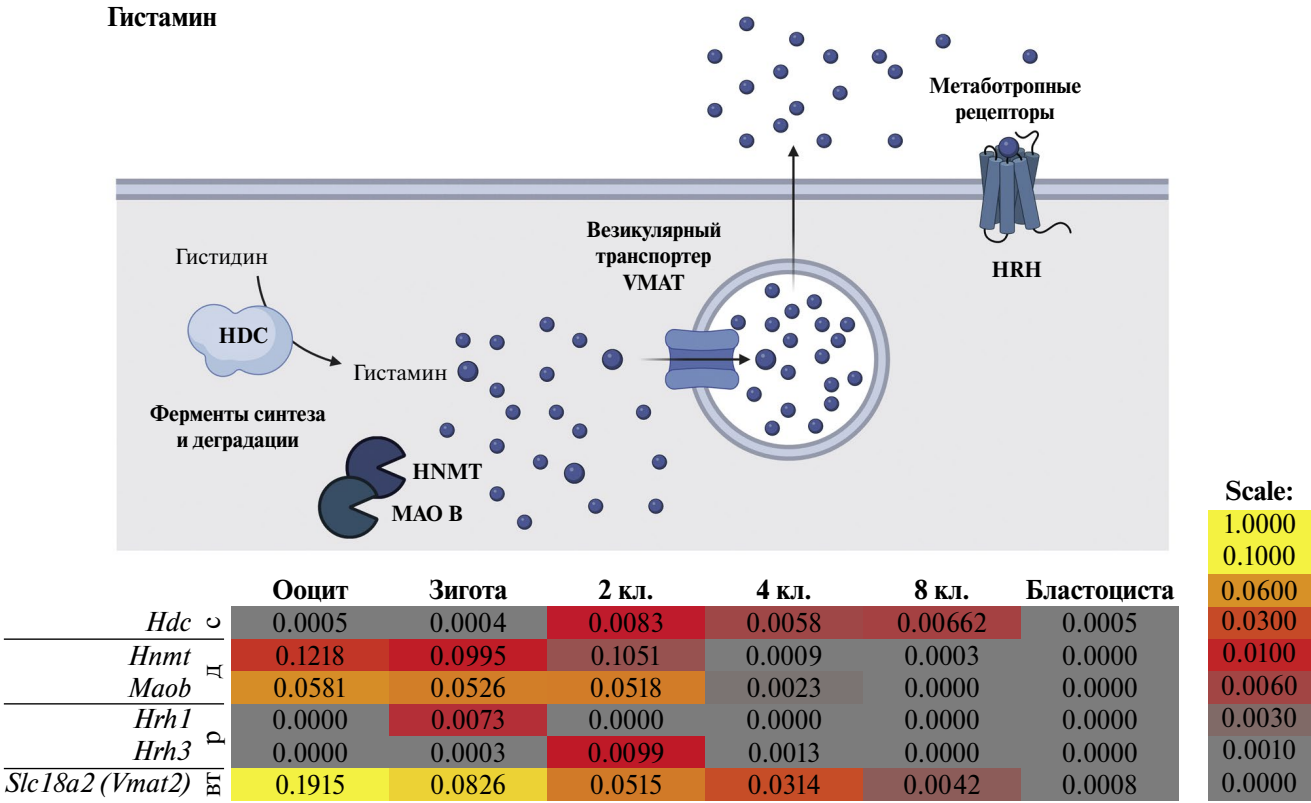


Рис. 6. Компоненты системы гистамина и их экспрессия в раннем развитии мыши. Данные представлены в виде значений, нормированных на референсный коэффициент GHG. Обозначения в таблице: с — гены, кодирующие белки ферменты синтеза, д — деградации, р — рецепторы к гистамину, вт — везикулярный транспортер. Иллюстрация создана с помощью biorender.com.

кретировать гистамин во время так называемого окна имплантации, а эмбрион воспринимает эти сигналы и инициирует инвазию эндометрия (Liu et al., 2024).

Анализ транскриптома мыши, проведенный в данном исследовании, выявил необычайно широкий спектр экспрессирующихся компонентов различных трансмиссерных систем как в процессе оогенеза, так и в последующем раннем эмбриогенезе. Этот факт свидетельствует не только о накоплении транскриптов данных компонентов в оогенезе, что позволяет их последующую регуляцию эмбриогенеза, но и указывает на их возможную роль в качестве существенных регуляторов самого оогенеза (Alyoshina et al., 2022).

Адекватность примененного подхода подтверждают данные, полученные для компонентов серотонинергической системы, роль компонентов которой в раннем развитии исследована достаточно детально. Так, экспрессия рецеп-

тора *Htr1d* на 1-клеточной стадии составляет, по транскриптомным данным, всего 0.004 GHG, при этом показано, что этот рецептор присутствует и функционирует в ранних эмбрионах мыши (Frolova et al., 2024). Это подтверждает реалистичность принятого порога значимости экспрессии мРНК на уровне 0.003 GHG. Этот порог позволяет утверждать, что наряду с серотониновой системой, в которой экспрессируются мРНК минимум пяти различных рецепторов, адренергическая система представлена двумя типами рецепторов, холинергическая — как минимум тремя, ГАМК-эргическая — двумя, глутаматная — четырьмя. Дополнительно на 1-клеточной стадии могут быть представлены гистаминергическая и опиоидная системы, каждая из которых может включать по одному типу рецепторов. Следует также учитывать, что за пределами данной работы остаются системы белковых сигнальных молекул, которые также обширно представлены в раннем развитии, и могут вступать с ними в перекрестные взаимодействия.

На двухклеточной стадии наблюдается значительное расширение спектра трансмиссерных механизмов, что, очевидно, связано с активацией зиготического генома. Помимо того, возникновение многоклеточности обеспечивает возможность не только реализовать внутриклеточный сигналинг, но и открывает возможность межклеточных коммуникаций, что может возникать уже на этапе формирования всего двух бластомеров (Shmukler, Nikishin, 2012). Параллельно с дифференцировкой эмбриональных клеток происходит их трансмиссерная специализация, что подкрепляет гипотезу о важности многообразия трансмиссерных систем для тонкой настройки процессов клеточного развития и дифференцировки.

Несмотря на богатство данных, ясно, что нарастающая экспрессия рецепторов требует дальнейшего подтверждения на белковом уровне. Тем не менее полученные результаты значительно расширяют наше понимание регуляторных механизмов раннего эмбриогенеза. С одной стороны, они указывают на многокомпонентность и взаимосвязанность процессов, а с другой — создают дополнительные сложности для изучения этих процессов из-за их высокой комплексности.

Изобилие регуляторных механизмов, обнаруженных в ходе исследования, предполагает возможность пересечения их функций на ограниченном количестве конечных эффекторных структур, например элементов цитоскелета. Это может объяснить наблюдаемый феномен, который не вписывается в традиционные представления о строгой специфичности химических механизмов трансмиссерной регуляции. Работы Г. А. Бузникова неоднократно показывали, что против эмбриостатических эффектов антагонистов отдельных трансмиссеров наиболее эффективное защитное действие оказывает "коктейль трансмиссеров", включающий смесь серотонина, адреналина и дофамина (Бузников, 1967). Помимо того, известно, что связанные с G-белком рецепторы (GPCR) из разных моноаминергических систем способны образовывать гетеромеры, меняющие активность этих рецепторов, из-за которых лиганд к одному из рецепторов может так же вызывать активацию молекулярного каскада другим рецептором в составе такого гетеромера (Dale et al., 2022). Такая множественность, взаимозаменяемость и компенсация между различными сигнальными системами в одной клетке могут лежать в основе механизмов, обеспечивающих высокую степень интеграции и устойчивости регуляторных сетей в эмбриогенезе.

Таким образом, полученные данные подчеркивают необходимость комплексного подхода к исследованию регуляторных сетей раннего эмбриогенеза, учитывающего как многообразие трансмиссерных систем, так и их потенциальную функциональную взаимозаменяемость. Будущие исследования должны быть направлены на детальное изучение взаимодействий между различными трансмиссерными системами и выявление ключевых эффекторных структур, обеспечивающих стабильность и адаптивность эмбриональных процессов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Выполнено в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН № 0088-2024-0012 в 2025 г. Часть работы, посвященная исследованию серотонинергических механизмов, была поддержана грантом Российского научного фонда № 22-74-10009, для Н.М. Алешиной, Ю.О. Никишиной, и Д.А. Никишина.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все работы по получению данных, анализируемых в статье, соответствовали международным нормам по биоэтике.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Ю. Б. Шмуклер разработал и концептуализировал идею исследования и участвовал в анализе транскриптомных данных и подготовке текста; В. С. Фролова провела обработку и визуализацию первичных данных; Д. А. Никишин написал черновую версию статьи; Н. М. Алешина и Ю. О. Никишина редактировали статью и подготовили ее к публикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бузников Г.А. Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития. М.: Наука, 1967. 264 с.
2. Alyoshina N.M., Tkachenko M.D., Malchenko L.A., et al. Uptake and Metabolization of Serotonin by Granulosa Cells Form a Functional Barrier in the Mouse Ovary // *Int J Mol Sci*. 2022. V. 23. № 23.
3. Buznikov G.A. Neurotransmitters in Embryogenesis. Chur: Harwood Academic Publishers, 1990.
4. Cho S.-K., Yoon S.-Y., Hur C.-G., et al. Acetylcholine rescues two-cell block through activation of IP3 receptors and Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II in an ICR mouse strain. // *Pflugers Arch*. 2009. V. 458. № 6. P. 1125–36.

5. Čikoš Š., Veselá J., Il'ková G., et al. Expression of beta adrenergic receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos // *Mol Reprod Dev.* 2005. V. 71. № 2. P. 145–153.
6. Čikoš S., Rehák P., Czikková S., et al. Expression of adrenergic receptors in mouse preimplantation embryos and ovulated oocytes // *Reproduction.* 2007. V. 133. № 6. P. 1139–1147.
7. Dale N.C., Johnstone E.K.M., Pfleger K.D.G. GPCR heteromers: An overview of their classification, function and physiological relevance // *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022. V. 13.
8. Frolova V.S., Nikishina Y.O., Shmukler Y.B., et al. Serotonin Signaling in Mouse Preimplantation Development: Insights from Transcriptomic and Structural-Functional Analyses // *Int J Mol Sci.* 2024. V. 25. № 23. P. 12954.
9. Kovaříková V., Špírková A., Šefčíková Z., et al. Gamma-aminobutyric acid (GABA) can affect physiological processes in preimplantation embryos via GABAA and GABAB receptors // *Reprod Med Biol.* 2023. V. 22. № 1.
10. Liu C., He Y., Chen S., et al. Histamine promotes mouse decidualization through stimulating epithelial amphiregulin release // *FEBS J.* 2024. V. 291. № 17. P. 3924–3937.
11. Loewi O. Über humorale übertragbarkeit der Herznervenwirkung // *Pflügers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere.* 1921. V. 189. № 1. P. 239–242.
12. Nikishin D.A., Kremnyov S.V., Konduktorova V.V., et al. Expression of serotonergic system components during early *Xenopus* embryogenesis // *Int J Dev Biol.* 2012. V. 56. № 5. P. 385–391.
13. Nikishin D.A., Milošević I., Gojković M., et al. Expression and functional activity of neurotransmitter system components in sea urchins' early development. // *Zygote.* 2016. V. 24. № 2. P. 206–18.
14. Qiao Y., Ren C., Huang S., et al. High-resolution annotation of the mouse preimplantation embryo transcriptome using long-read sequencing // *Nat Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 1–13.
15. Shmukler Y.B., Nikishin D.A. Transmitters in Blastomere Interactions // *Cell Interaction.* : InTech, 2012. P. 31–66.
16. 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.
17. Shmukler Yu.B., Nikishin D.A. On the Intracellular Transmitter Reception // *Neurochemical Journal.* 2018. V. 12. № 4. P. 295–298.
18. Špírková A., Kovaříková V., Šefčíková Z., et al. Glutamate can act as a signaling molecule in mouse preimplantation embryos // *Biol Reprod.* 2022. V. 107. № 4. P. 916–927.
19. Tu Q., Cameron R.A., Davidson E.H. Quantitative developmental transcriptomes of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* // *Dev Biol.* 2014. V. 385. № 2. P. 160–167.
20. Winkle L.J. Van, Campione A.L. Amino acid transport regulation in preimplantation mouse embryos: Effects on amino acid content and pre- and peri-implantation development // *Theriogenology.* 1996. V. 45. № 1. P. 69–80.

All Transmitters Within a Single Oocyte: a Transcriptome Analysis of Embryonic Transmitter Systems

Yu. B. Shmukler^{1, *}, N. M. Alyoshina¹, Yu. O. Nikishina¹, V. S. Frolova², D. A. Nikishin^{1, 2}

¹ Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow

² Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Embryology, Moscow
e-mail: yurishmukler@yahoo.com

The present study focuses on the potential component structure of prenerve transmitter systems in cells of pre-implantation mammalian embryos. A number of classical neurotransmitters have been shown to exhibit functional activity at the early stages of the development of multicellular organisms, including mammals. The present study provides analysis of the expression of key neurotransmitter systems components during early mouse development using accessible next-generation sequencing and transcriptomics data. The findings indicate the presence of receptors and other components of numerous transmitter systems in oocytes and embryos, encompassing serotonergic, dopaminergic, adrenergic, cholinergic, GABAergic systems, as well as glutamate and histamine systems. The observed diversity suggests the possible convergence of different transmitter systems in the regulation of cell proliferation, differentiation and morphogenesis at the level of common terminal elements of intracellular signalling cascades and effectors. These results offer novel insights and directions for further research, particularly concerning the interactions between diverse transmitters and their function in regulating cellular differentiation and morphogenesis.

Keywords: oocyte, embryo, transcriptome, neurotransmitter, receptor, transporter, serotonin, dopamine, adrenaline, acetylcholine, GABA, glutamate, histamine