ОНТОГЕНЕЗ, 2023, том 54, № 5, с. 358–367

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 611.013.9+611.012.2

Материалы юбилейной научной конференции "Николай Константинович Кольцов и биология XXI века", 3–8 октября 2022 г.

НЕСТАБИЛЬНОСТЬ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ МАТЕРИ ПРИВОДИТ К СНИЖЕНИЮ УСТОЙЧИВОСТИ РАЗВИТИЯ У *Lymnaea stagnalis* (MOLLUSCA: GASTROPODA)

© 2023 г. А. И. Богомолов[a, b], Ю. А. Краус[a, b], Е. Е. Воронежская[b, *]

[a] *Московский государственный, университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия*

[b] *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия*

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

Поступила в редакцию 11.11.2022 г.
После доработки 11.12.2022 г.
Принята к публикации 12.12.2022 г.

Адаптивные материнские эффекты, повышающие приспособленность потомков, часто бывают обусловлены долговременными стрессовыми воздействиями среды обитания на материнский организм. Возникает вопрос – всегда ли эффекты такого стресса адаптивны для потомства и в каких случаях они могут приводить к нарушениям развития? Одним из стрессирующих факторов считается непредсказуемое изменение условий среды. Нашей задачей было проверить, может ли обитание матери в нестабильной среде приводить к снижению устойчивости эмбрионального развития у ее потомков. Материнская популяция брюхоногого моллюска *Lymnaea stagnalis* была разделена на две группы с различными условиями содержания. Для первой группы условия поддерживались максимально стабильными, с постоянным протоком воды и избыточным кормлением. Вторая группа содержалась в нестабильных (стрессовых) условиях, с эпизодическими кормлением и сменой воды. Оказалось, что сами по себе нестабильные условия не влияют на частоту аномалий развития у потомков. Поскольку ранее нами было показано, что роль сигнального фактора, опосредующего материнский эффект у *L. stagnalis* выполняет серотонин, мы подвергли эмбрионов обеих групп дополнительному воздействию – инкубации в растворе биохимического предшественника серотонина (5-HTP). После инкубации в 5-HTP доля эмбрионов с аномалиями развития была значимо выше среди потомков матерей, обитавших в нестабильных условиях. Мы подтвердили важную роль серотонина как фактора, опосредующего связь между организмами матери и потомков, выявив серотонинергическую иннервацию ткани гермафродитной железы (овотестиса) и аккумуляцию серотонина в цитоплазме формирующихся ооцитов. Наши эксперименты позволяют предположить, что при стрессовом воздействии условий среды на материнский организм аккумуляция серотонина яйцеклеткой/зиготой может повышаться до неадаптивного уровня и приводить к снижению устойчивости развития эмбрионов.

Ключевые слова: материнские эффекты, устойчивость развития, аномалии развития, материнский серотонин, Gastropoda, *Lymnaea stagnalis*

DOI: 10.31857/S047514502305004X, **EDN:** KICFMT

ВВЕДЕНИЕ

Эмбриональное развитие – необычайно пластичный процесс, на протекание которого влияют как факторы внешней среды, так и сигналы, поступающие из материнского организма. Материнские эффекты – влияние фенотипа матери (в том числе ее состояния, обусловленного средой) на фенотип потомства – важны при рассмотрении вопросов эволюционной биологии, особенно касающихся эволюции адаптивного фенотипа (Sheriff et al., 2017; Moore et al., 2019). Наиболее очевидно влияние материнских эффектов при развитии эмбриона внутри организма матери, как, например, у млекопитающих или ветвистоусых ракообразных с выводковыми камерами. Однако появляется все больше данных о том, что материнские эффекты реализуются также в тех слу-

чаях, когда внутри организма матери происходит только оогенез, а развитие эмбриона протекает в окружающей среде (Love et al., 2013). Уже несколько десятилетий активно обсуждается, насколько велико адаптивное значение материнских эффектов (Marshall, Uller, 2007). Вероятно, адаптивные материнские эффекты, повышающие приспособленность потомков, обусловлены стрессовыми условиями, присутствующими и сохраняющимися в среде обитания достаточно длительное время. В таком случае обеспечивается "программирование" потомства, т.е. его подготовка к обитанию в неблагоприятной среде (Moore et al., 2019).

Воздействие материнского стресса на физиологию и поведение потомства изучают, в основном, на позвоночных. Множество работ посвящено "программированию" потомства с помощью глюкокортикоидной гормональной системы (Sheriff, Love, 2013). Один из самых известных примеров – цикл исследований в канадской популяции белки *Tamiasciurus hudsonicus* (Dantzer et al., 2013; 2022). У матери-бельчихи, испытывающей стресс в условиях высокой плотности популяции, повышается концентрация кортизола в молоке. В результате ее потомки-бельчата быстрее растут и раньше приступают к захвату территории (Dantzer et al., 2013).

Среди беспозвоночных в отношении материнских эффектов хорошо изучен пресноводный моллюск *Lymnaea stagnalis* (большой прудовик). У этого вида показано влияние уровня серотонина в организме матери на развитие и формирование поведенческих программ потомков (Ivashkin et al., 2015). Уровень серотонина в организме взрослого моллюска зависит от сезона: он максимален в весенне-летние месяцы и минимален в осенние. При этом весенне-летние потомки наиболее активны, стремятся вылезти к кромке воды, лучше переносят гипоксию. В то же время осенние потомки большую часть времени проводят на дне водоема и больше едят. Обе программы развития представляются достаточно адаптивными для соответствующего сезона. Однако, уровень серотонина в организме матери очень лабилен. Он может повышаться не только в зависимости от времени года, но и при наступлении стрессовых условий, например, при недостатке пищи (Josse et al., 1968; Steen et al., 1973). В то же время экспериментально показано, что повышение уровня серотонина в клетках раннего эмбриона приводит к существенному повышению количества аномалий развития (Ivashkin et al., 2015). При этом в норме морфологические аномалии возникают у большого прудовика крайне редко (менее 0.001%). Неизбежно возникает вопрос – где проходит та грань, после которой материнские эффекты (в нашем случае опосредованные изменением уровня серотонина) перестают быть адаптивными для потомства и приводят к нарушениям развития?

Нашей задачей было проверить, может ли обитание матери в нестабильной среде приводить к снижению устойчивости эмбрионального развития *L. stagnalis*. Известно, что непостоянство среды обитания – один из универсальных стрессовых факторов. Это может быть меняющаяся доступности пищи, уровень загрязнения воды продуктами жизнедеятельности, громкие звуки, меняющееся освещение (Sheriff et al., 2017). В нашем исследовании мы варьировали два параметра: доступность пищи и уровень загрязненности воды, в которой живут половозрелые особи. Исходя из того, что одним из сигнальных факторов, опосредующих материнские эффекты у *L. stagnalis*, является серотонин (Ivashkin et al., 2015), мы подвергали эмбрионов дополнительному воздействию – инкубации в растворе биохимического предшественника серотонина (5-HTP) (Bogomolov, Voronezhskaya, 2022). Далее мы оценивали частоту встречаемости морфологических аномалий в каждой из экспериментальных и контрольных групп. Нам удалось показать, что обитание матери в нестабильной среде может приводить к неадаптивным материнским эффектам, а именно к снижению устойчивости эмбриогенеза, что проявляется как значимое увеличение частоты встречаемости аномалий развития.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование материнских особей

Лабораторная культура большого прудовика *Lymnaea stagnalis* получена из маточного стада, содержащегося в Университете г. Амстердам, и поддерживается в Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова с 1996 г. Взрослые особи содержатся в аквариумах при температуре 22 ± 0.1°C со сменяемой фильтрованной водопроводной водой, аэрацией и освещением в течение всего года 16 : 8. Кормление животных и отбор кладок производится два раза в неделю.

Индуцированный нерест и содержание кладок

Для получения эмбрионов с синхронным развитием, моллюсков переносили в чистую отстоянную воду. Через 5 ч нахождения в чистой воде, моллюски откладывают кладки практически одновременно. После получения кладок животных сразу перемещали обратно, в условия, соответствующие каждой экспериментальной группе.

Первое деление дробления в разных кладках начиналось с разницей не более 30 мин. Стадии развития эмбрионов определяли по таблице нормального развития большого прудовика (Meshcheryakov, 1990). Кладки содержали в термостате при температуре 25°C. В норме при 25°C

развитие от стадии двух бластомеров до вылупления личинки из яйца занимает 12 дней. Раннее дробление завершается через 24 ч после формирования первой борозды делений дробления, гаструляция проходит в интервале 24–36 ч, формирование раковины, глаз, щупалец начинается на 3–4-й день развития.

Экспериментальное изменение физиологического состояния материнского организма

Схема проведения эксперимента представлена на рис. 1. Всего было проведено 5 независимых повторов эксперимента. Из маточного стада сформировали 2 группы половозрелых улиток, по 36 особей в каждой (рис. 1). Улиток каждой группы помещали в контейнеры по 6 штук. Для воздействия на их физиологическое состояние условия содержания меняли двумя способами. В первой группе (СС, стабильная среда) все контейнеры с улитками помещали в установку с непрерывным протоком воды и кормили в избытке (рис. 1). Во второй группе (НС, нестабильная среда) контейнеры были изолированы от проточной системы, смену воды (2 л) проводили раз в три дня, корм давали во время смены воды (рис. 1). Количество корма рассчитывалось таким образом, что основную его массу сидящие в контейнере улитки съедали в течение первого дня.

Кладки получали методом индукции, описанным выше. Для проведения экспериментов с эмбрионами от группы СС и группы НС случайным образом отбирали по 10 кладок (рис. 1). Кладки группы СС составляли группу НТР-СС, а кладки группы НС составляли группу НТР-НС. Каждую из кладок делили пополам: половина кладки использовалась в опыте (группы НТР-СС-опыт и НТР-НС-опыт), половина – в контроле (группы НТР-СС-контроль и НТР-НС-контроль) (рис. 1).

Экспериментальное повышение уровня серотонина в клетках эмбрионов

Для экспериментального повышения уровня серотонина у зародышей использовали ранее отработанную методику (Ivashkin et al., 2015). Яйца извлекали из коконов и переносили в чашки Петри (3 см в диаметре) с 2 мл инкубационного раствора. В контроле (рис. 1, НТР-СС-контроль и НТР-НС-контроль) в качестве инкубационного раствора использовали кипяченую фильтрованную воду с 0.1 мМ аскорбиновой кислоты. В опыте (рис. 1, НТР-СС-опыт и НТР-НС-опыт) использовали раствор 1 мМ предшественника серотонина (5-НТР) и 0.1 мМ аскорбиновой кислоты. Аскорбиновая кислота использовалась для предотвращения окисления 5-НТР. Через 24 ч инкубации яйца тщательно отмывали кипяченой фильтрованной водопроводной водой и продолжали инкубировать в тех же условиях до завершения развития (стадия 29 по Мещеряков, 1990). Морфологию эмбрионов анализировали под стереомикроскопом Olympus SZ 60 (Japan). Морфологическими аномалиями считали отклонения в строении эмбрионов от описанного ранее для нормального развития (Bogomolov, Voronezhskaya, 2022).

Иммунохимическое выявление серотонина в гонадах

Взрослых особей анестезировали охлаждением на льду. Гонады извлекали вместе с окружающей тканью печени, расправляли на подложке из полимеризованного силикона и немедленно фиксировали в 4% параформальдегиде на 0.01 М фосфатном буфере (PBS, pH 7.4). Через 4 ч ткань отмывали в PBS с добавлением Тритон X-100 (PBT) и выдерживали в 1% тритоне на PBS в течение трех суток. Затем ткань отмывали PBS, пинцетом убирали излишки ткани, окружающей гонады. Очищенную ткань гонад инкубировали в растворе первичных антител против серотонина (Immunostar, Hudson, WI, #20080) 1 : 2000 на PBT с 5% бычьего сывороточного альбумина в течение 3-х суток. Затем ткань 3 раза отмывали PBT и инкубировали во вторичных антителах, конъюгированных с флуорофором (goat anti-rabbit Alexa 488, Invitrogen, A11008) 1 : 600 на PBT в течение суток. Затем ткань тщательно отмывали в PBS, докрашивали ядра DAPI (0.001%) и помещали в 90% глицерин на PBS для просветления. Через 2 сут ткань анализировали с использованием конфокального микроскопа Zeiss 880 (Carl Zeiss, Germany) с применением соответствующего набора фильтров. Финальные изображения получали с использованием программного обеспечения ZEN.

В качестве контроля специфичности антител использовали тот же самый протокол, но без шага инкубации тканей в первичных антителах против серотонина. В этом случае никакой положительной реакции в ткани обнаружено не было.

Статистический анализ результатов

Плодовитость (среднее число кладок на улитку и среднее число яиц в кладке) сравнивалась между группами СС и НС с помощью теста Манна–Уитни (программный пакет GraphPad Prism 8.0). Процентную долю морфологических аномалий у эмбрионов подсчитывали в каждой из 5 повторностей эксперимента (опыт и контроль). Всего было проанализировано 2947 эмбрионов группы НТР-СС (1467 опыт и 1480 контроль) и 2948 эмбрионов группы НТР-НС (1479 опыт и 1469 контроль). Сравнение частот встречаемости аномалий развития у эмбрионов двух групп выполняли с помощью точного критерия Фишера (Fisher's exact

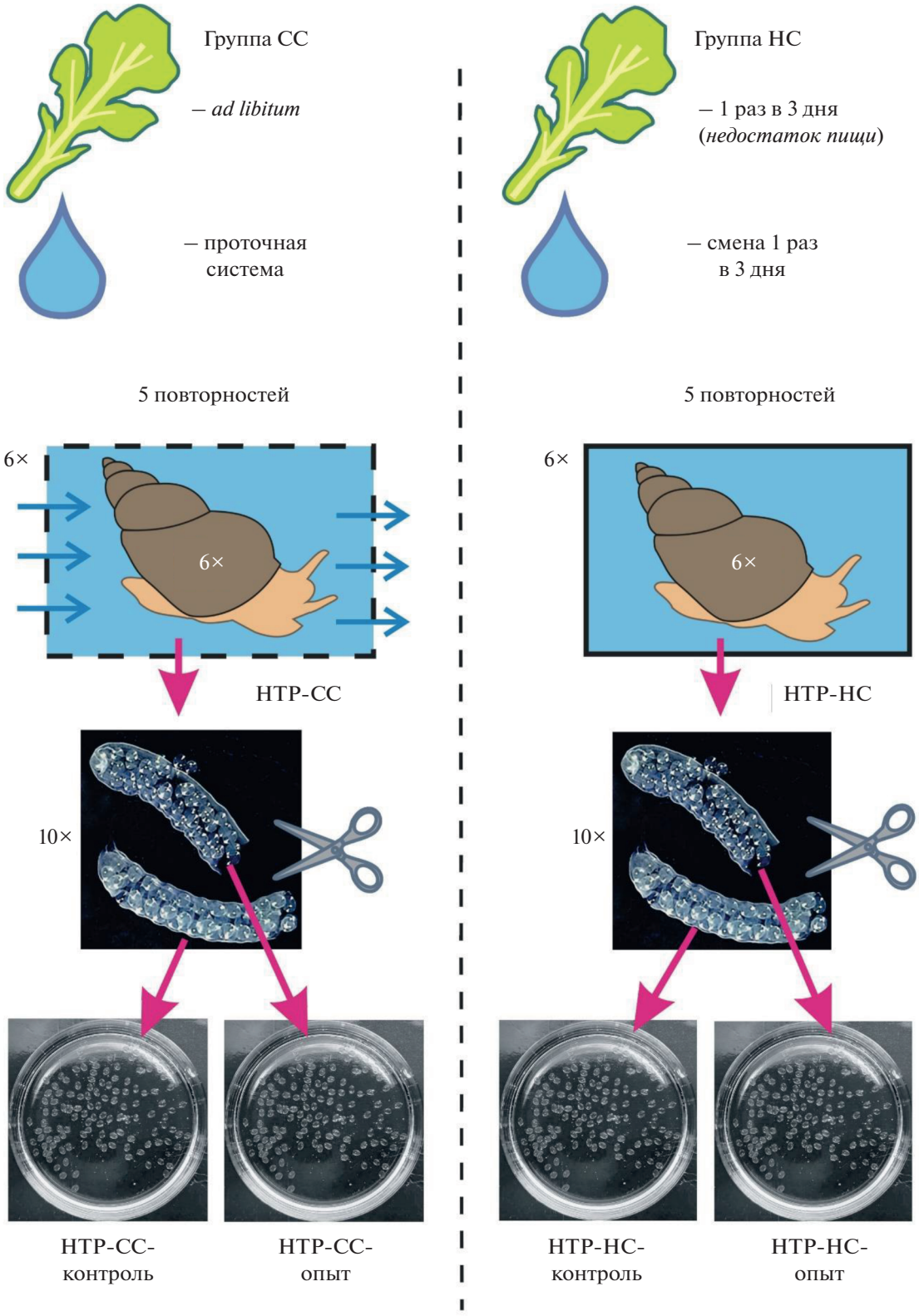


Рис. 1. Схема эксперимента по изменению физиологического состояния организма материнских особей *L. stagnalis*. Первая группа, СС – взрослые улитки содержались в стабильных условиях, то есть в среде с постоянно доступной пищей и стабильно низким уровнем загрязнения воды. Вторая группа, НС – улитки содержались в нестабильных условиях, моделирующих стрессовые воздействия (смена воды и кормление раз в три дня, причем пищи хватало только на первый день).

Таблица 1. Сравнение процентных долей эмбрионов с аномалиями развития в группах НТР-СС-опыт и НТР-НС-опыт (попарное сравнение повторностей экспериментов)

	НТР-НС-опыт *эмбрионы с аномалиями развития (%)*					
НТР-СС-опыт *эмбрионы с аномалиями развития (%)*	**повторности**	**57%**	**67%**	**61%**	**78%**	**69%**
	15%	4.16E-26*	3.42E-36	3.78E-31	1.06E-55	4.50E-41
	21%	1.46E-18	8.82E-28	3.96E-23	9.84E-46	3.63E-32
	18%	5.91E-21	2.26E-30	1.70E-25	1.67E-48	1.15E-34
	37%	5.74E-10	2.77E-17	1.32E-13	5.38E-32	8.43E-21
	29%	1.12E-12	9.70E-21	1.04E-16	7.31E-37	8.97E-25

* Приведены уровни значимости различий (*p*-levels) между группами НТР-СС-опыт и НТР-НС-опыт (попарно сравнивались отдельные повторности экспериментов); уровни значимости скорректированы с помощью метода Бонферони.

test), используя онлайн калькулятор https://www.medcalc.org/calc/fisher.php. Друг с другом сравнивались все повторности групп НТР-СС-опыт и НТР-НС-опыт т.е. было выполнено 25 сравнений. С учетом множественности сравнений проводилась корректировка уровней значимости различий. Корректировка выполнялась методом Бонферони (Bonferroni correction) и методом FDR (false discovery rate) с помощью скрипта, созданного в среде языка R (в табл. 1 приведены p-levels, скорректированные более жестким методом Бонферони). Скрипт был любезно предоставлен нам В.Г. Гриньковым.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исходя из того, что нестабильность среды обитания – один из универсальных стрессовых факторов (Sheriff et al., 2017), мы разделили материнскую популяцию улиток на две группы. Условия содержания различались двумя характеристиками: доступностью пищи и уровнем загрязненности воды, в которой живут половозрелые особи. Для первой группы (стабильная среда, СС, рис. 1) условия поддерживались максимально стабильными. Уровень загрязненности воды был низким и постоянным за счет использования проточной системы, а пища была всегда доступна за счет избыточного кормления. Вторая группа (нестабильная среда, НС, рис. 1) содержалась в постоянно меняющихся условиях. Замена воды происходила только раз в три дня, что делало уровень ее загрязнения нестабильным; кормление проводились тоже раз в три дня, причем еды давалось столько, чтобы ее хватало только на один день. Таким образом, для второй группы моделировались условия, создающие стрессовую ситуацию.

На первом этапе нашего исследования мы проверили, в какой степени нестабильная среда в наших экспериментах влияет на физиологическое состояние взрослых особей *L. stagnalis*. Известно, что хорошим индикатором физиологического состояния улиток является плодовитость – лабильный признак, зависящий от внешних условий. Так, плодовитость *L. stagnalis* снижается до нуля при достижении критически низкой температуры (Ivashkin et al., 2015). Также она понижается при воздействии таких сильных стрессовых факторов как прерывание процесса дыхания (Lukowiak et al., 2014), освещение ярким светом (собственные наблюдения) или длительное голодание (Joosse et al., 1968; Van der Steen et al., 1973). В наших экспериментах плодовитость в группах СС и НС достоверно не различалась. Она составляла, в среднем, 0.34 ± 0.05 для СС ($n = 24$, min = 0.25, max = 0.42) и 0.36 ± 0.05 для НС ($n = 24$, min = 0.25, max = 0.43) кладки на улитку за один индуцированный нерест. Размер кладок в группах СС и НС также достоверно не отличался. Он составлял 72 ± 8 ($n = 24$, min = 61, max = 86) и 74 ± 10 ($n = 24$, min = 61, max = = 92) яйца, соответственно. Это позволяет считать, что при обитании материнских особей в условиях нестабильного получения пищи и загрязненности воды их физиологическое состояние находится в пределах описанного в литературе для данного вида (Meshcheryakov, 1990). С другой стороны, периодическое голодание существенным образом сказывается на различных физиологических характеристиках *L. stagnalis*, например, на способности к формированию условного рефлекса и запоминанию (Ito et al., 2017). Поэтому обитание в нестабильных условиях можно считать равнозначным слабому стрессу (mild stress).

Далее мы оценили устойчивость развития эмбрионов, полученных от матерей из группы СС и группы НС. Для этого мы разделили каждую из кладок на две части (рис. 1). Половина каждой кладки развивалась без каких-либо дополнительных воздействий (НТР-СС-контроль и НТР-НС-контроль). У эмбрионов и личинок этих групп не было выявлено ни одного случая аномалий развития. Напомним, что в каждую из этих групп входило

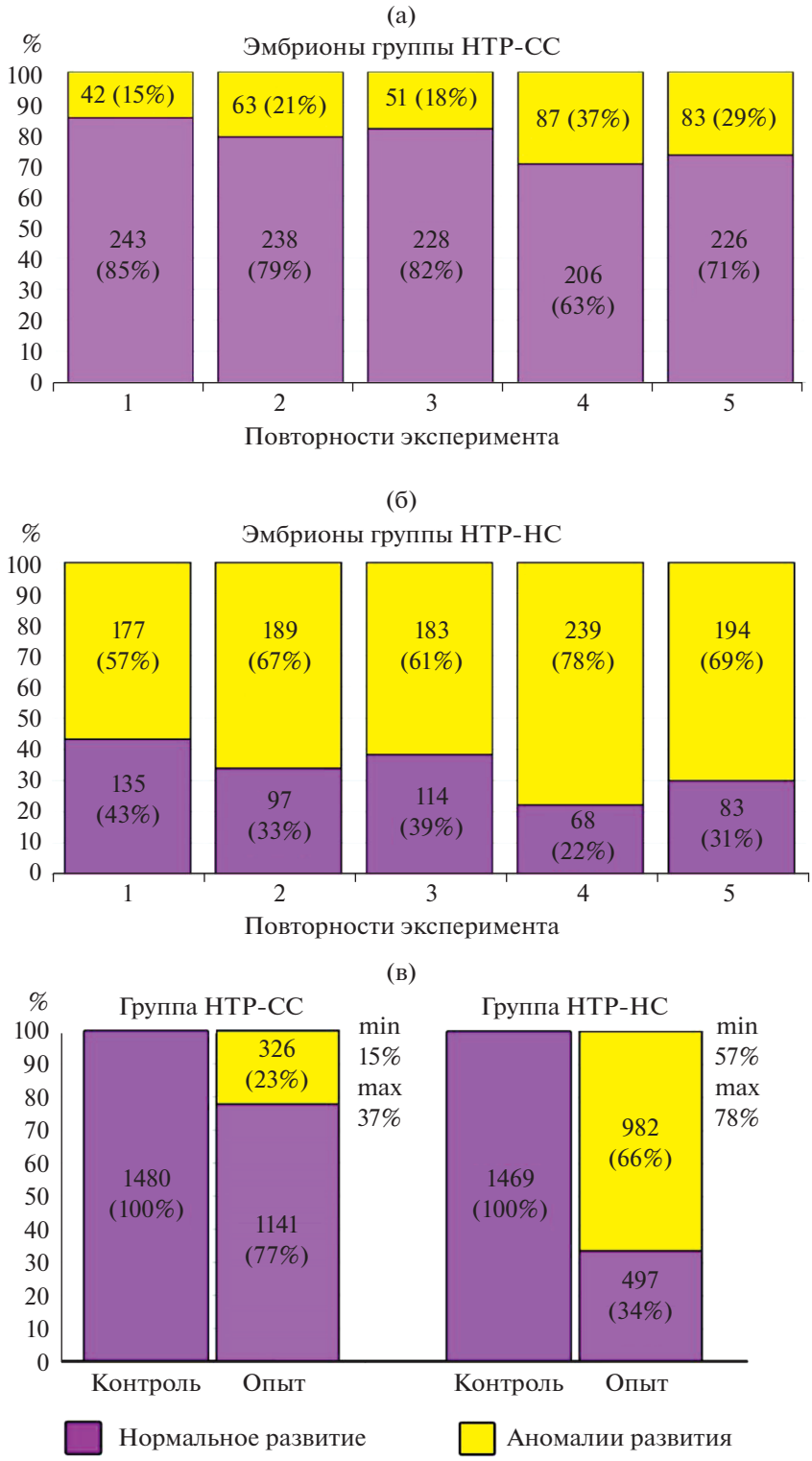
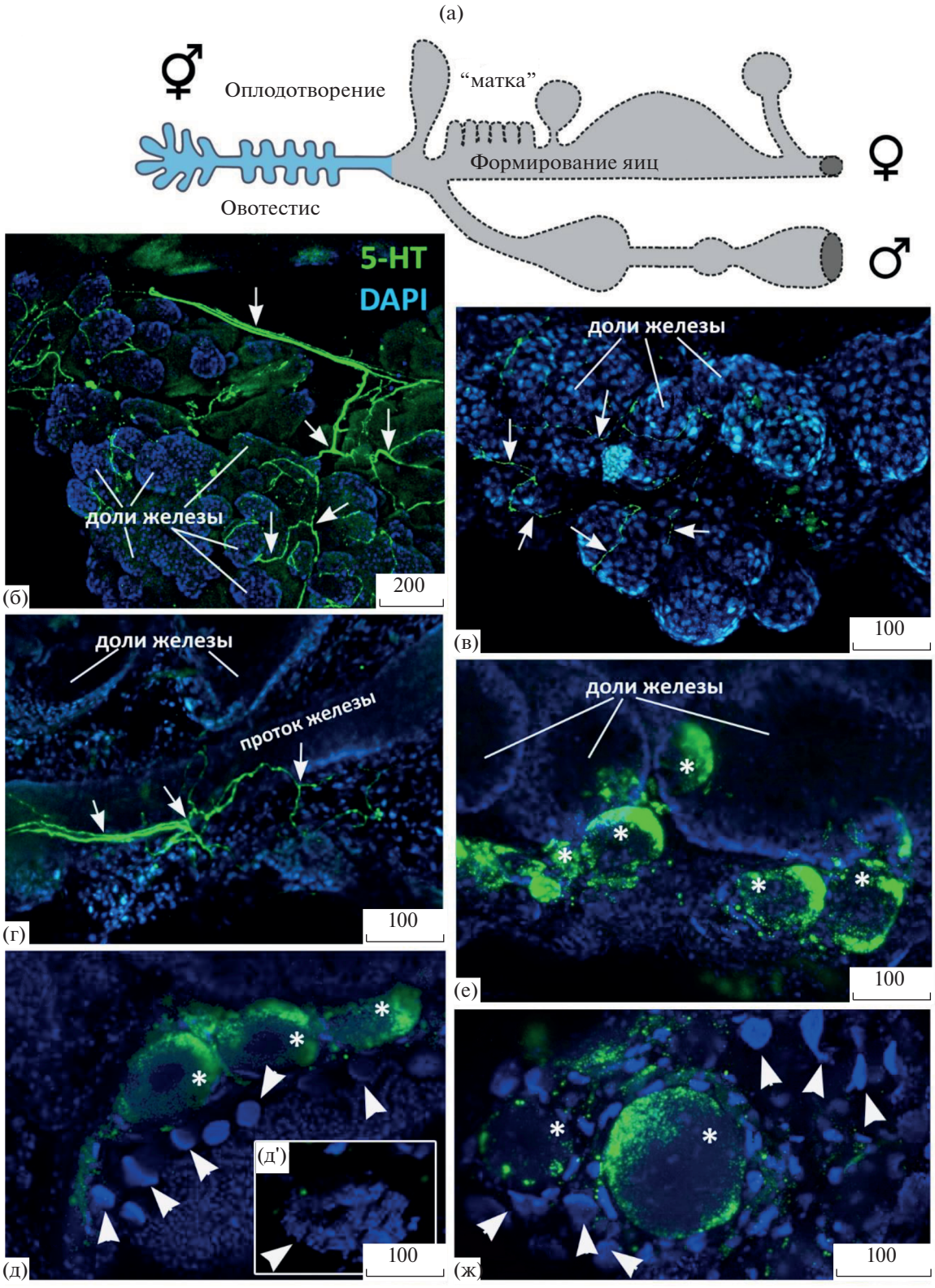


Рис. 2. Результаты экспериментов по воздействию на эмбрионы *L. stagnalis* биохимического предшественника серотонина (5-НТР). Группа НТР-СС – потомство улиток, содержавшихся в стабильной среде, группа НТР-НС – потомство улиток, содержавшихся в нестабильной среде. На диаграммах (а) и (б) в каждом столбике показано число и процентная доля эмбрионов данного фенотипа в данной повторности. На (в) приведены данные по всем повторностям эксперимента; внутри каждого столбика показаны число и среднее значение доли эмбрионов данного фенотипа; сбоку от столбиков – минимальное и максимальное значение доли эмбрионов с аномалиями развития.


(а)
Оплодотворение
“матка”
Формирование яиц
Овотестис
5-HT
DAPI
доли железы
200
(б)
доли железы
100
(в)
доли железы
проток железы
100
(г)
доли железы
100
(е)
(д')
100
(д)
100
(ж)

более 1000 эмбрионов (1480 HTP-CC-контроль и 1469 HTP-HC-контроль). Таким образом, само по себе обитание матери в нестабильных условиях не приводит к появлению у потомков аномалий развития.

Известно, что уровень серотонина в организме матери зависит как от ее физиологического состояния, так и от сезона года: он повышается в стрессовых условиях и в летний период (Josse et al., 1968; Steen et al., 1973; Ivashkin et al., 2015). С другой стороны, именно серотонин является наиболее вероятным сигнальным фактором, опосредующим материнские эффекты у *L. stagnalis*. С учетом этого, мы решили проверить, как будут реагировать на повышение уровня внутриклеточного серотонина эмбрионы, являющиеся потомками улиток из групп CC и HC. Мы подвергли половину каждой из кладок, полученных от моллюсков обеих групп, инкубации в биохимическом предшественнике серотонина, 5-HTP (группы HTP-CC-опыт и HTP-HC-опыт, см. рис. 1). Экспериментально вызванное повышение уровня внутриклеточного серотонина приводило к появлению аномалий развития как в группе HTP-CC-опыт, так и в группе HTP-HC-опыт (рис. 2). В обеих группах наблюдались эмбрионы с нарушениями гаструляции, в частности, так называемые “экзогаструлы”. При прохождении органогенезов появлялись эмбрионы с нарушениями осморегуляции, проявлявшимися как “оводнение” тела. Эти нарушения развития летальны: такие эмбрионы погибали до вступления в метаморфоз. У прошедших метаморфоз особей встречались мальформации глаз и раковины – нарушения развития, не критичные для выживания. Все наблюдавшиеся нарушения развития и мальформации были нами подробно описаны ранее (Bogomolov, Voronezhskaya, 2022). Мы учитывали любое из замеченных отклонений как аномалию развития.

Подсчет выявленных аномалий показал, что процентная доля аномалий различается в группах HTP-CC-опыт и HTP-HC-опыт. Так, в группе HTP-CC-опыт она варьировал от 15 до 37%, а в среднем составляла 23% (рис. 2а, 2в). В то же время, в группе HTP-HC-опыт минимальный процент аномалий был равен 57%, максимальный – 78%, а в среднем он составлял 66% (рис. 2б, 2в). Частоту встречаемости аномалий развития в группах HTP-CC-опыт и HTP-HC-опыт сравнили с помощью точного критерия Фишера, а уровни значимости различий скорректировали с помощью методов FDR и Бонферони (табл. 1). Оказалось, что группы достоверно отличаются друг от друга как при попарном сравнении отдельных повторностей эксперимента (табл. 1), так и при сравнении групп в целом. Таким образом, эмбрионы группы HTP-HC, то есть потомки улиток, обитавших в нестабильной среде, обладали менее устойчивым развитием и чаще реагировали на экспериментальное повышение внутриклеточного серотонина формированием аномалий развития.

Выявленная в наших экспериментах разница между потомками улиток из стабильной и нестабильной сред обитания сходна с разницей, выявленной ранее для потомков летних и осенних особей. Так, в аналогичных экспериментах по инкубации эмбрионов в 5-HTP, процентная доля аномалий развития в летний период была выше, чем в осенний (Ivashkin et al., 2015). Это дает основания предполагать, что обитание в нестабильной среде приводит к повышению уровня серотонина в организме матери (по аналогии с сезонным повышением уровня серотонина в летний период).

Как серотонин, содержащийся в организме матери, попадает в клетки эмбриона? По всей видимости, у большого прудовика серотонин может попадать в яйцеклетку, а затем в оплодотворенную зиготу, только во время оогенеза и прохождения зиготы по половым путям матери. В предыдущих исследованиях была описана серотонинергическая сеть в извитой части женской половой системы (в матке) (Ivashkin et al., 2015). Однако яйцеклетка до попадания в извитую часть яйцевода значительную часть времени до созревания находится, собственно, в гермафродитной железе (овотестисе).

Мы решили проверить, получает ли серотонинергическую иннервацию гермафродитная железа (рис. 3а), в которой созревают как яйцеклетки,

Рис. 3. Распределение серотонин-иммунопозитивных элементов в ткани гермафродитной железы (овотестиса) *L. stagnalis*. Положительная реакция с антителами к серотонину (5-HT – зеленый) и маркирование ядер DAPI (синий). (а) Схема строения гермафродитной железы, мужской и женской частей половой системы. В овотестисе (голубой цвет, сплошной контур) происходит формирование как яйцеклеток, так и сперматозодов. В “матку” попадает уже оплодотворенная яйцеклетка. (б) Серотонин-содержащие волокна (стрелки) проходят в составе нерва из центральной нервной системы и ветвятся на поверхности железы (стрелки). (в) Тонкие отростки серотонин-позитивных волокон с варикозными расширениями (стрелки) на поверхности долей гермафодитной железы. (г) Серотонин-позитивные волокна в составе нерва, идущие вдоль протока гермафродитной железы (стрелки), видно ветвление отростков с варикозными расширениями в ткани железы (стрелки). (д) Серотонин-позитивная реакция наиболее выражена в области под мембраной яйцеклеток. В области формирования сперматозоидов (головки стрелок) серотонин-положительной реакции не обнаруживается. (д') Область формирования сперматозоидов с характерным паттерном расположения ядер. (е) Серотонин-позитивная реакция в цитоплазме яйцеклеток разной степени созревания (яйцеклетки обозначены звездочками). (ж) Серотонин-позитивная реакция под мембраной яйцеклеток на разной стадии созревания (яйцеклетки – звездочки), отсутствие положительной реакции в областях формирования сперматозоидов (головки стрелок). Размер масштабных линеек в микрометрах указан на каждом рисунке.

так и сперматозоды. Мы обнаружили разветвленную сеть серотонинергических отростков вдоль всей железы. Серотонин-иммунореактивные волокна проходят в составе нерва, идущего вдоль гермафродитного протока (рис. 3б, 3г). Тонкие отростки с варикозными расширениями активно ветвятся в ткани железы и охватывают каждую ее дольку (рис. 3в). Внутри железы четко выделяются области с повышенным содержанием серотонина внутри клеток. Большой размер клеток и их расположение позволяют идентифицировать их как яйцеклетки. Поскольку иммуноположительная реакция наблюдается в клетках разного размера, можно предположить, что они являются яйцеклетками на разных стадиях созревания (звездочки на рис. 3д, 3е). Следует отметить, что иммуноположительная реакция наблюдается в цитоплазме клеток и наиболее выражена в области под мембраной. В то же время, центральная часть цитоплазмы вокруг ядра не является серотонин-позитивной (рис. 3д, 3е, 3ж). В области формирования сперматозоидов, выделяемой по характерному паттерну расположения ядер, серотонин-положительной реакции не обнаруживается (рис. 3д, 3д', 3ж). Такое распределение серотонин-иммуноположительной реакции в тканях гермафродитной железы брюхоногого моллюска обнаружено впервые. Таким образом, яйцеклетка на всех стадиях оогенеза, а затем и зигота во время прохождения по половым путям, могут получать серотонин из материнского организма (рис. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты экспериментов, проведенных на лабораторной популяции брюхоногого моллюска *Lymnaea stagnalis*, подтверждают, что обитание материнских особей в нестабильных (стрессовых) условиях может приводить к снижению устойчивости развития их потомков. В наших экспериментах это проявлялось как более высокий процент аномалий развития, появляющихся в ответ на инкубацию эмбрионов в 5-HTP, у потомков матерей, содержавшихся в нестабильной среде. Сопоставление наших данных с данными предыдущих исследований (Ivashkin et al., 2015) позволяет предположить, что в нестабильных (стрессовых) условиях в организме матери повышается уровень серотонина, выполняющего роль сигнального фактора, который опосредует материнский эффект у *L. stagnalis*. Участие серотонина в передаче информации от матери к потомку подтверждает обнаруженная нами разветвленная серотонинергическая иннервация гермафродитной железы (овотестиса) и присутствие серотонина в яйцеклетках разных стадий созревания. Эти данные позволяют говорить о непосредственном влиянии уровня серотонина в материнском организме на будущий эмбрион. Такая серотонин-опосредованная коммуникация между материнским организмом и организмом потомка может носить адаптивный характер: она “программирует” потомка для реализации оптимальной в данных условиях стратегии развития (Ivashkin et al., 2015). Однако при превышении определенного уровня серотонина в тканях половой системы матери, аккумуляция серотонина в формирующихся ооцитах может приводить к возникновению аномалий развития. Таким образом, в определенных условиях (например, в нестабильной среде) повышение уровня серотонина в организме матери может приводить к снижению устойчивости развития, то есть становится неадаптивным.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы признательны В.Г. Гринькову (каф. биологической эволюции биологического факультета МГУ) за помощь в статистической обработке данных.

Конфокальные изображения получены с использованием оборудования ЦКП ИБР РАН (0088-2021-0020).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Эксперименты по модуляции внешних условий и уровня серотонина в клетках эмбриона выполнены при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-24-01166. Иммунохимическое выявление серотонина в формирующихся яйцеклетках проведено в рамках выполнения гранта РНФ № 22-14-00375.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

А.И. Богомолов выполнял экспериментальную работу, участвовал в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Ю.А. Краус участвовала в обсуждении результатов, подготовке изображений, написании и редакции текста статьи.

Е.Е. Воронежская разработала протокол эксперимента, выполняла работу по иммунохимическому выявлению серотонина в овотестисе и формирующихся яйцеклетках, участвовала в написании и редакции текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Bogomolov A.I., Voronezhskaya E.E. An increase in the level of intracellular serotonin in blastomeres leads to the disruption in the spiral cleavage pattern in the mollusc *Lymnaea stagnalis* // Russian J. Dev. Bio. 2022. V. 53. №. 2. P. 115–120. https://doi.org/10.1134/S1062360422020035

Dantzer B., Boutin S., Lane J.E., McAdam A.G. Integrative studies of the effects of mothers on offspring: an example from wild North American red squirrels // Advances in Neurobiology / Ed. González-Mariscal G. 2022. V. 27. P. 269–296. Springer: Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-97762-7_9

Dantzer B., Newman A.E., Boonstra R., Palme R., Boutin S., Humphries M.M., McAdam A.G. Density triggers maternal hormones that increase adaptive offspring growth in a wild mammal // Science. 2013. V. 340(6137). P. 1215–1217.

Ivashkin E., Khabarova M.Y., Melnikova V., Nezlin L.P., Kharchenko O., Voronezhskaya E.E. et al. Serotonin mediates maternal effects and directs developmental and behavioral changes in the progeny of snails // Cell Rep. 2015. V. 12. P. 1144–1158. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.022

Joosse J., Boer H.H., Comelisse C.J. Gametogenesis and oviposition in *Lymnaea stagnalis* as influenced by Y-irradiation and hunger // Symp. Zoo 1. Soc. London. 1968. V. 22. P. 213–235.

Love O.P., McGowan P.O., Sheriff M.J. Maternal adversity and ecological stressors in natural populations: the role of stress axis programming in individuals, with implications for populations and communities // Functional Ecology. 2013. V. 27(1). P. 81–92.

Lukowiak K., Sunada H., Teskey M., Dalesman S. Environmentally relevant stressors alter memory formation in the pond snail *Lymnaea* // J. Experimental Biology. 2014. V. 217. P. 76–83.

Marshall D., Uller T. When is a maternal effect adaptive? // Oikos. 2007. V. 116(12). P. 1957–1963.

Meshcheryakov V.N. The common pond snail Lymnaea stagnalis //Animal species for developmental studies. – Springer, Boston, MA, 1990. P. 69–132.

Moore M.P., Whiteman H.H., Martin R.A. A mother's legacy: the strength of maternal effects in animal populations // Ecology Letters. 2019. V. 22(10). P. 1620–1628.

Sheriff M.J., Bell A., Boonstra R., Dantzer B., Lavergne S.G., McGhee K.E., MacLeod K.J., Winandy L., Zimmer C., Love O.P. Integrating ecological and evolutionary context in the study of maternal stress. Integrative and comparative biology. 2017. V. 57(3). P. 437–449.

Sheriff M.J., Love O.P. Determining the adaptive potential of maternal stress // Ecology letters. 2013. V. 16(2). V. 271–280.

van der Steen W., Jager J.C., Tiemersma D. The influence of food quantity on feeding, reproduction, and growth in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.) with some methodological comments // Proc. K. Ned. Akad. Wet. 1973. V. 76. P. 47–60.

Instability of the Mother's Environment Leads to Reduced Developmental Robustness in *Lymnaea stagnalis* (Mollusca: Gastropoda)

A. I. Bogomolov[1, 2], Y. A. Kraus[1, 2], and E. E. Voronezhskaya[2, *]

[1]*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, ul. Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia*

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

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

Adaptive maternal effects that increase the adaptability of offspring are often caused by stressful conditions that persist in the environment for an extended period of time. The question arises, what is the threshold at which maternal effects cease to be adaptive for offspring and lead to developmental disorders? One of the stressors is considered to be unpredictable changes in environmental conditions. We aimed to test whether a mother's inhabitation of unstable environment could lead to a decrease of developmental robustness in the embryos of the gastropod mollusk *Lymnaea stagnalis*. The laboratory population of snails was split into two groups. For the first group, conditions were maintained as stable as possible, with constant water exchange and excessive feeding. The second group was kept under unstable (stressful) conditions, with episodic feeding and water exchange. It turned out that unstable conditions alone did not affect the frequency of developmental anomalies in the offspring. Since serotonin is presumably plays the role of the signaling molecule mediating the maternal effect in *L. stagnalis*, we subjected embryos of both groups to the biochemical precursor of serotonin (5-HTP). After incubation in 5-HTP, the proportion of embryos with developmental anomalies was significantly higher among the offspring of mothers living in unstable conditions. We confirmed the important role of serotonin as a factor mediating communication between the organisms of mother and offspring by revealing serotoninergic innervation of the hermaphroditic gland (ovotestis) and accumulation of serotonin in the cytoplasm of forming oocytes. Our experiments suggest that under the stressful environmental conditions, serotonin accumulation by the oocyte/zygote may increase to a maladaptive level and lead to a decrease in the robustness of embryonic development.

Keywords: maternal effects, developmental robustness, developmental anomalies, serotonin, Gastropoda, *Lymnaea stagnalis*