

УДК 591.465.12

СИНТЕЗ И МЕМБРАННЫЙ ТРАНСПОРТ СЕРОТОНИНА В РАЗВИВАЮЩЕМСЯ ОВАРИАЛЬНОМ ФОЛЛИКУЛЕ МЫШИ

© 2018 г. Д. А. Никишин^{1,2,*}, Н. М. Алешина², Ю. Б. Шмуклер¹

Представлено академиком РАН М.В. Угрюмовым 07.06.2017 г.

Поступило 07.07.2017 г.

Методом ОТ-ПЦР показали наличие мРНК *Tph1* в фолликулярных клетках и *Tph2* в ооцитах, выделенных из первичных многослойных овариальных фолликулов мыши, но отсутствие экспрессии *Ddc*, из чего следует невозможность синтеза серотонина в развивающемся овариальном фолликуле. Мембранный транспортёр серотонина *Sert* экспрессировался в фолликулярных клетках и в ооцитах. В экспериментах по культивированию фолликулов *in vitro* подтвердили отсутствие синтеза серотонина из 5-гидрокситриптофана и наличие активности мембранного транспорта, локализованного в ооците.

DOI: 10.7868/S0869565218010218

Серотонин в физиологических концентрациях определяется в репродуктивной системе самок млекопитающих, в том числе в яичниках [1], фолликулярной жидкости [2], зрелых ооцитах и клетках кумулюса [3]. Концентрация серотонина в яичнике меняется в ходе репродуктивного (эстрально-го) цикла [1] и коррелирует с развитием некоторых патологических процессов [2], а также с успешностью процедуры оплодотворения *in vitro* [4].

Одной из консервативных функций серотонина является модуляция процесса созревания яйцеклеток у самых разнообразных групп животных, в том числе у млекопитающих [5, 6]. Кроме того, серотонин влияет на функциональную активность фолликулярных клеток, которые не только играют важнейшую роль в процессе созревания яйцеклетки, но и являются основным источником эстрогенов в организме самки. У хомячков и крыс серотонин специфическим образом стимулирует синтез эстрадиола в преовуляторных фолликулах, культивируемых *in vitro* [5]. Стимуляция стероидогенеза серотонином также наблюдается в культурах клеток гранулёзы человека [7, 8]. Механизм регуляции функциональной активности фолликулярных клеток серотонином до конца не изучен, однако известно, что ключевую роль в этом процессе играет его мембранный транспорт. У мышей с нокаутом

гена *Sert* угнетена экспрессия ароматазы и, как следствие, снижено содержание эстрадиола в крови. Аналогичный эффект вызывает специфический ингибитор обратного захвата серотонина пароксетин [9]. Сходные результаты получены и на других модельных объектах, например, у самок костистой рыбы *Danio rerio* ингибитор обратного захвата серотонина флуоксетин приводит к уменьшению количества икры, а также к снижению уровня экспрессии мРНК ароматазы и содержания эстрадиола в яичнике [10].

Важным для понимания регуляторной функции серотонина является вопрос об источнике серотонина в овариальном фолликуле. Лимитирующий фермент синтеза серотонина триптофангидроксилаза экспрессируется как в клетках кумулюса [3], так и в зрелых ооцитах [11], на основании чего предполагается, что серотонин может синтезироваться в овариальном фолликуле. Однако стоит отметить, что непосредственные доказательства синтеза серотонина в яичнике млекопитающих и его компонентах отсутствуют. Потенциальными источниками экзогенного по отношению к фолликулу серотонина являются тромбоциты кровяного русла, тучные клетки, локализующиеся в строме яичника, а также немногочисленные нервные волокна, сопровождающие крупные медуллярные сосуды [12]. Экспрессия и активность мембранного транспортёра серотонина *Sert* показана как в клетках кумулюса, так и в изолированных ооцитах [3]. Однако в литературе отсутствуют данные о времени появления мембранного транспорта в ходе роста и развития овариального фолликула. Учитывая

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова
Российской Академии наук, Москва

²Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

*E-mail: denisnikishin@gmail.com

потенциальную роль серотонина как регулятора процесса фолликулогенеза, принципиальным вопросом остаётся выявление синтеза и мембранного транспорта серотонина в развивающемся овариальном фолликуле. Решению этой задачи посвящено настоящее сообщение.

Первичные многослойные овариальные фолликулы выделяли механически из яичников мышей-самок линии СВА (Питомник лабораторных животных “Пушино”). Для молекулярно-биологического исследования полученные фолликулы ($n = 500$) диссоциировали на отдельные клетки с помощью обработки коллагеназой I (“Sigma-Aldrich”, США) в концентрации 1 мг/мл и ДНКазой I (“Sigma-Aldrich”) в концентрации 100 мкг/мл в течение 30 мин при 37 °С и концентрации CO₂ 5%. РНК из полученных проб выделяли с помощью набора GeneJET RNA Purification Kit (“ThermoFisher Scientific”, США) и обрабатывали ДНКазой I (“ThermoFisher Scientific”) согласно протоколу производителя. Один микрограмм РНК из клеток гранулёзы, ооцитов и яичников использовали для синтеза кДНК с помощью набора реактивов MMLV RT kit (“Евроген”, Россия). ПЦР проводили на амплификаторе BioRad T100 (“BioRad”, США) с использованием готовой смеси для ПЦР ScreenMix-HS (“Евроген”). Анализ продуктов проводили с помощью агарозного гелеэлектрофореза и системы видеорегистрации Взгляд (“Компания Хеликон”, Россия). Специфические олигонуклеотиды для проведения ПЦР подбирали с помощью сервиса NCBI Primer-BLAST. Опыты проводили в трёх повторностях.

Изолированные овариальные фолликулы разделяли на экспериментальные группы ($n = 50$) и инкубировали в среде α -MEM с L-глутамином (“БиолоТ”, Россия) с соответствующими фармакологическими агентами в течение 2 ч при 37 °С и 5% CO₂. В эксперименте к фолликулам добавляли 5-гидрокситриптофан (НТР, конечная концентрация 10 мМ, “Sigma-Aldrich”), серотонин (5НТ, 1 мМ, “Sigma-Aldrich”), флуоксетин (FLU, 10 мМ, “Sigma-Aldrich”). Флуоксетин добавляли за 15 мин до серотонина. Далее фолликулы фиксировали в 4%-м параформальдегиде (рН 7,5) и окрашивали кроличьими антителами против серотонина (1 : 1000, АВ938, “Merk Millipore”, США) и козьими антителами против Ig кролика, конъюгированными с флуорофором Atto633 (1 : 200, “Sigma-Aldrich”). Специфичность иммуногистохимической реакции оценивали по отсутствию флуоресценции при окрашивании только вторичными антителами. Препараты анализировали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica SP5 (“Leica Microsystems”, Германия) и регистрировали иммунофлуоресценцию на медиальном оптическом срезе при постоянных параметрах

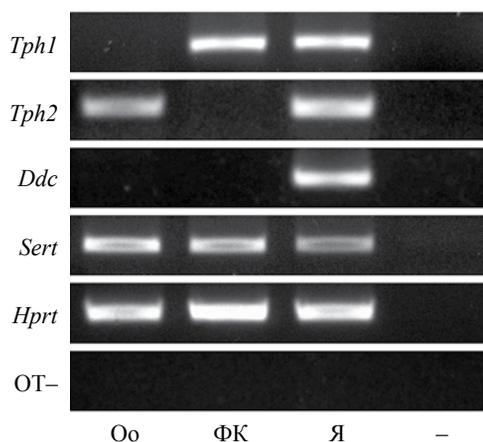


Рис. 1. Экспрессия мРНК генов ферментов синтеза и мембранного транспортера серотонина в ооцитах (Оо) и фолликулярных клетках (ФК), выделенных из первичных многослойных фолликулов мыши. В качестве контрольного гена домашнего хозяйства использовали ген гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы *Hprt*. Положительный контроль – яичник (Я), отрицательный контроль – ПЦР без матрицы (–) и ПЦР без обратной транскрипции (ОТ–).

интенсивности лазера и чувствительности детектора. Уровень иммунофлуоресценции на полученных изображениях определяли с помощью программы ImageJ. Полученные результаты обрабатывали статистически с помощью программы GraphPad Prism (“GraphPad Software, Inc.”, США). Эксперимент проведён в пяти повторностях.

Молекулярно-генетический анализ экспрессии ферментов синтеза серотонина показал наличие мРНК триптофангидроксилазы как в клетках гранулёзы, так и в ооцитах, полученных из первичных многослойных овариальных фолликулов (рис. 1). При этом в клетках гранулёзы дифференциально экспрессировался *Tph1*, тогда как в ооцитах – *Tph2*. В то же время экспрессию гена декарбоксилазы ароматических аминокислот *Ddc* мы не выявили ни в ооцитах, ни в клетках гранулёзы, хотя она детектировалась в образце целого яичника. Анализ ОТ-ПЦР также показал, что мРНК гена мембранного транспортера серотонина *Sert* экспрессировался и в клетках гранулёзы, и в ооцитах.

Для подтверждения отсутствия синтеза и наличия мембранного транспорта серотонина в овариальном фолликуле мы провели серию опытов по инкубации фолликулов *in vitro* в присутствии соответствующих агентов с последующим анализом методом иммуногистохимии накопления серотонина (рис. 2). При инкубации фолликулов с биохимическим предшественником серотонина НТР накопления транмиттера не происходило (рис. 2а). В контрольном эксперименте, проведённом с использованием фрагментов надпочечника,

накопление серотонина происходило в клетках мозгового вещества, что подтверждает адекватность используемого нами методического подхода. При инкубации овариальных фолликулов с серотонином мы зарегистрировали его накопление в ооцитах (рис. 2а). Количественный подсчёт результатов и их статистический анализ подтвердили достоверность выявленных различий (рис. 2б). При этом в фолликулярных клетках накопления серотонина не зафиксировали. Предварительная обработка овариальных фолликулов селективным ингибитором обратного захвата серотонина флуоксетином предотвращала накопление серотонина в ооцитах (рис. 2а).

В литературе существуют многочисленные молекулярно-генетические и экспериментальные свидетельства экспрессии компонентов серотонинергической системы в яичнике млекопитающих на заключительных стадиях созревания овариального фолликула. При этом данные о динамике экспрессии и функциональной активности этих генов в ходе фолликулогенеза отсутствуют. В качестве объекта исследования мы выбрали стадию первичного многослойного фолликула, наступающую после выхода примордиального фолликула из состояния покоя (блока мейоза), во время которой происходит реактивация оогенеза, подготовка к делениям созревания и активный рост яйцеклетки и всего фолликула.

Полученные нами данные о наличии мРНК триптофангидроксилазы в клетках гранулёзы и в ооцитах находятся в полном соответствии

с литературными данными, в которых показана экспрессия *Tph1* в клетках кумулюса [3], а *Tph2* – в зрелых ооцитах и доимплантационных эмбрионах [11]. Авторы цитируемых работ делают вывод о возможности локального синтеза серотонина компонентами овариального фолликула. Однако нами показано, что экспрессия гена второго фермента синтеза серотонина *Ddc* не выявляется ни в ооцитах, ни в клетках гранулёзы. Из этого закономерно следует, что синтез собственного серотонина в овариальном фолликуле невозможен. Это заключение подтверждается экспериментом, проведённым *in vitro*, в котором добавление биохимического предшественника серотонина не приводило к его накоплению в развивающемся овариальном фолликуле. Стоит отметить, что отсутствие активности декарбоксилазы также указывает на невозможность синтеза в овариальном фолликуле другого важного моноаминергического трансммиттера – дофамина. Тем не менее мРНК декарбоксилазы мы выявили в образце целого яичника. Не исключено, что локальный синтез серотонина в данном случае может происходить кооперативно, с участием нескольких типов клеток, как это было показано для дофамина [13]. Данный вопрос требует отдельного исследования.

Для накопления в овариальном фолликуле серотонина из внешних источников необходимо наличие его мембранного транспорта. Проведённый нами молекулярно-генетический анализ показал, что мРНК специфического транспортёра

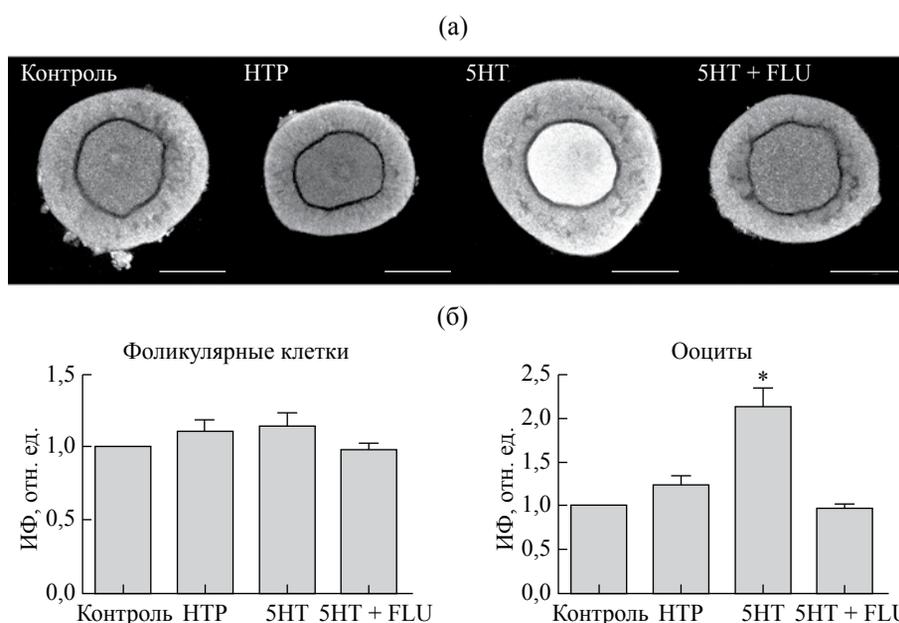


Рис. 2. Активность систем синтеза и мембранного транспорта серотонина в развивающемся овариальном фолликуле. (а) – конфокальные микрофотографии контрольных и инкубированных в присутствии 5-гидрокситриптофана (НТР), серотонина (5НТ) и флуоксетина (FLU) овариальных фолликулов. Окрашивание антителами против серотонина. (б) – количественный подсчёт иммунофлуоресценции (ИФ). $M \pm SEM$, n (для каждой группы) = 50, * $p < 0,005$ по критерию Вилкоксона. Масштаб – 50 мкм.

серотонина *Sert* экспрессируется и в фолликулярных клетках, и в ооцитах. Однако при инкубации овариальных фолликулов с серотонином его накопление мы наблюдали только в ооцитах. Таким образом, мы видим, что в клетках гранулёзы отсутствует не только синтез, но и специфический захват серотонина. Отсутствие активности мембранного транспорта серотонина при наличии мРНК *Sert* можно объяснить регуляцией экспрессии гена на уровне трансляции или ингибированием его активности за счёт посттрансляционных модификаций. При иммуногистохимическом окрашивании контрольных фолликулов серотонин, тем не менее, выявляется в клетках гранулёзы. При отсутствии синтеза и специфического транспорта серотонин может попадать в клетку с помощью неспецифических механизмов мембранного транспорта, одним из которых являются транспортёры органических катионов, которые экспрессируются в том числе в яичнике [14]. Стоит отметить, что при физиологических концентрациях субстрата эффективность специфического связывания на порядки выше неспецифического [15], поэтому при добавлении серотонина в краткосрочном эксперименте накопления трансмиттера в клетках гранулёзы не наблюдали.

Таким образом, получены свидетельства специфичной активности мембранного транспорта серотонина в развивающемся ооците первичного многослойного овариального фолликула. Этот факт свидетельствует в пользу того, что ассоциированная с мембранным транспортом регуляция серотонином функциональной активности фолликулярных клеток может происходить опосредованно через ооцит. Если это так, то можно предполагать, что серотонин модулирует синтез и выделение ооцитом неких факторов, влияющих на окружающие фолликулярные клетки. Этот вопрос требует дальнейшего экспериментального исследования. В любом случае, очевидно, что функция серотонина как регулятора процессов ово- и фолликулогенеза связана с накоплением материнского серотонина в созревающих ооцитах, проявляющимся уже на самых ранних этапах фолликулярного роста. Можно заключить, что в первичном многослойном овариальном фолликуле отсутствует синтез серотонина, но активен специфический мембранный транспорт серотонина, локализованный в ооцитах.

Авторы благодарны академику РАН М.В. Угрюмову за помощь в обсуждении результатов.

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 учёных МК-1304.2017.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Clausell D.E., Soliman K.F.* // *Experientia*. 1978. V. 34. № 3. P. 410–411.
2. *Bòdis J., Bognàr Z., Hartmann G., et al.* // *Gynecol. Obstet. Invest.* 1992. V. 33. № 3. P. 165–167.
3. *Dubé F., Amireault P.* // *Life Sci.* 2007. V. 81. № 25–26. P. 1627–1637.
4. *Bòdis J., Hartmann G., Tinneberg H.R., et al.* // *Gynecol. Obstet. Invest.* 1993. V. 35. № 4. P. 232–235.
5. *Tanaka E., Baba N., Toshida K., et al.* // *Life Sci.* 1993. V. 53. № 7. P. 563–570.
6. *Sheng Y., Wang L., Liu X.S.J., et al.* // *J. Cell. Physiol.* 2005. V. 202. № 3. P. 777–786.
7. *Koppan M., Bodis J., Verzar Z., et al.* // *Endocrine*. 2004. V. 24. № 2. P. 155–159.
8. *Graveleau C., Paust H.J., Schmidt-Grimminger D., et al.* // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000. V. 85. № 3. P. 1277–1286.
9. *Zha W., Ho H.T.B., Hu T., et al.* // *Sci. Rept.* 2017. V. 7. № 1. P. 1137.
10. *Lister A., Regan C., Van Zwol J., et al.* // *Aquat. Toxicol.* 2009. V. 95. № 4. P. 320–329.
11. *Basu B., Desai R., Balaji J., et al.* // *Reproduction*. 2008. V. 135. № 5. P. 657–669.
12. *Amenta F., Vega J.A., Ricci A., et al.* // *Anat. Rec.* 1992. V. 233. № 3. P. 478–484.
13. *Ugrumov M.V., Melnikova V.I., Lavrentyeva A.V., et al.* // *Neuroscience*. 2004. V. 124. № 3. P. 629–635.
14. *Andreev E., Brosseau N., Carmona E., et al.* // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. № 20508.
15. *Sitte H.H., Hiptmair B., Zwach J., et al.* // *Mol. Pharmacol.* 2001. V. 59. № 5. P. 1129–1137.