

Б. В. ЛЕОНОВ, А. Ю. БУДАНЦЕВ

### ОБНАРУЖЕНИЕ СЕРТОНИНА В БЛАСТОЦИСТАХ КРЫС МЕТОДОМ МИКРОСПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИИ

(Представлено академиком Б. Л. Астауровым 13 VII 1970)

Известно, что серотонин обнаружен в эмбрионах некоторых групп животных (немертины, полихеты, брюхоногие моллюски, морские ежи и низшие позвоночные) уже на первых этапах эмбрионального развития<sup>(1)</sup>. Было высказано предположение об участии эндогенного серотонина в регуляции процессов раннего эмбриогенеза. Основанием явился тот факт, что некоторые антагонисты эндогенного серотонина нарушают нормальный эмбриогенез, а избыток эндогенного серотонина в нетоксических концентрациях ослабляет эмбриотоксический эффект антагонистов<sup>(1, 2)</sup>. Решение вопроса о существовании такой закономерности применительно к млекопитающим имело бы большое теоретическое и практическое значение. Ранее было установлено, что препараты хлоргидрат  $\beta$ -2-индолил-( $\alpha$ -диметил)-этиламин и хлорацизин, оказывающие антисеротониновое действие на эмбрионов морских ежей, вызывают эмбриотоксический эффект и у эмбрионов мышей, культивируемых *in vitro* со стадии 2 бластомеров до бластоцисты, и что добавление к питательной среде серотонина в нетоксических концентрациях приводит к защитному эффекту<sup>(3)</sup>. Однако определение серотонина в эмбрионах млекопитающих, и в частности в эмбрионах мышей, в период раннего эмбриогенеза затруднено. Это связано с тем, что практически очень трудно получить необходимую массу эмбрионального материала млекопитающих для определения в ней серотонина известными биохимическими<sup>(4)</sup> или биологическими<sup>(5, 6)</sup> методами исследования.

Целью настоящей работы являлось обнаружение серотонина в отдельных эмбрионах крыс на стадии бластоцисты методом микроспектрофлуориметрии. Для выявления специфического свечения серотонина применялась обработка эмбрионального материала формальдегидом по методу Фалька<sup>(7)</sup>.

Эмбрионы на стадии бластоцисты вымывались физиологическим раствором (0,86% NaCl) из рогов матки половозрелых белых нелинейных крыс, забитых с 12 до 16 час. 5-го дня беременности (1-м днем беременности считали день обнаружения во влагалищных мазках сперматозоидов). Вымывание бластоцист из рогов матки осуществлялось при помощи пастеровской пипетки в часовые стекла под микроскопом МБС-2 при температуре 35—37°. Бластоцисты, полученные от различных крыс, накапливали в 0,5 мл физиологического раствора на часовом стекле, затем их переносили для отмывания в 1,0 мл свежего физиологического раствора. Переносили бластоцисты капиллярным кончиком пастеровской пипетки в объеме физиологического раствора не более 0,5 мм<sup>3</sup>. Накопление бластоцист и отмывание их производили при комнатной температуре. Время нахождения их в этих условиях колебалось для бластоцист, вымытых у различных крыс (в течение опыта), от 3 час. до 15—20 мин. (время отмывания бластоцист 15—20 мин.). Отмытые бластоцисты, по несколько штук в объеме около 0,5 мм<sup>3</sup> физиологического раствора, переносили на поверхность покровных стекол, замораживали в жидком азоте и помещали в аппарат для лиофильной сушки. Время лиофилизации не превышало 2 час. при ва-

Таблица 1

Интенсивность флуоресценции бластоцист (б) и фона (ф)  
(в относительных единицах)

№ бластоциста	$I_b$	$I_b + I_f$	$I_f$	№ бластоциста	$I_b$	$I_b + I_f$	$I_f$
Обработанные бластоцисты				Контрольные бластоцисты			
1	10	38	28	1	5	27	22
2	8	36	28	2	4	26	22
3	12	40	28	3	4	26	22
4	21	47	26	4	1	22	21
5	18	44	26	5	0	21	21
6	16	42	26	6	3	20	17
7	28	51	23	7	3	20	17
8	17	40	23	8	1	24	23
9	12	35	23	9	5	28	23
10	26	49	23	10	2	25	23
11	13	36	23	11	2	25	23
12	19	42	23	12	9	34	25
13	23	46	23	13	8	33	25
14	22	45	23	14	6	31	25
15	20	43	23	15	5	30	25
16	25	43	23	16	9	34	25
17	18	42	24	17	6	31	25
18	28	52	24	18	4	29	25
19	34	58	24	19	4	29	25
20	30	54	24	20	5	33	28
21	36	60	24	21	8	36	28
22	36	60	24	22	4	32	28
23	21	48	27	23	4	32	28
24	22	49	27				
25	24	52	28				
Среднее	21,6	46,2	24,6	Среднее	4,3	28,1 $t = 7,9$	23,7 $t = 1,29$

куме в сушильной камере  $1 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-5}$  мм рт. ст. Лиофилизированные бластоцисты распределяли в две группы. Одну из них подвергали обработке газообразным формальдегидом в течение 1 часа при температуре  $80^\circ$  — серия «обработанных» бластоцист. Бластоцисты из серии «контрольных» такой обработке не подвергались (за исключением нагревания). После обработки препараты заключали в парафиновое масло, и исследовалась их флуоресценция. Микроспектрофлуориметрия была проведена на микроспектрофлуориметре, изготовленном на базе микроскопа МЛД-1 и интерференционных светофильтров. Фотометрируемая площадь в плоскости препарата была равна  $75 \times 75$  м. Для возбуждения флуоресценции применялась ртутная лампа ДРШ-250 и набор светофильтров: СЗС14 — 4 + СЗС-7 — 2 + ФС1 — 4. В качестве запирающего светофильтра был использован фильтр ЖС-18. Для выделения узкой спектральной полосы (527 м), характерной для флуоресценции комплекса серотонин + формальдегид (8), использовался интерференционный светофильтр, помещенный перед фотоумножителем ФЭУ-25, сигнал с которого, предварительно усиленный на ЛПУ-0,1, записывался на самописце ЭПШ-09—3 м. Интенсивность флуоресценции препаратов выражалась в относительных единицах.

Фотографирование флуоресценции бластоцист было произведено на микроскопе МЛ-22 (на негативной пленке РФ-3). Полученные данные обработаны при помощи критерия Стьюдента.

Как видно из табл. 1, средняя интенсивность флуоресценции бластоцист из серии обработанных в пять раз выше интенсивности флуоресценции бластоцист из серии контрольных. Различие между интенсивностью флуоресценции бластоцист и фона из серии обработанных и флуоресцен-

ции бластоцист и фона из серии контрольных достоверно (при 5% уровне значимости). Различие в интенсивности флуоресценции фона в сериях обработанных и контрольных недостоверно.

Морфологическая картина отдельных бластоцист из серии обработанных приведена на рис. 1. (см. вкл. к стр. 717). Фотографии бластоцист из серии контрольных не даны, так как между интенсивностью флуоресценции бластоцист и фона нет выраженного различия, и это не позволяет получить удовлетворительных впечатлений. В бластоцистах на рис. 1 видна флуоресценция клеток внутренней клеточной массы, а также контур, образованный трофобластическими клетками. Флуоресценция клеток внутренней клеточной массы неравномерна, видны отдельные, наиболее светящиеся гранулы. Вокруг бластоцист обнаруживается едва заметный контур флуоресценции. Размеры бластоцист, приведенных на рис. 1, почти вдвое меньше нефиксированных. Размер интактных бластоцист колеблется от 150 до 200  $\mu$ .

Можно полагать, что обнаруженная нами флуоресценция бластоцист крыс, измеренная в области 527 м $\mu$ , связана с флуоресценцией комплекса серотонин + формальдегид. Таким образом, в бластоцистах, по-видимому, содержится серотонин или серотониноподобное вещество. Интенсивность флуоресценции бластоцист была намного слабее флуоресценции некоторых энтерохромаффинных (клетки Кульчинского) и нервных клеток, наблюдавшейся в наших предварительных исследованиях (А. Ю. Буданцев), что, видимо, свидетельствует о меньших концентрациях серотонина в бластоцистах крыс. Если для эмбрионов морского ежа не возникает сомнений относительно характера происхождения серотонина (он может быть только эндогенным), то на вопрос о происхождении серотонина в бластоцистах крыс нельзя дать однозначного ответа, так как остается, хотя и очень малая, вероятность накопления экзогенных моноаминов из полости рогов матки. Существование моноаминов, в частности порадrenalина, в миометрии кроликов (в области адренэргических нервных окончаний) подтверждено методом флуоресцентной микроскопии<sup>(9)</sup>. Ответить на вопрос о происхождении серотонина в бластоцистах млекопитающих можно исследуя его флуоресценцию в эмбрионах, культивируемых *in vitro* со стадии 2—8 бластомеров. Нарастание интенсивности флуоресценции к моменту формирования стадии бластоцисты подтвердило бы эндогенность серотонина.

Всесоюзный научно-исследовательский  
институт акушерства и гинекологии  
Москва

Поступило  
7 VII 1970

Институт биологической физики  
Академии наук СССР  
Пушино-на-Оке

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Г. А. Бузников, Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития, М., 1967. <sup>2</sup> Г. А. Бузников, ДАН, 152, 1270 (1963). <sup>3</sup> Б. В. Леонов, А. П. Камахин, Г. А. Бузников, ДАН, 188, 958 (1969). <sup>4</sup> С. Юдепфренд, Флуоресцентный анализ в биологии и медицине, М., 1965. <sup>5</sup> J. R. Vane, Brit. J. Pharmacol., 12, 344 (1957). <sup>6</sup> Б. Н. Манухин, Г. А. Бузников, Физиол. журнал СССР, 46, 1160 (1960). <sup>7</sup> V. Falck, Ch. Owman, Acta Universitatis Lundensis, Sec. II, № 7, 1 (1965). <sup>8</sup> H. Corrodi, G. Jonsson, J. Histochem. Cytochem., 15, 65 (1967). <sup>9</sup> N. O. Sjöberg, Acta endocrinologica, 57, 405 (1968).