

**ЭФФЕКТ ЛОКАЛЬНОЙ МИКРОАППЛИКАЦИИ
СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА МЕМБРАННЫЕ ТОКИ
РАННИХ ЗАРОДЫШЕЙ *Paracentrotus lividus*¹**

© 2007 г. Ю. Б. Шмуклер, Э. Тости*, Ф. Силвестре*

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

**Stazione Zoologica "Anton Dohrn"*

80121 Villa Comunale, Napoli, Italia

E-mail: ybs@hotmail.ru

Поступила в редакцию 28.11.06 г.

На зародышах морского ежа *Paracentrotus lividus* в период 1-го деления дробления показано, что локальная аппликация агонистов серотониновых рецепторов 3-го типа 5-НТQ и квипазина в межбластомерную щель вызывает специфические мембранные токи. Одновременно лиганды 5-НТ₃-рецепторов специфически влияют на тип дробления половинных зародышей, имитируя или устраняя межбластомерный сигнал. В свете полученных данных обсуждается уточненная концепция протосинапса, в которой распространение мембранных серотониновых рецепторов ограничено периодом формирования бластомеров в ходе деления дробления и локализовано в области межбластомерного контакта.

Ключевые слова: серотонин, рецепторы, межклеточные взаимодействия, деления дробления, морские ежи.

Медиаторы нервной системы, такие как серотонин, катехоламины и ацетилхолин, в период раннего (донервного) эмбриогенеза участвуют в нескольких ключевых процессах. В случае морских ежей – это, в первую очередь, запуск клеточного цикла, контроль состояния цитокортекса (Бузников, 1987), завершение формирования борозды дробления (Shmukler et al., 1999), адгезии бластомеров после деления (Бузников, Шмуклер, 1978) и, наконец, прямые межбластомерные взаимодействия (Шмуклер, 1981, 1992). Участие этих веществ в раннем эмбриогенезе характеризуется как химической специфичностью, так и различной локализацией соответствующих рецептивных структур (далее – рецепторов): если процессы запуска делений дробления и адгезии бластомеров опосредованы внутриклеточными рецепторами (Бузников, Шмуклер, 1978; Shmukler et al., 1986; Бузников, 1987), то в процессах межбластомерной сигнализации, по-видимому, участвуют рецепторы поверхностной мембраны (Шмуклер, 1992; Shmukler, 1993; Shmukler, Tosti, 2002).

Участие медиаторов в межбластомерных взаимодействиях обосновывается способностью антагонистов серотонина вызывать функциональную

изоляция бластомеров (Бузников, Шмуклер, 1978), а также специфическими эффектами серотонинергических веществ на так называемой “микромерной модели”, т.е. их способностью влиять на паттерн дробления зародышей морских ежей, развивающихся из бластомеров, изолированных в ходе 1-го деления дробления (Шмуклер, 1981). И на зародышах плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis*, и на зародышах *Paracentrotus lividus* серотонинергические препараты, плохо проникающие в клетку, эффективно влияли на паттерн дробления, наиболее вероятно, через рецепторы поверхностной мембраны (Шмуклер, 1992). Кроме того, было продемонстрировано специфическое связывание меченого лиганда серотониновых рецепторов в условиях, когда его проникновение в клетку было максимально ограничено (Шмуклер, 1992).

На первом этапе этих исследований еще не существовало развитой фармакологии серотониновых рецепторов и не представлялось возможным определить их типы. Однако уже в опытах по изучению влияния серотонинергических препаратов на уровень внутриклеточных ионов кальция выявилась эффективность лигандов серотониновых рецепторов 3-го типа (Shmukler et al., 1999). Далее, плохо проникающий в клетку агонист серотониновых рецепторов 3-го типа (5-НТ₃) 5-НТQ

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 05-04-48293).

при фиксации потенциала в конфигурации whole-cell избирательно вызывает специфические входящие токи в бластомерах *Paracentrotus lividus*, приуроченные к периоду формирования борозды 1-го и 2-го делений дробления. В отличие от него агонист 5-HT₁-рецепторов токов не вызывал, а агонист 5-HT₂-рецепторов вызывал их в течение всего клеточного цикла (Shmukler, Tosti, 2002). Это, с одной стороны, также свидетельствует о наличии в поверхностной мембране указанных серотонинрецептивных структур, а с другой – о наличии у них некоторой фармакологической специфичности.

В нашей работе продолжено изучение фармакологической чувствительности ранних зародышей, в частности специфичности их серотониновых рецептивных структур, участвующих в межбластомерных взаимодействиях, и предпринята попытка исследовать распределение этих структур по поверхности бластомеров.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Гаметы. Женские гаметы морского ежа *P. lividus* (Неаполитанский залив Средиземного моря, Италия) получали, инъецируя самкам 0.05 мл раствора KCl в концентрации 0.5 М. Мужские гонады собирали целиком и разбавляли “сухую сперму” морской водой непосредственно перед искусственным оплодотворением, которое, так же как и удаление оболочки оплодотворения и гиалинового слоя, проводили, как это описано ранее (Yazaki et al., 1995). Непосредственно перед началом фиксации потенциала и измерения токов зародыши переносили в нормальную морскую воду, измерения начинали с момента закладки борозды 1-го деления дробления.

Фиксацию потенциала в конфигурации whole-cell проводили, как описано ранее (Yazaki et al., 1995), для чего использовали микропипетку с диаметром кончика около 1 мкм и сопротивлением 5–10 МОм, заполненную раствором, близким по составу к внутриклеточной среде, мМ: 200 KCl, 20 NaCl, 250 сахарозы, 10 ЭГТА, 10 Hepes, pH 7.4. После достижения сопротивления изоляции 40–200 МОм мембрану прорывали, наличие отрицательного мембранного потенциала свидетельствовало о контакте микропипетки с цитозолем. Потенциал фиксировали на уровне –40 мВ. В экспериментах использовали только те зародыши, у которых ток фиксации был ниже 200 пА; величины ионных токов, сообщаемые в нашей работе, получены после вычитания тока фиксации. Токи регистрировали с помощью усилителя List EP7 и программного обеспечения Clampfit. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения Axoscope 10.0 и Microsoft Excel, при этом в тех случаях, когда аппликация химических веществ вызывала выходящие токи, их для жесто-

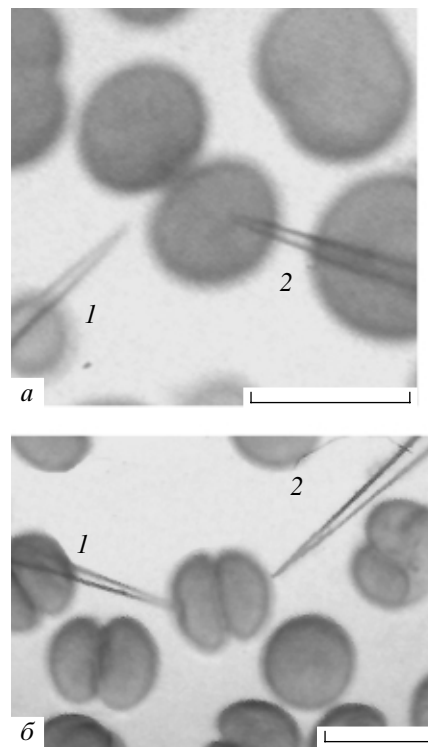


Рис. 1. Расположение апплицирующих микропипеток: *a* – в области борозды дробления до адгезии; *б* – вне контактной области (зародыш прошел адгезию бластомеров после деления). Микропипетка: 1 – апплицирующая, 2 – измерительная. Масштаб здесь и на рис. 4: 100 мкм.

чения оценки полученных данных усредняли как опыты с нулевым результатом.

Внесение химических веществ в камеру. 2-Метил-серотонин, 5-HTQ и никотин (все препараты фирмы “Sigma-RBI”, США) с помощью микропипетки вносили до конечной концентрации 100 мкм в наиболее удаленную от пэччевой пипетки часть экспериментальной камеры объемом 2 мл, чтобы исключить срыв клетки с пипетки, избежать воздействия избыточной концентрации вещества и ограничить механическую помеху при регистрации.

Микроаппликация химических веществ. Апплицирующую микропипетку, заполненную раствором химического препарата в концентрации 1 мМ и соединенную с пневматическим микроинъектором Picospritzer (США), располагали либо на расстоянии 5–10 мкм от борозды 1-го деления дробления, либо на таком же расстоянии от мембраны бластомера вне контактной области (рис. 1). Расположение кончика апплицирующей микропипетки в непосредственной близости от поверхности зародыша определяли по равной резкости ее изображения и изображения микропипетки, фиксирующей потенциал. Аппликацию проводили одиночными импульсами по 10 пл; ис-

Эффекты микроапликации химических веществ на бластомеры *P. lividus*

Препарат	Место микроапликации	Число опытов (с эффектом : без эффекта)	Амплитуда тока, пА	Латентный период, с
5-НТQ	В область контакта до адгезии	29 (25 : 4)	-119.4 ± 18.4	5.1 ± 0.7
	Иное, в том числе:	30 (13 : 17)	-47.0 ± 14.8	24.4 ± 2.3
	– в область контакта после адгезии	11 (5 : 6)	-61.0 ± 31.5	22.0 ± 2.4
	– вне области контакта	16 (8 : 8)	-43.4 ± 15.2	25.9 ± 3.7
Квипазин	В область контакта до адгезии	12 (8 : 4)	-100.0 ± 42.3	6.1 ± 1.6
	Иное, в том числе:	12 (7 : 5)	-73.3 ± 32.6	29.6 ± 4.5
	– в область контакта после адгезии	6 (5 : 1)	-123.3 ± 58.9	25.3 ± 5.1
	– вне области контакта	6 (2 : 4)	-23.3 ± 14.8	45.5 ± 4.3
ДМСO	В область контакта до адгезии	17 (8 : 9)	-32.2 ± 9.8	30.0 ± 8.0
	Иное	6 (2 : 4)	-21.2 ± 13.8	45.5 ± 14.5

пользовали агонисты 5-НТ₃-рецепторов 5-НТQ (триметилсеротонин йодид) и квипазин (2-(1-пиперазинил)хинолин малеат) (все препараты фирмы “Sigma”, США), а также диметилсульфоксид (ДМСO) в качестве растворителя.

Изоляция бластомеров. Суспензию зародышей, полученных так же, как для опытов по фиксации потенциала, непосредственно перед изоляцией переносили из бескальциевой в нормальную морскую воду. Это особенно существенный момент, поскольку в бескальциевой среде успешная изоляция бластомеров до определенного момента невозможна из-за их разрушения. Изоляцию проводили в период 1-го деления дробления до и после адгезии бластомеров с помощью Г-образной стеклянной иглы с диаметром конечной части около 5 мкм, как это описано ранее (Шмуклер и др., 1981б; Shmukler, 1993), в маленьких чашках Петри в присутствии исследуемого химического препарата. Именно замена бескальциевой морской воды на нормальную непосредственно перед началом изоляции позволила предотвратить разрушение бластомеров, изолированных до адгезии. По истечении 10 мин изолированные бластомеры переносили в чашку Петри с нормальной морской водой, затем контролировали момент формирования микромеров у половинных зародышей. Изучали также действие квипазина и антагониста 5-НТ₃-рецепторов йодметилата 3-тропанлиндол-3-карбоксилатана на паттерн дробления половинных зародышей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мембранные токи при внесении химических веществ в экспериментальную камеру. Специфичность ранее показанного эффекта лиганда 5НТ₃-рецепторов 5-НТQ проверили в опытах с внесением в экспериментальную камеру другого 5НТ₃-агониста – 2-метил-серотонина и никотина –

лиганда н-холинорецепторов. 2-Метил-серотонин (100 мкМ) вызывал входящий ток, сходный с таковым, наблюдавшимся при внесении 5-НТQ, (-335 ± 55 пА, $n = 7$). Никотин в такой же концентрации не вызывал существенных токов (-52 ± ± 19 пА, $n = 16$); только в шести случаях наблюдали входящие токи.

Мембранные токи при локальной аппликации химических веществ. При аппликации однократного импульса 5-НТQ (100 мкМ) в область межбластомерной щели до адгезии бластомеров в подавляющем большинстве опытов (25 из 29) наблюдался типичный входящий ток (таблица). В приведенном на рис. 2, а эксперименте микроапликация 5-НТQ в межбластомерную щель до адгезии вызвала максимальную силу тока – 103 пА с латентным периодом около 0.5 с. Апликация 5-НТQ вне контактной области или после окончания адгезии бластомеров вызвала входящие токи в 13 случаях из 30, амплитуда которых была статистически достоверно ниже, чем при апликации в область контакта ($p < 0.01$, рис. 2, б). Во многих из тех случаев, когда апликация вне контактной области не вызывала мембранных токов, добавление 5-НТQ в экспериментальную камеру вызывало выраженные токи, подобные наблюдавшимся нами ранее (Shmukler, Tosti, 2002) и значительно большие по амплитуде, чем при микроапликации.

Еще более существенно, что апликация в контактную область вызывала токи с существенно более коротким латентным периодом по сравнению с апликацией на свободную поверхность бластомера (таблица, $p < 0.001$). Естественно, что латентный период можно было определить только в тех случаях, когда в ответ на апликацию возникала сколько-нибудь существенная сила тока. Результаты микроапликации 5-НТQ в область борозды дробления после окончания адге-

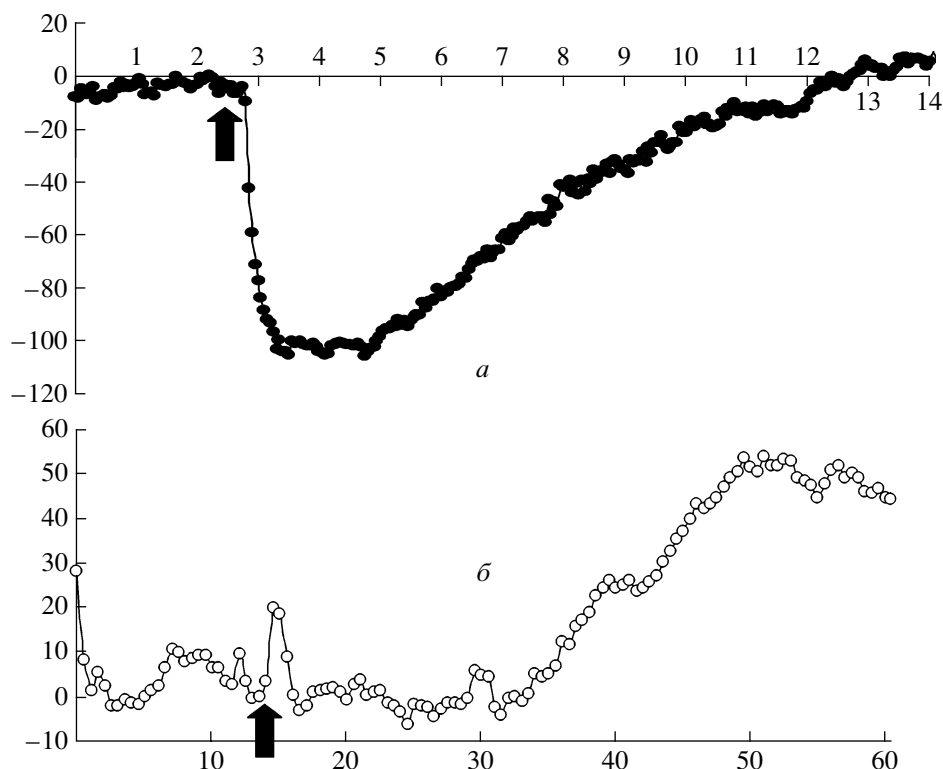


Рис. 2. Токи при микроаппликации 5-НТQ в контактную область (а) и на свободную поверхность (б) blastомеров в период 1-го деления дробления *P. lividus* (одиночный импульс).

Здесь и на рис. 3 : по оси абсцисс – время, с; по оси ординат – сила тока, пА; (■) – момент импульса.

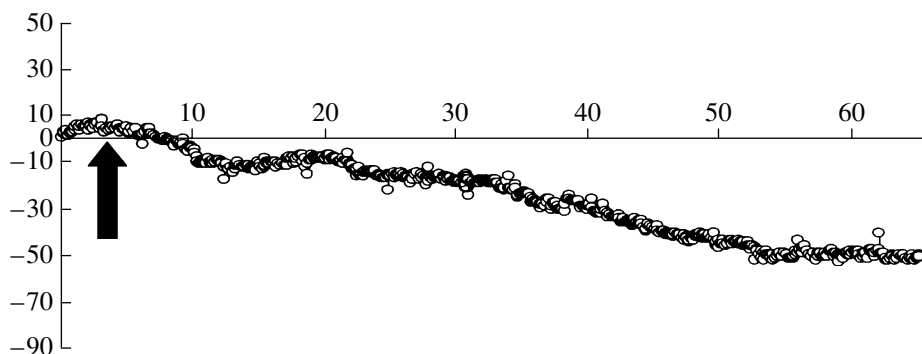


Рис. 3. Ток при микроаппликации ДМСО (одиночный импульс) в контактную область blastомеров в период 1-го деления дробления *P. lividus*.

зии blastомеров и на свободную поверхность blastомеров существенно не различались (таблица).

Другой агонист 5-НТ₃-рецепторов, кvipазин, также вызывал входящие токи при аппликации его в область борозды дробления до адгезии blastомеров (в 8 из 12 опытов); средняя амплитуда силы тока составила 100 ± 42 пА с латентным периодом 6.1 ± 1.6 с. При этом выявилась интересная деталь: если эффекты микроаппликации кvipазина на свободную поверхность blastомеров значительно и достоверно отличались от таковых при микроаппликации в межblastомерную щель и по амплитуде, и по длительности латентного пе-

риода (таблица), то микроаппликации кvipазина в область контакта после завершения адгезии вызывала токи сходной амплитуды, но со значительно большим латентным периодом.

Аппликация ДМСО, использовавшегося в качестве растворителя, в область контакта выраженных токов не вызывала. Тем не менее латентный период небольших изменений токов, наблюдавшихся в этих экспериментах, был существенно более длительным, чем при аппликации 5-НТQ в межblastомерную щель (таблица, рис. 3).

Аппликация серотонинергических веществ на изолированные blastомеры. Следует отме-

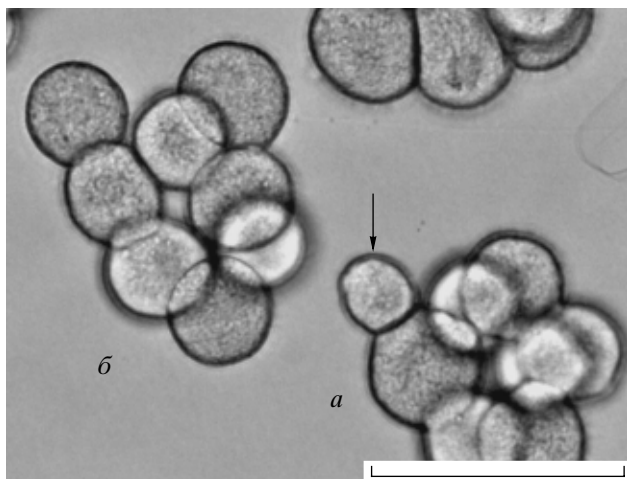


Рис. 4. Паттерны дробления половинных зародышей *P. lividus* на стадии 4-го деления дробления. Деление: *a* – равномерное, *б* – неравномерное. (—) – микромер.

туть, что модификация условий изоляции бластомеров по сравнению с ранее применявшимися позволила получить характерное для зародышей *Scaphechinus mirabilis* и *Strongylocentrotus nudus* различие паттернов дробления у половинных зародышей, изолированных до и после адгезии бластомеров в ходе 1-го деления дробления, и, в частности, получить устойчивую долю половинных зародышей, не образующих микромеры на 4-м делении дробления (рис. 4). Таким образом, наряду с действием антагониста 5-НТ-рецепторов удалось изучить и эффект агониста, который, как ранее было показано (Шмуклер, 1981), имитирует межбластомерный сигнал и вызывает увеличение доли зародышей, образующих микромеры на 4-м делении дробления.

На изолированных до адгезии в 1-м делении дробления бластомерах агонист 5-НТ₃-рецепторов квипазин (100 мкМ) увеличивал долю половинных зародышей, формирующих микромеры на 4-м делении дробления на $24.0 \pm 0.5\%$ ($p < 0.001$) по сравнению с контрольными без агониста ($41.5 \pm 0.5\%$). В то же время на бластомерах, изолированных после адгезии в 1-м делении дробления, антагонист 5-НТ₃-рецепторов йодметилат 3-тропанилиндол-3-карбоксилата снижал долю половинных зародышей, формирующих микромеры на 4-м делении дробления на $25.0 \pm 0.8\%$ ($p < 0.001$) по сравнению с контрольными без антагониста ($85.5 \pm 0.7\%$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Сопряженный с формированием борозды дробления эффект агониста 5-НТ₃-рецептора 5-НТQ был обнаружен ранее (Shmukler, Tosti, 2002), тогда как агонист 5-НТ₂-рецептора DOI вызывал

возникновение токов в ходе всего клеточного цикла, а агонист 5-НТ₁-рецептора 8-ОН-DPAT такого эффекта не имел. Это дало основание предположить, что эмбриональные рецепторные структуры сходны именно с 5-НТ₃-рецепторами взрослых организмов. Эффективность лигандов 5-НТ₃-рецепторов подтверждается и в нашей работе.

Наряду с ранее показанной временной организацией процессов, связанных с 5-НТ₃-рецепторами (Shmukler et al., 1999), в нашей работе показана и пространственная их организация. На локализацию рецепторных структур, сходных с 5-НТ₃-рецепторами, в области контактной мембраны бластомеров указывает как более высокая, чем при аппликации на свободную поверхность, амплитуда силы токов при локальной аппликации агонистов 5-НТ₃-рецепторов в область борозды 1-го деления дробления, так и существенно более короткий латентный период таких токов.

Значительная вариабельность латентного периода при аппликации в контактную область 2-клеточного зародыша может объясняться двумя факторами: невозможностью полностью стандартизовать положение кончика аппликационной пипетки по расстоянию и ее углу к контактной поверхности, а также временем с момента возвращения зародыша в нормальную морскую воду, с которого возобновляется формирование галинового слоя, который может влиять на скорость диффузии лигандов к рецепторам.

Возникновение токов при аппликации на свободную поверхность может быть связано с затеканием части апплицируемого лиганда в контактную область, в этих случаях латентный период увеличивается, что обусловлено большим расстоянием от кончика микропипетки, а амплитуда силы тока снижается, вероятно, вследствие разведения лиганда на большей дистанции. То, что чувствительность зародышей к агонистам 5-НТ₃-рецепторов сопряжена именно с контактной поверхностью, косвенно подтверждается и возникновением токов при добавлении лиганда в экспериментальную камеру в тех экспериментах, где предшествующая аппликация на свободную поверхность была неэффективна. Кроме того, в некоторых опытах проводилась последовательная аппликация в контактную область и на свободную поверхность в произвольном порядке с результатами, совпадающими с суммарными данными. Косвенно сопряженность токов, вызываемых 5-НТ₃-лигандами, с контактной областью подтверждается и их показанной ранее приуроченностью к моменту формирования борозды дробления (Shmukler, Tosti, 2002).

Различие результатов аппликации 5-НТQ и квипазина в область контакта после адгезии бластомеров, возможно, связано с различной липофильностью этих агонистов и, соответственно,

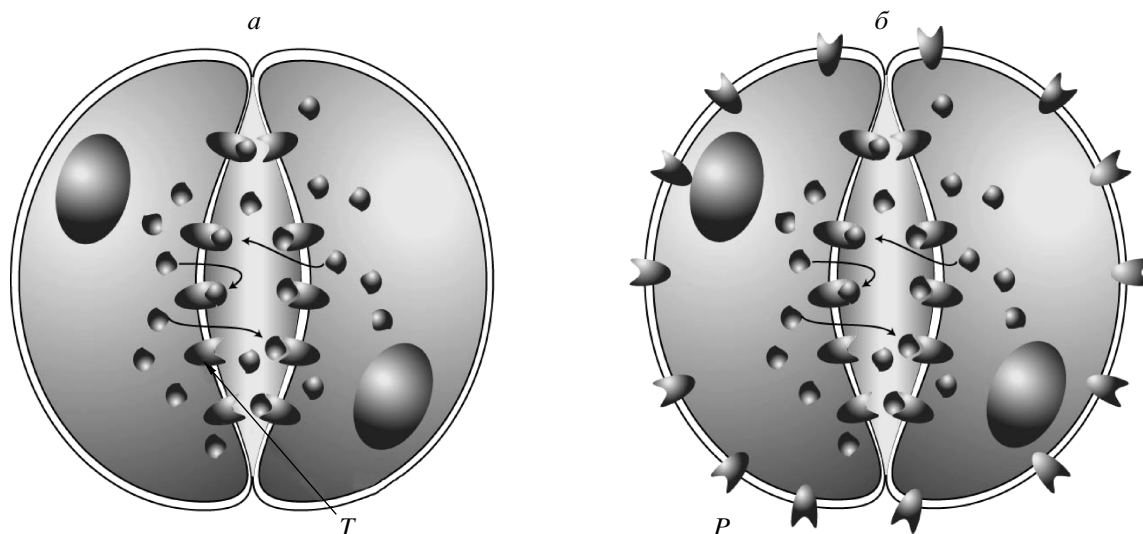


Рис. 5. Схема протосинапса: а – с равномерным распределением рецепторов по поверхности бластомеров, б – с локализацией рецепторов в области межбластомерного контакта. Р – рецептор, Т – трансмиттер.

способностью проникать к рецепторам через две мембраны. Первый из них обладает очень низкой проницаемостью через мембрану, что практически исключает его проникновение к рецепторам в контактной области после завершения процесса адгезии бластомеров после деления. В случае же квипазина возможно его очень быстрое проникновение через клеточную мембрану и связывание внутриклеточными структурами (Бузников, 1987; Шмуклер, 1992), что уменьшает вероятность взаимодействия с мембранными рецепторами, однако впоследствии лиганд может проходить через контактную мембрану и оказываться, в отличие от 5-НТQ, в контактной области.

Физиологическая активность лигандов 5-НТ₃-рецепторов не ограничивается их способностью вызывать мембранные токи; на “микромасштабной модели” (Шмуклер и др., 1981а, б; Шмуклер, 1981) эффекты агониста и антагониста 5-НТ₃-рецепторов полностью соответствуют показанным ранее эффектам серотонинергических веществ (Шмуклер, 1981, 1992), изменяя соответствующим образом тип дробления половинных зародышей. Усовершенствование методики изоляции впервые позволило получить на зародышах *P. lividus* фракцию бластомеров, изолированных до адгезии в ходе 1-го деления дробления и не образующих микромеры на 4-м делении дробления, а также продемонстрировать эффект агониста серотониновых рецепторов. Возможно, ранее эффекты специально синтезированных антагонистов серотониновых рецепторов (Шмуклер, 1992), таких как йодметилаты инмекарба и препарата КЮР-14, обусловлены их взаимодействием с 5-НТ₃-рецептороподобными структурами. Можно также предположить, что эти эффекты лигандов 5-НТ₃-рецепторов, так же как мембранные токи, обу-

словлены их взаимодействием с рецепторами именно в контактной области в ходе деления дробления. Таким образом может локально изменяться состояние цитокортекса бластомеров, предопределяя положение веретена следующего дробления и, соответственно, момент выделения микромеров.

Эти данные хорошо соответствуют ранее сформулированной концепции протосинапса – двухсторонне-симметричной структуры взаимодействия бластомеров, которая предполагает, что каждый из бластомеров морского ежа является как источником межклеточного сигнала, так и его мишенью, а кроме того, обеспечивает его накопление в межбластомерной щели, представляя собой пассивное препятствие для диффузии медиатора во внешнюю среду (Шмуклер, 1992). Таким образом может формироваться поляризация бластомеров, предопределяющая положение веретена следующего деления дробления и, следовательно, паттерн дробления половинного зародыша. В конечном счете ограничивается тотипотентность изолированного бластомера.

Возникновение и(или) активность этих рецепторов сопряжены по времени с 1-м делением дробления и локализованы в области межбластомерного контакта. Это означает, что выдвинутую ранее концепцию протосинапса следует уточнить, исключив предположение о равномерном распределении серотонинрецептивных структур по поверхности бластомеров и ограничив его временем делений дробления и областью межбластомерного контакта (рис. 5).

Стоит упомянуть, что концепция протосинапса помимо ценности в объяснении конкретных феноменов раннего развития и эволюционной основы последующего формирования собственно синаптических механизмов может объяснять и

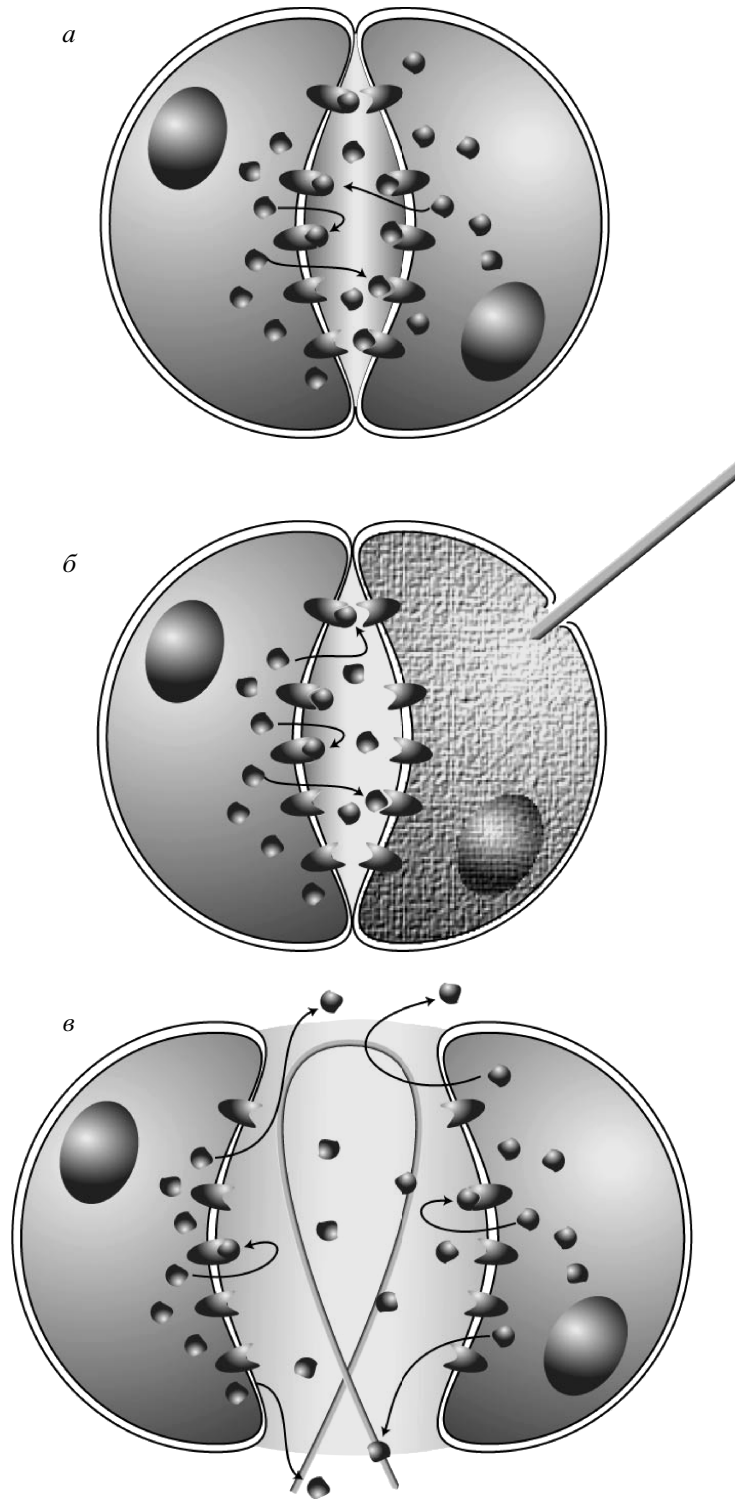


Рис. 6. Протосинапс (а) и схемы опытов Ру (б) и Мак-Клендона (в).

старое противоречие классических опытов Ру (Roux, 1888) и Мак-Клендона (McClendon, 1910). Согласно первому, коагуляция blastomera зародыша *in situ* приводит к формированию половинного набора структур, тогда как второй при механической изоляции blastomeres наблюдал пол-

ную регуляцию развития. В рамках концепции протосинапса такое противоречие может объясняться тем, что при коагуляции одного из blastomeres (а не его полном удалении) и источником, и мишенью трансмиттера является интактный blastomer, а пассивное препятствие для диффузии

трансммиттера, выбрасываемого во внешнюю среду из интактного бластомера, сохраняется в виде коагулированного бластомера (рис. б), а следовательно, сохраняется и асимметрия воздействия трансмиттера. Таким образом определяется перспективная судьба клетки и, соответственно, ограничение тотипотентности клеток регуляционного зародыша.

Авторы выражают признательность президенту Зоологической станции "Антон Дорн" проф. Дж. Бернарди за поддержку данной работы, а Д. Кармиелло – за помощь в подготовке экспериментального материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бузников Г.А. Нейротрансммиттеры в эмбриогенезе. М.: Наука, 1987. 232 с.
- Бузников Г.А., Шмуклер Ю.Б. Влияние препаратов-антимедиаторов на межклеточные связи у ранних зародышей морских ежей // Онтогенез. 1978. Т. 9. № 2. С. 173–178.
- Шмуклер Ю.Б. Межклеточные взаимодействия у ранних зародышей морских ежей. III. Влияние нейрофармакологических препаратов на тип дробления половинных зародышей *Scaphechinus mirabilis* // Там же. 1981. Т. 12. № 4. С. 404–409.
- Шмуклер Ю.Б. Специфическое связывание [H³]8-OH-DPAT ранними зародышами морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* // Биол. мембраны. 1992. Т. 9. № 10–11. С. 1167–1169.
- Шмуклер Ю.Б., Чайлахян Л.М., Карнович А.Л. и др. Межклеточные взаимодействия у ранних зародышей морских ежей. I. Существование различных типов делений дробления зародышей половинного размера морских ежей // Онтогенез. 1981а. Т. 12. № 2. С. 197–201.
- Шмуклер Ю.Б., Чайлахян Л.М., Смолянинов В.В. и др. Межклеточные взаимодействия у ранних зародышей морских ежей. II. Датированное механическое разделение бластомеров // Там же. 1981б. Т. 12. № 4. С. 398–403.
- McClelland J.F. The development of isolated blastomeres of frog's egg // Am. J. Anat. 1910. V. 10. P. 425–430.
- Roux W. Über die kunstliche Hervorbringung halber Embryonen durch Zerstörung einer der beiden ersten Furchungszellen, sowie über die Nachtentwicklung (Postgeneration) der fehlenden Korperehalfte // Virchows Arch. Path. Anat. Phys. 1888. Bd. 114. № 1. S. 419–521.
- Shmukler Yu.B. On the possibility of membrane reception of neurotransmitter in sea urchin early embryos // Comp. Biochem. Physiol. 1993. V. 106C. № 1. P. 269–273.
- Shmukler Yu.B., Tosti E. Serotonergic-induced ion currents in cleaving sea urchin embryo // Invertebr. Reprod. Devel. 2002. V. 42. № 1. P. 43–49.
- Shmukler Yu.B., Grigoriev N.G., Buznikov G.A., Turpaev T.M. Regulation of cleavage divisions: participation of "pre-nervous" neurotransmitters coupled with second messengers // Comp. Biochem. Physiol. 1986. V. 83C. № 2. P. 423–427.
- Shmukler Yu.B., Buznikov G.A., Whitaker M.J. Action of serotonin antagonists on cytoplasmic calcium level in early embryos of sea urchin *Lytechinus pictus* // Int. J. Devel. Biol. 1999. V. 42. № 3. P. 179–182.
- Yazaki I., Tosti E., Dale B. Cytoskeletal elements link calcium channel activity and the cell cycle in early sea urchin embryos // Development. 1995. V. 121. P. 1827–1831.

Effect of Local Microapplication of Serotonergic Drugs on Membrane Currents of *Paracentrotus lividus* Early Embryos

Yu. B. Shmukler*, E. Tosti**, and F. Silvestre**

* Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 199334 Russia

** Stazione Zoologica "Anton Dohrn", 80121 Villa Comunale, Napoli, Italia

E-mail: ybs@hotmail.ru

Abstract—It was shown that local application of agonists of the 3rd type receptors SR57277A and quipazine into the interblastomere cleft of *Paracentrotus lividus* embryos evoked specific membrane currents. At the same time, ligands of 5-HT³-receptors specifically affected the cleavage patterns of half-embryos, i.e., imitated or avoided the interblastomere signal. In the view of the data obtained, we discuss a more precise concept of protosynapse, where the distribution of membrane serotonin receptors is restricted to the period of blastomere formation during cleavage and localized in the area of interblastomere contact.

Key words: serotonin, receptors, cell interactions, cleavage-division, sea urchins.