

Данные были представлены на конференции молодых ученых
“Актуальные проблемы биологии развития”
12–14 октября 2021 г., Москва,
Институт биологии развития РАН

ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СЕРОТОНИНА В БЛАСТОМЕРАХ ПРИВОДИТ К НАРУШЕНИЯМ ПАТТЕРНА СПИРАЛЬНОГО ДРОБЛЕНИЯ У МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS*

© 2022 г. А. И. Богомолов^{а, б}, Е. Е. Воронежская^б *

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
кафедра эмбриологии, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12, Москва, 119934 Россия

^бИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

*e-mail: elena.voronezhskaya@idbras.ru

Поступила в редакцию 19.11.2021 г.

После доработки 27.11.2021 г.

Принята к публикации 03.12.2021 г.

Серотонин (5-НТ) известен как вещество с широким спектром физиологического действия. При этом его присутствие в клетках развивающегося эмбриона показано уже с самых ранних стадий развития. Однако влияние повышения уровня внутриклеточного серотонина на процессы дробления у представителей Spiralia подробно не изучалось. Мы впервые исследовали изменения в паттерне спирального дробления у пресноводного моллюска *Lymnaea stagnalis* после инкубации яиц в растворе предшественника серотонина — 5-НТР (со стадии зиготы/2 бластомеров в течение 24 ч). В ходе дробления у всех экспериментальных эмбрионов нарушалось взаимное расположение бластомеров, начиная со стадии апикальной розетки вплоть до ранней гастрюлы. Задержка цитотомии бластомеров квадрантов А и С приводила к смещению бластомеров во всех квадрантах, включая В и D, в результате чего бластомеры приобретали несвойственные им в норме контакты. Впоследствии у 80% эмбрионов экспериментальной группы происходило необратимое нарушение гастрюляции и формирование экзогастрюлы. У эмбрионов, успешно прошедших гастрюляцию, наблюдались мальформации глаз и раковины в 10–15% случаев. Наши результаты показывают, что повышение уровня внутриклеточного серотонина приводит к нарушению взаимного расположения бластомеров у представителя Spiralia, а также может приводить к нарушениям дальнейшего развития.

Ключевые слова: внутриклеточный серотонин, паттерн дробления, аномалии развития, циклопия, мальформации раковины, моллюски, Gastropoda, Spiralia

DOI: 10.31857/S0475145022020033

ВВЕДЕНИЕ

Серотонин (5-НТ) — широко распространенный моноамин, который обычно ассоциируется с передачей сигнала между нервными клетками. Кроме этого, 5-НТ является гормоном, модулирующим нейрогенез у позвоночных, начиная с дифференцировки нервных клеток до формирования цитоархитектоники зрелого мозга (Vitalis et al., 2003; Whitaker-Azmitia, 2010; Farrelly et al., 2019). Однако, серотонин выявляется в эмбрионе уже на самых ранних, донервных стадиях, а эффекты модуляции его активности сказываются на различных процессах в развитии (Buznikov et al., 2001; Бужников, 2007). В яйцеклетку, зиготу и бластомеры серотонин попадает из материнского орга-

низма, благодаря активности мембранных транспортеров (Murphy et al., 2004; Cote et al., 2007). 5-НТ внутри бластомеров обнаруживается как у позвоночных, так и у беспозвоночных животных, и является как в цитоплазме, так и в ядрах эмбриональных клеток (Ivashkin et al., 2019). В клетках взрослого организма серотонин может служить субстратом для транскламиназ — ферментов, с помощью которых происходит специфическая модификация белков — серотонилирование (Walther et al., 2011).

Серотонилирование белков существенно для регуляции долговременных, отложенных или циклических процессов (Bader, 2019). В развитии большого прудовика серотонилирование белков у эм-

брионов на стадиях раннего дробления приводило к изменению локомоторной активности развивающихся зародышей и ювенильных особей и, при определенных условиях, к возникновению необратимых нарушений гастрюляции (Ivashkin et al., 2015). События в развитии большого прудовика, предшествующие нарушению гастрюляции в случае повышения уровня серотонина в бластомерах, остались невыясненными. В частности, не были прослежены изменения, происходящие в паттерне спирального дробления.

В нашей работе мы использовали раннее развитие большого прудовика *Lymnaea stagnalis* в качестве модели для анализа влияния внутриклеточного серотонина на паттерн спирального дробления. Большой прудовик является классическим модельным объектом эмбриологии и биологии развития и его нормальное развитие достаточно хорошо изучено. В своих экспериментах мы повышали уровень внутриклеточного серотонина на ранних стадиях дробления за счет инкубации яиц в непосредственном предшественнике серотонина — 5-НТР. Расположение бластомеров на анимальном полюсе было детально картировано, отслежено их взаимное расположение у эмбрионов контрольной и экспериментальной групп. Процесс развития эмбрионов прослеживали до момента завершения метаморфоза, обращали внимание на прохождение гастрюляции, формирование раковины и глаз.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение и культивирование эмбрионов

В работе использовали эмбрионы большого прудовика — *Lymnaea stagnalis* из лабораторной культуры. Содержание животных и получение кладок проводилось согласно описанной методике (Ivashkin et al., 2015). Для синхронизации эмбриональных стадий проводился индуцированный нерест путем переноса половозрелых особей из отсеков с избытком корма (салат) в чистую отстоянную воду. Через 5 ч нахождения в чистой воде, моллюски обычно откладывали кладки практически одновременно, разница в развитии между разными кладками составляла не более 30 мин. Стадии развития эмбрионов определяли по таблице развития для большого прудовика по Мещерякову (Meshcheryakov, 1990).

Экспериментальное повышение уровня серотонина

Яйца извлекали из слизистого кокона и инкубировали 24 ч в 2 мл соответствующих свежеприготовленных растворов. Все растворы готовили на основе кипяченой и профильтрованной через бумажный фильтр водопроводной воды. Контрольную группу инкубировали в 0.1 мМ растворе аскорбиновой кислоты, а экспериментальную группу в

растворе, содержащем 0.1 мМ аскорбиновой кислоты и 1 мМ предшественника серотонина (5-НТР). Аскорбиновая кислота необходима для предотвращения окисления 5-НТР (Voronezhskaya et al., 2004). После 24 ч инкубации при 25°C яйца тщательно отмывали кипяченой фильтрованной водопроводной водой. Для последующего анализа использовали зародышей трех ранних стадий развития: на стадии формирования апикальной розетки, плоской бластулы и ранней гастрюлы (стадия 13, 15⁺⁺ и 16 по Мещерякову, соответственно). Также выделяли стадию поздней гастрюлы (стадия 18) и стадию завершения метаморфоза (стадия 27).

Иммунохимическое и гистохимическое маркирование

Для иммунохимического и гистохимического маркирования часть контрольных и экспериментальных эмбрионов, достигших соответствующих стадий развития (стадии 13–18) извлекали из яйцевых капсул путем сдавливания между двумя предметными стеклами и последующим промыванием фосфатным буфером (PBS 0.01 М, pH 7.4) через сетку с ячейкой 100 мкм. Эмбрионы фиксировали в 4% параформальдегиде на 0.01 М PBS в течение ночи при 4°C, а затем несколько раз промывали 5% раствором Triton X-100 на 0.01 М PBS. Оставшихся эмбрионов дорастивали до ювенильных стадий. Морфологию зародышей, прошедших метаморфоз, изучали под бинокляром (Olympus, SZ 60), аномалии развития документировали с помощью окулярной камеры (DCM 500, China).

Повышение внутриклеточного уровня 5-НТ контролировали маркированием эмбрионов антителами к серотонину (rabbit polyclonal antibody against 5-HT, Immunostar, Hudson, WI, #20080, разведение 1 : 1000), с дальнейшим выявлением вторичными антителами (goat anti-rabbit Alexa 488 conjugated IgG, Molecular Probes, 1 : 800). Все антитела разводили на блокирующем растворе, содержащем 0.01 М PBS, 5% BSA, 0.5% Triton X-100. Границы клеток маркировали фаллоидином (phalloidin-Alexa 488 conjugated, Sigma). Ядра клеток докрашивали DAPI. Тотальные препараты эмбрионов разных стадий развития просветляли в 80% глицерине, а затем монтировали на предметные стекла в 80% глицерине.

Анализ препаратов

Анализ препаратов проводили с помощью конфокального микроскопа (Leica TCS SP5). Полученные серии оптических срезов использовали для построения 3D изображений с помощью программного обеспечения микроскопа. 2D изображения максимальных проекций строили с помощью программы для анализа изображений ImageJ

(v 1.53) и графического редактора GIMP (v 2.10.18), компоновку рисунков проводили в программе Adobe Photoshop CS 8. Положения бластомеров описывали в соответствии с таблицами нормально-го развития *L. stagnalis* (Meshcheryakov, 1990).

На каждой стадии раннего развития было проанализировано не менее 25 контрольных и 30 экспериментальных эмбрионов. На стадии гастрюлы было проанализировано 27 контрольных и 32 экспериментальных эмбриона. До ювенильной стадии было прослежено 220 экспериментальных эмбрионов из 18 кладок. На рисунках представлены наиболее характерные эмбрионы каждой стадии развития для контрольной и экспериментальной групп.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение внутриклеточного серотонина

Инкубация в 5-НТП приводила к равномерному повышению уровня серотонина во всех бластомерах у ранних эмбрионов большого прудовика. Яркость маркирования антителами к серотонину была одинаковой в макро- и микромерах, не наблюдалось концентрации положительной реакции в каких-либо зонах бластомеров (рис. 1). Эти данные отличаются от полученных ранее результатов по инкубации эмбрионов морского брюхоногого моллюска тритонии (*Tritonia diomedea*) в 5-НТП. У эмбрионов тритонии 5-НТ в сходных условиях инкубации обнаруживался на анимальном полюсе на стадии 1–8 бластомеров и в микромерах анимального полюса на стадии морулы (Buznikov et al., 2003).

Анализ паттерна дробления на последовательных стадиях развития

При анализе паттерна расположения бластомеров на анимальном полюсе обнаружены повторяющиеся отклонения в паттерне расположения бластомеров у эмбрионов экспериментальной группы по сравнению с контрольной. Различия начинали проявляться на стадии формирования апикальных клеток розетки (стадия 13). При сравнении паттерна расположения бластомеров обнаружено, что у экспериментальных эмбрионов бластомеры $1c^{121}$, $1a^{121}$, $1d^{11}$ и $1a^{11}$ не претерпевают цитотомии, что приводит к смещению бластомера c^{111} . В результате c^{111} начинает контактировать с $1b^{112}$, чего не наблюдается в контроле (рис. 2а, 2а'). Разница в расположении бластомеров усиливается при достижении стадии плоской бластулы (стадия 15^{++}). У экспериментальных эмбрионов все еще не происходит цитотомии бластомера $1a^{11}$. В результате чего бластомеры $1a^{12112}$ и $1a^{12111}$, смещаются к клетке прототроха $1a^{21}$, а бластомер $1c^{12112}$ начинает контактировать с $1b^{12111}$ (рис. 2б'). Подобные контакты между описан-

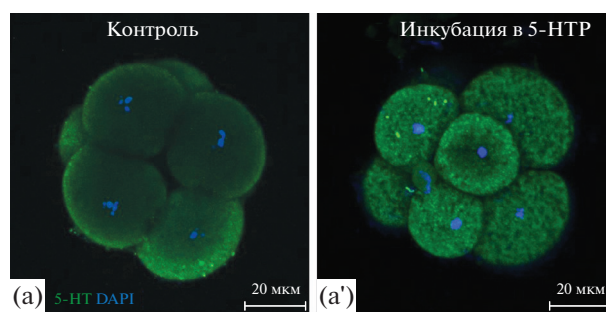


Рис. 1. Выявление внутриклеточного серотонина в эмбрионах большого прудовика на стадии 8 бластомеров. (а) Положительная реакция иммунохимического маркирования антителами к серотонину во всех бластомерах у контрольного эмбриона. (а') Равномерное повышение яркости иммунохимического маркирования после инкубации яйца в предшественнике серотонина (5-НТП, 1 мМ). Зеленый — антитела к 5-НТ, синий — DAPI. Масштабная линейка 20 мкм.

ными бластомерами никогда не наблюдаются в контрольной группе (рис. 2б). Максимально заметными изменения становятся на стадии ранней гастрюлы (стадия 16). На данной стадии у эмбрионов экспериментальной группы наблюдается ряд смещений клеток, приводящий к изменению контактов внутри квадрантов. Так, бластомер $1c^{12112}$ сдвигается в область потомков квадранта В и начинает контактировать с $1a^{1121}$. При этом бластомер $1b^{1121}$ не может контактировать с бластомером $1a^{1121}$ (в норме $1b^{1121}$ всегда контактирует с $1a^{1121}$); а бластомер $1a^{1122}$ контактирует с клеткой прототроха — $1a^{21}$, чего не встречается в контроле (рис. 2в, 2в'). После стадии ранней гастрюлы (стадия 16) смещения бластомеров могут варьировать из-за увеличивающегося числа клеток. При этом во всех случаях произошедшие ранее задержки в цитотомии в квадрантах С и А (бластомеры $1c^{121}$ и $1a^{121}$ соответственно), из-за чего смещаются отдельные бластомеры, финально приводят к существенному нарушению взаимного расположения бластомеров уже во всех квадрантах на анимальном полюсе у зародышей экспериментальной группы.

Спиральный паттерн дробления консервативен, детерминирован и устойчив. Четко определены как положения каждого нового бластомера, так и его контакты с соседними клетками. Такое взаимодействие в случае спирального дробления принципиально, поскольку изменения в контактах или взаимном расположении бластомеров на стадиях дробления приводят к различным изменениям или нарушениям в дальнейшем развитии у гастропода, в том числе у большого прудовика (Arnolds et al., 1983). Ярким примером влияния расположения бластомеров на дальнейшее развитие является изменение генетически детерминированной закрученности раковины у большо-

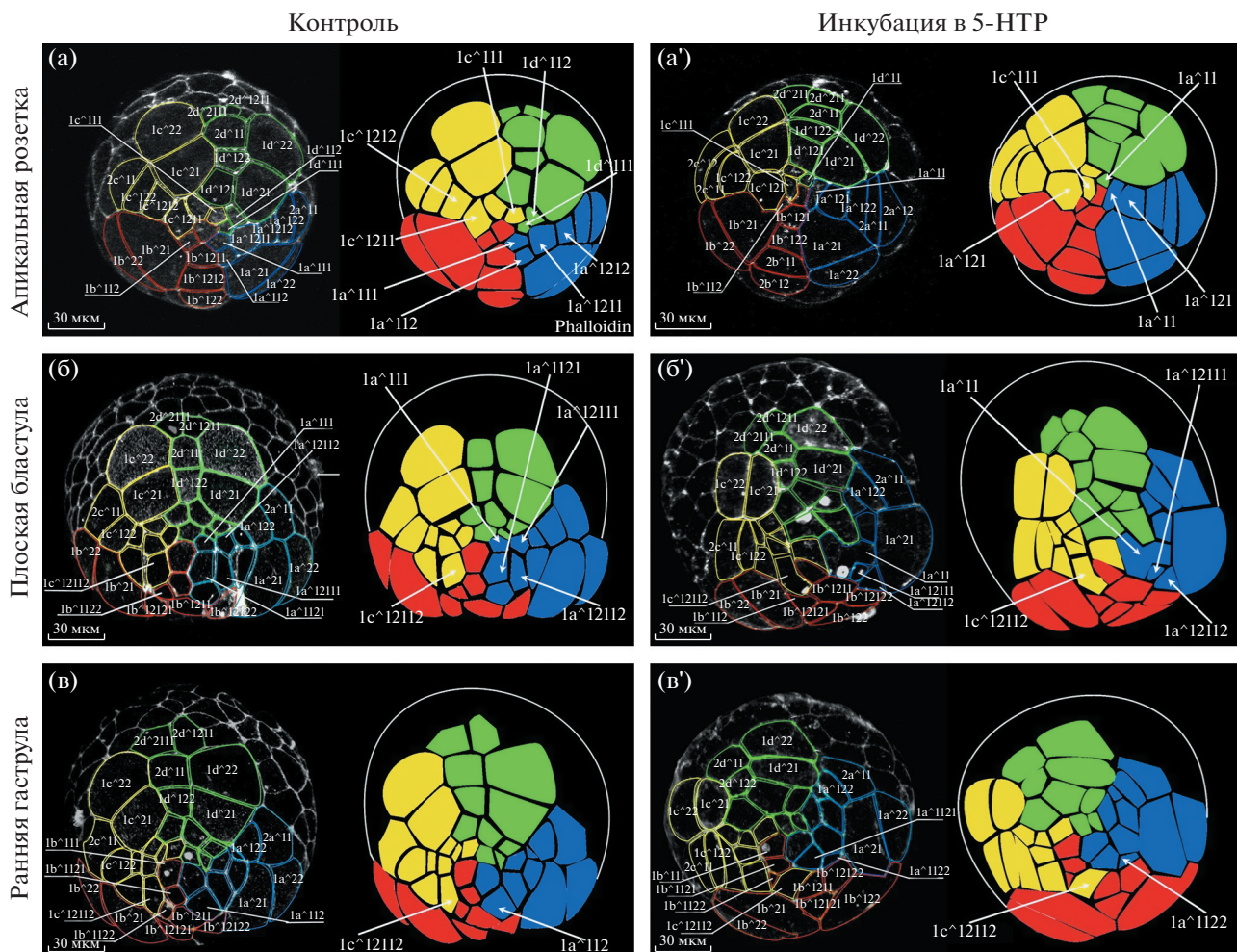


Рис. 2. При повышении внутриклеточного уровня серотонина нарушается взаимное расположение бластомеров во время спирального дробления *Lymnaea stagnalis*. Все эмбрионы представлены с анимального полюса, границы клеток промаркированы фаллоидином (белый). Синяя прорисовка – квадрант А, красная прорисовка – квадрант В, желтая прорисовка – квадрант С, зеленая прорисовка – квадрант D. (а, а') Сбой паттерна дробления начинается на стадии формирования апикальных клеток розетки (ст. 13). Стрелками указаны: задержка цитотомии бластомеров $1a^{121}$ и $1a^{11}$ (в квадранте А); не разделившийся бластомер $1c^{121}$ и смещение положения бластомера $1c^{111}$ (в квадранте С); запаздывающий в прохождении цитотомии бластомер $1d^{11}$ (в квадранте D). (б, б') Нарушения в расположении бластомеров более четко видны на стадии плоской бластулы (ст. 15⁺⁺). Стрелками указаны: все еще не поделившийся бластомер $1a^{11}$; $1a^{12112}$ и $1a^{12111}$, сместившиеся к клетке прототроха $1a^{21}$; бластомер $1c^{12112}$, сдвигающийся в сторону квадранта В. (в, в') Выраженные нарушения паттерна расположения клеток анимального полюса на стадии ранней гастрюлы (ст. 16). Стрелками указаны: бластомер $1a^{1122}$, сместившийся и контактирующий с клеткой прототроха $1a^{21}$; бластомер $1c^{12112}$, внедрившийся в квадрант В. Масштабная линейка 30 мкм.

го прудовика. Механическим смещением оси поворота микромеров относительно макромеров после третьего деления дробления можно добиться получения левозакрученных улиток в генетически правозакрученной линии. Аналогичные нарушения наблюдаются также при изменении экспрессии материнских генов (maternal effect gene), таких как *Lsdia1* and *Lsdia2*. Доказано, что ген *Lsdia1* ассоциирован с перестройкой актинового цитоскелета (Kuroda, Abe, 2020). В свою очередь,

повышение уровня внутриклеточного серотонина может приводить к долговременным изменениям в структуре актинового цитоскелета, что было показано для гладкомышечных клеток (Watts et al., 2009). Также высокий уровень серотонина оказывает влияние на свойства внеклеточного матрикса (Hummerich, Schloss, 2010) и плотность контактов между клетками (Li et al., 2016). Изменения в состоянии цитоскелета бластомеров и плотности контактов между клетками эмбриона при воздей-

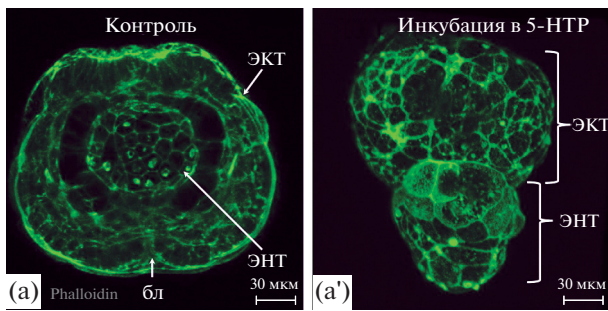


Рис. 3. Эмбрионы контрольной и экспериментальной групп на стадии поздней гастролы. Границы клеток промаркированы фаллоидином (зеленый). (а) По истечении 36 ч после появления первой борозды деления дробления эмбрионы контрольной группы проходят стадию поздней гастролы с хорошо выраженным бластопором. (а') Зародыши экспериментальной группы на той же стадии развития представляют собой две плотные шарообразные клеточные массы, скрепленные между собой в области формирования бластопора. Обозначения: бл — бластопор, энт — энтодерма, экт — эктодерма. Масштабная линейка 20 мкм.

ствии серотонина может быть одним из вероятных механизмов, лежащих в основе нарушения перемещений бластомеров во время дробления у большого прудовика. Однако это предположение требует дополнительных экспериментальных исследований.

Нарушения гаструляции и мальформации

При достижении стадии гаструлы, у 80% зародышей экспериментальных групп возникает необратимая летальная аномалия развития. На этой стадии у контрольных зародышей формируется двуслойная гаструла с хорошо выраженным бластопором (рис. 3а). В это же время экспериментальные зародыши представляют собой две плотные шарообразные клеточные массы: эктодерму и энтодерму, скрепленные между собой в области формирования бластопора (рис. 3а'). Такую аномалию развития у большого прудовика ранее описывали как экзогастролу (Raven, 1966). Формирование подобных нарушений развития было описано при кратковременной инкубации эмбрионов на стадии зиготы или 2 бластомеров в растворах LiCl (Holland et al., 2005) или азакенаулона (Kunick et al., 2003). В обоих случаях авторы предполагают вовлеченность канонического Wnt-сигнального пути в возникновение данной необратимой аномалии развития. Вопрос о влиянии серотонина на Wnt-каскад на данный момент остается открытым. Предложенная нами модель может оказаться удобной для исследований возможного взаимодействия между этими двумя регуляторными путями в процессе развития.

После стадии гаструлы эмбрионы проходят в развитии стадию велигера и великонхи, претерпе-

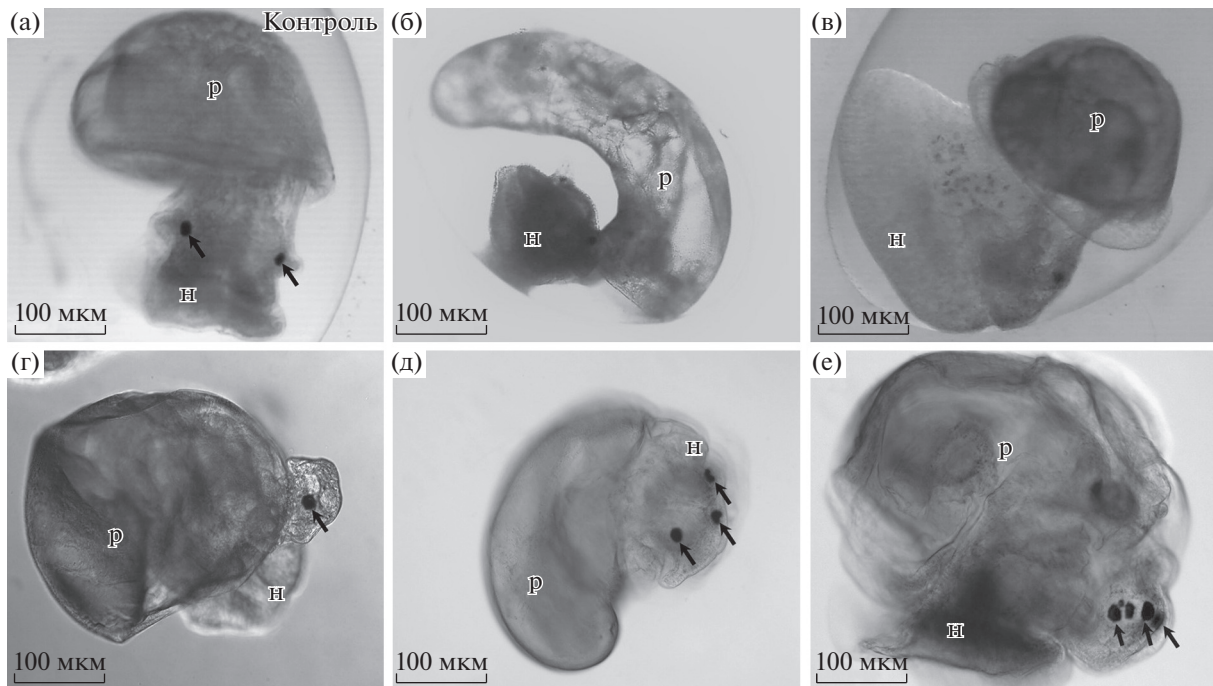


Рис. 4. Примеры мальформаций, наблюдающихся у эмбрионов экспериментальной группы после завершения метаморфоза. (а) Зародыш контрольной группы с парными темными глазами и завитками раковины. (б, в) Мальформации раковины: вытянутая раковина без завитков (б), широкая раковина без завитков (в). (г–е) Мальформации глаз: циклопия (г), формирование непарных глаз (д), формирование глаз на одной стороне (е). Масштабная линейка 50 мкм. Обозначения: черная стрелка — глаза, р — раковина, н — нога.

вают метаморфоз и еще некоторое время проводят в яйце до стадии вылупления. После прохождения метаморфоза эмбрион напоминает миниатюрную взрослую улитку: у контрольных зародышей формируются голова с щупальцами и парными темными глазами, четко выделяется нога, сформированные органы висцерального комплекса закрыты завитками раковины (рис. 4а). У 10–15% зародышей экспериментальной группы, продолживших свое развитие и успешно прошедших гастрюляцию, наблюдаются мальформации двух видов. В первом случае нарушения связаны с формированием глаз. Возможно, как формирование одного асимметричного глаза (циклопия) (рис. 4г), так и появление непарных глаз (рис. 4д), или множества глаз только на одной стороне головы (рис. 4е). Вторым типом нарушений были изменение формы раковины. Формирующаяся раковина может терять завитки, при этом завиток может быть как удлинённым (рис. 4б), так и широким (рис. 4в). Наблюдалось также расхождение витков раковины между собой при сохранении нормального числа завитков. Следует отметить, что мальформации глаз и раковины могут встречаться как раздельно, так и у одного и того же зародыша.

Ранее подобные мальформации были описаны после манипуляций с микромерами, потомками 3D-организатора, а также при изменениях в положении бластомеров на цефалической пластинке у *Lymnaea stagnalis* (Arnolds et al., 1983; Martindale et al., 1985). Авторы связывают подобные мальформации с нарушениями в дифференцировке мезодермальных и эктодермальных производных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы показали, что инкубация в предшествующей серотонина со стадии зиготы до 24 ч развития приводит к равномерному повышению уровня внутриклеточного серотонина во всех бластомерах у эмбрионов *Lymnaea stagnalis*. При этом наблюдается отклонение от классического паттерна спирального дробления, связанное с задержкой цитотомии у части бластомеров и смещением взаимного расположения бластомеров анимального полюса относительно друг друга. В последующем развитии у части эмбрионов возникают необратимые нарушения гастрюляции, мальформации глаз и раковины.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Евгению Ивашкину за плодотворную дискуссию в процессе обсуждения результатов. Авторы также выражают огромную благодарность рецензенту работы — Юлии Александровне Краус — за неоценимую помощь в прояснении подачи материала при подготовке рукописи к печати. Работа проводи-

лась с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН, в рамках выполнения ГЗ ИБР РАН № 0088-2024-0001.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского Научного Фонда № 17-14-01353.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

А.И. Богомоллов выполнил всю экспериментальную работу, подбирая пробы и участвовал в написании текста статьи. Е.Е. Воронежская разработала протокол эксперимента, участвовала в получении материала, в написании и редакции текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бузников Г.А. Донервные трансмиттеры как регуляторы эмбриогенеза. Современное состояние проблемы // Онтогенез. 2007. Т. 38. № 4. С. 262–270.
- Arnolds W.J.A., Biggelaar J.A.M. van den, Verdonk N.H. Spatial aspects of cell interactions involved in the determination of dorsoventral polarity in equally cleaving gastropods and regulative abilities of their embryos, as studied by micromere deletions in *Lymnaea* and *Patella* // Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology. 1983. № 2(192). P. 75–85.
- Bader M. Serotonylation: Serotonin signaling and epigenetics // Frontiers in Molecular Neuroscience. 2019. № 12.
- Buznikov G.A., Lambert W.H., Lauder J.M. Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis // Cell and Tissue Research. 2001. № 2(305). P. 177–186.
- Buznikov G.A., Nikitina L.A., Voronezhskaya E.E., Bezuglov V.V., Dennis Willows A.O., Nezlin L.P. Localization. Localization of serotonin and its possible role in early embryos of *Tritonia diomedea* (Mollusca: Nudibranchia) // Cell and Tissue Research. 2003. № 2(311). P. 259–266.
- Côté F., Fligny C., Bayard E. Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2007. № 1(104). P. 329–334.
- Farrelly L.A., Thompson R.E., Zhao S., Lepack A.E., Lyu Y., Bhanu N.V., Zhang B., Loh Y.-E.E., Ramakrishnan A., Vadodaria K.C., Heard K.J., Erikson G., Nakadai T., Bastle R.M., Lukasak B.G., Zebroski H., Alenina N., Bader M., Berton O., Roeder R.G., Molina H., Gage F.H., Shen L., Garcia B.A., Li H., Muir T.W., Maze I. Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIIID binding to H3K4me3 // Nature. 2019.
- Holland L.Z., Panflilio K.A., Chastain R., Schubert M., Holland N.D. Nuclear β -catenin promotes non-neural ectoderm and posterior cell fates in amphioxus embryos //

- Developmental Dynamics. 2005. № 4(233). P. 1430–1443.
- Ivashkin E., Khabarova M.Y., Melnikova V., Kharchenko O., Voronezhskaya E.E., Adameyko I. Serotonin mediates maternal effects and directs developmental and behavioral changes in the progeny of snails // Cell Reports. 2015. № 7(12). P. 1144–1158.
- Ivashkin E., Melnikova V., Kurtova A., Brun N., Obukhova A., Khabarova M.Y., Yakusheff A., Adameyko I., Gribble K., Voronezhskaya E.E. Transglutaminase activity determines nuclear localization of serotonin immunoreactivity in the early embryos of invertebrates and vertebrates // ACS Chemical Neuroscience. 2019. № 8(10). P. 3888–3899.
- Kunick C., Lauenroth K., Leost M., Maijer L., Lemcke T. 1-Azakenpaullone is a selective inhibitor of glycogen synthase kinase-3 β // Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. 2004. № 2(14). P. 413–416.
- Kuroda R., Abe M. The pond snail *Lymnaea stagnalis* // EvoDevo. 2020. № 1(11). P. 1–10.
- Martindale M.Q., Doe C.Q., Morrill J.B. The role of animal-vegetal interaction with respect to the determination of dorsoventral polarity in the equal-cleaving spiralian, *Lymnaea palustris* // Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology. 1985. № 5(194). P. 281–295.
- Meshcheryakov V.N. The common pond snail *Lymnaea stagnalis* // Animal Species for Developmental studies. Springer, Boston, MA, 1990. P. 69–132.
- Murphy D.L., Lerner A., Rudnick G., Lesch K.P. Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics // Mol. Interv. 2004. V. 4(2). P. 109–123.
- Raven C.P. Morphogenesis in *Lymnaea stagnalis* and its disturbance by lithium // J. Experimental Zoology. 1952. P. 121, 1–78.
- Vitalis T., Parnavelas J.G. The role of serotonin in early cortical development // Developmental Neuroscience. 2003. № 2–4(25). P. 245–256.
- Voronezhskaya E.E., Khabarova M.Y., Nezlin L.P. Apical sensory neurones mediate developmental retardation induced by conspecific environmental stimuli in freshwater pulmonate snails // Development. 2004. № 131(15). P. 3671–3680.
<https://doi.org/10.1242/dev.01237>
- Whitaker-Azmitia, Patricia M. Serotonin and Development // Elsevier B.V. 2010. P. 309–323.
- Walther D.J., Stahlberg S., Vowinckel J. Novel roles for biogenic monoamines: From monoamines in transglutaminase-mediated post-translational protein modification to monoaminylation deregulation diseases // FEBS J. 2011. № 24(278). P. 4740–4755.

Increased Intracellular Serotonin Level within Blastomeres Leads to Disruption in the Spiral Cleavage Pattern in the Mollusc *Lymnaea stagnalis*

A. I. Bogomolov^{1, 2} and E. E. Voronezhskaya^{2, *}

¹Department of Embryology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119934 Russia

²Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: elena.voronezhskaya@idbras.ru

Serotonin (5-HT) is known as a substance with a wide range of physiological effects. In particular, 5-HT is present in embryonic cells from the very early stages of development. However, the consequences of increased intracellular serotonin on the cleavage pattern in Spiralia have not been studied in detail. We examined the changes in the cleavage pattern in representative Spiralia – the freshwater mollusc *Lymnaea stagnalis* – after incubation of eggs in the serotonin precursor 5-HTP (from the zygote/2 blastomere stage for 24 hours). The arrangement of blastomeres was disrupted in all experimental embryos during cleavage, starting from the apical rosette stage and extending to the early gastrula. Delayed cytotomy of blastomeres in quadrants A and C resulted in the displacement of blastomeres in all quadrants, including B and D. As a result, the blastomeres acquired neighborhood contacts that they never have under normal conditions. Later, irreversible gastrulation abnormality with exogastrula formation occurred in 80% of experimental embryos. Finally, eye and shell malformations occurred in 10–15% of embryos that successfully passed gastrulation. Our results demonstrated that elevated intracellular serotonin level leads to disruption of blastomere cleavage pattern and can also induce developmental abnormalities and malformations during further development in a representative of Spiralia.

Keywords: intracellular serotonin, cleavage pattern, developmental abnormalities, cyclopia, shell malformations, molluscs, Gastropoda, Spiralia