

МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

УДК 591

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@hotbox.ru

Поступила в редакцию 28.11.06 г.

На зародышах морского ежа *Paracentrotus lividus* в период I-го деления дробления показано, что локальная аппликация агонистов серотониновых рецепторов 3-го типа 5-HT₃ и квинапазина в межblastomerную щель вызывает специфические мембранные токи. Одновременно лиганды 5-HT₃-рецепторов специфически влияют на тип дробления половинных зародышей, имитируя или устраняя межblastомерный сигнал. В свете полученных данных обсуждается уточненная концепция протосинапса, в которой распространение мембранных серотониновых рецепторов ограничено периодом формирования blastomerов в ходе деления дробления и локализовано в области межblastомерного 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 blastomerов после деления (Бузников, Шмуклер, 1978) и, наконец, прямые межblastомерные 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 blastomerов опосредованы внутриклеточными рецепторами (Бузников, Шмуклер, 1978; Shmukler et al., 1986; Бузников, 1987), то в процессах межblastомерной сигнализации, по-видимому, участвуют рецепторы поверхностной мембраны (Шмуклер, 1992; Shmukler, 1993; Shmukler, Tosti, 2002).

Участие медиаторов в межblastомерных взаимодействиях обосновывается способностью агонистов серотонина вызывать функциональную

изоляцию blastomerов (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 blastomerов, изолированных в ходе I-го деления дробления (Шмуклер, 1981). И на зародышах плоского морского ежа *Scaphichthys 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-HT₃) 5-HTQ

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 борозд 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 серотонинрекептивных 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 межblastомерных 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 сахараозы, 10 ЭГТА, 10 Нерес, pH 7.4. После достижения сопротивления изоляции 40–200 МОм мембранию прорывали, наличие отрицательного мембранныго 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 ужесто-

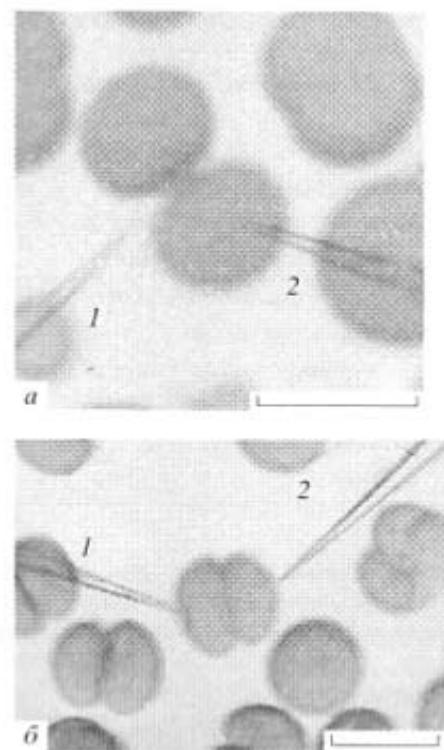


Рис. 1. Расположение апплицирующих микропипеток: *а* – в области борозды дробления до адгезии; *б* – вне контактной области (зародыш прошел адгезию бластомеров после деления). Микропипетка: 1 – апплицирующая, 2 – измерительная. Масштаб здесь и на рис. 4: 100 мкм.

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 пэтчевой 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 микропиньектором Picospritzer (США), располагали либо на расстоянии 5–10 мкм от борозды 1-го деления дробления, либо на таком же расстоянии от мембранных бластомеров 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 микроаппликации химических веществ на бластомеры *P. lividus*

Препарат	Место микроаппликации	Число опытов (с эффектом : без эффекта)	Амплитуда тока, пА	Латентный период, с
5-HTQ	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
Квиназин	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
ДМСО	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-HT₃-рецепторов 5-HTQ (триметилсеротонин йодид) и квиназин (2-(1-пиперазинил)хинолин малеат) (все препараты фирмы "Sigma", США), а также диметилсульфоксид (ДМСО) 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 квиназина и антагониста 5-HT₃-рецепторов йодметилата 3-тропанилинид-3-карбоксилата на паттерн дробления половинных зародышей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мембранные токи при внесении химических веществ в экспериментальную камеру. Специфичность ранее показанного эффекта лиганда 5HT₃-рецепторов 5-HTQ проверили в опытах с внесением в экспериментальную камеру другого 5HT₃-агониста – 2-метил-серотонина и никотина –

лиганды n-холинорецепторов. 2-Метил-серотонин (100 мкМ) вызывал входящий ток, сходный с таковым, наблюдавшимся при внесении 5-HTQ. (-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-HTQ (100 мкМ) в область межblastomerной щели до адгезии бластомеров в подавляющем большинстве опытов (25 из 29) наблюдался типичный входящий ток (таблица). В приведенном на рис. 2, а эксперименте микроаппликация 5-HTQ в межblastomerную щель до адгезии вызвала максимальную силу тока -103 пА с латентным периодом около 0.5 с. Аппликация 5-HTQ вне контактной области или после окончания адгезии бластомеров вызвала входящие токи в 13 случаях из 30, амплитуда которых была статистически достоверно ниже, чем при аппликации в область контакта (p < 0.01, рис. 2, б). Во многих из тех случаев, когда аппликация вне контактной области не вызывала мембранных токов, добавление 5-HTQ в экспериментальную камеру вызывало выраженные токи, подобные наблюдавшимся нами ранее (Shmukler, Tosti, 2002) и значительно большие по амплитуде, чем при микроаппликации.

Еще более существенно, что аппликация в контактную область вызывала токи с существенно более коротким латентным периодом по сравнению с аппликацией на свободную поверхность бластомера (таблица, p < 0.001). Естественно, что латентный период можно было определить только в тех случаях, когда в ответ на аппликацию возникла сколько-нибудь существенная сила тока. Результаты микроаппликации 5-HTQ в область борозды дробления после окончания адгезии

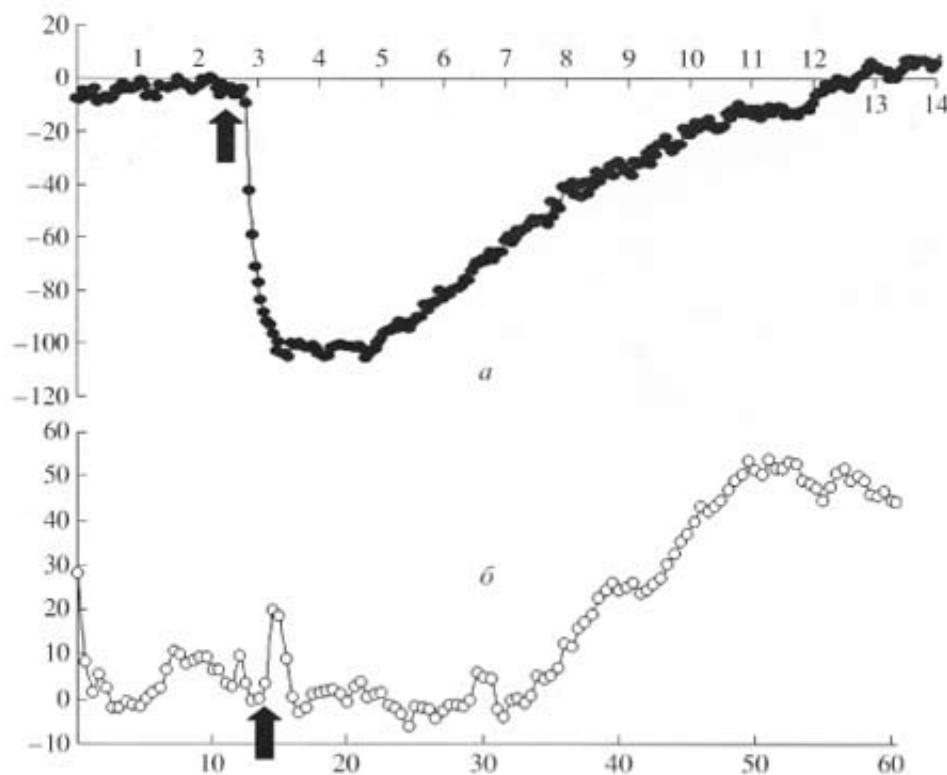


Рис. 2. Токи при микроаппликации 5-HTQ в контактную область (а) и на свободную поверхность (б) бластомеров в период 1-го деления дробления *P. lividus* (одиночный импульс).

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

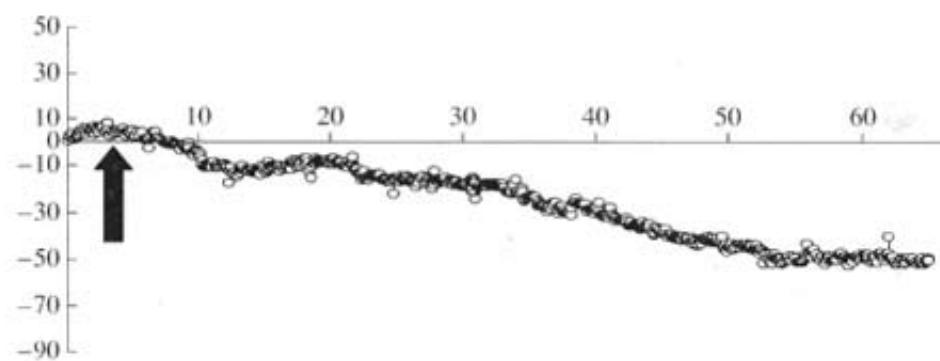


Рис. 3. Ток при микроаппликации ДМСО (одиночный импульс) в контактную область бластомеров в период 1-го деления дробления *P. lividus*.

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

Другой агонист 5-HT₃-рецепторов, квиназин, также вызывал входящие токи при аппликации его в область борозды дробления до адгезии бластомеров (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 квиназина на свободную поверхность бластомеров значительно и достоверно отличались от таковых при микроаппликации в межblastomerную щель и по амплитуде, и по длительности латентного пе-

риода (таблица), то микроаппликация квиназина 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-HTQ в межblastomerную щель (таблица, рис. 3).

Аппликация серотонинергических веществ на изолированные бластомеры. Следует отме-

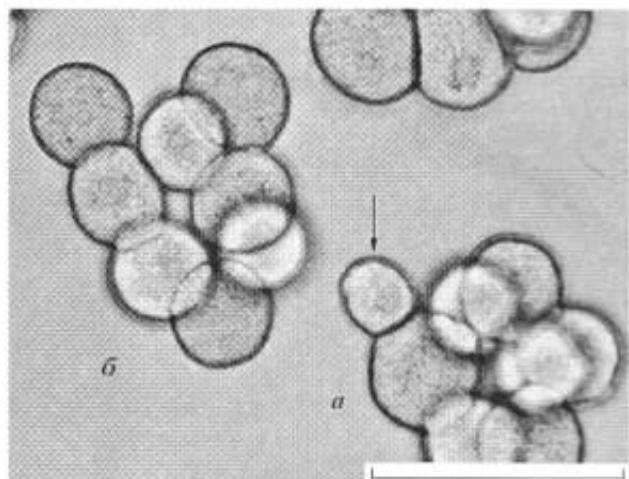


Рис. 4. Паттерны дробления половинных зародышей *P. lividus* на стадии 4-го деления дробления. Деление: а – равномерное, б – неравномерное. (→) – микромер.

тить, что модификация условий изоляции бластомеров по сравнению с ранее применявшимися позволила получить характерное для зародышей *Scaphichthys 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, образующих микромеры на 4-м делении дробления (рис. 4). Таким образом, наряду с действием антагониста 5-HT₃-рецепторов удалось изучить и эффект агониста, который, как ранее было показано (Шмуклер, 1981), имитирует межblastomerный 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-HT₃-рецепторов квинапазин (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-HT₃-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-HT₃-рецептора 5-HTQ был обнаружен ранее (Shmukler, Tosti, 2002), тогда как агонист 5-HT₂-рецептора DOI вызывал

возникновение токов в ходе всего клеточного цикла, а агонист 5-HT₁-рецептора 8-OH-DPAT такого эффекта не имел. Это дало основание предположить, что эмбриональные рецепторные структуры сходны именно с 5-HT₃-рецепторами взрослых организмов. Эффективность лигандов 5-HT₃-рецепторов подтверждается и в нашей работе.

Наряду с ранее показанной временной организацией процессов, связанных с 5-HT₃-рецепторами (Shmukler et al., 1999), в нашей работе показана и пространственная их организация. На локализацию рецепторных структур, сходных с 5-HT₃-рецепторами, в области контактной мембранны бластомеров указывает как более высокая, чем при аппликации на свободную поверхность, амплитуда силы токов при локальной аппликации агонистов 5-HT₃-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 гиалинового 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-HT₃-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-HT₃-лигандами, с контактной областью подтверждается и их показанной ранее приуроченностью к моменту формирования борозды дробления (Shmukler, Tosti, 2002).

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

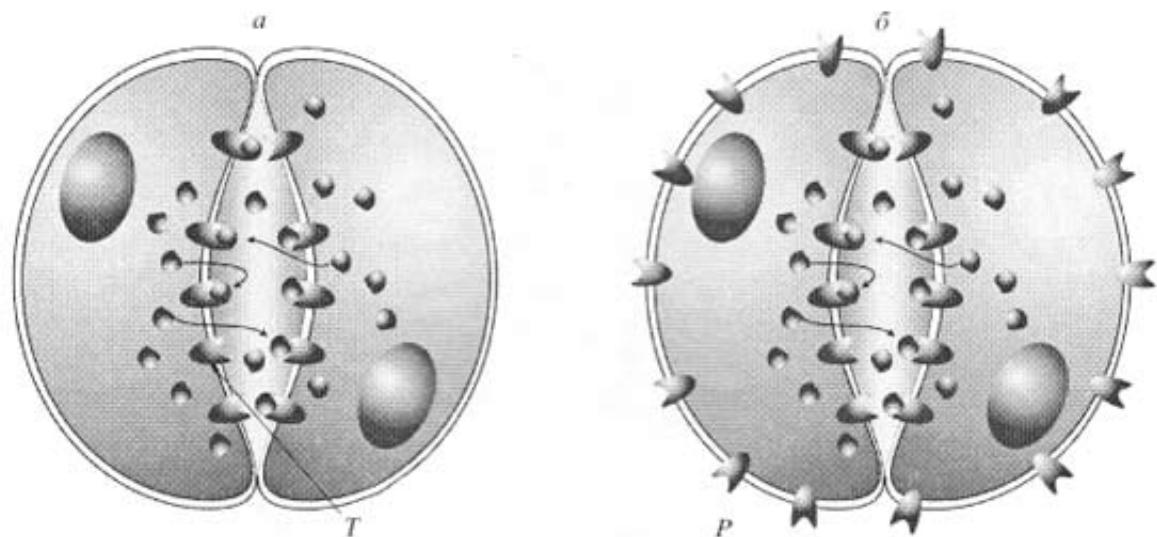


Рис. 5. Схема протосинапса: *а* – с равномерным распределением рецепторов по поверхности бластомеров, *б* – с локализацией рецепторов в области межblastомерного контакта. *P* – receptor, *T* – трансмиттер.

способностью проникать к рецепторам через две мембранны. 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 кипазина 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-HT₃, в контактной области.

Физиологическая активность лигандов 5-HT₃-рецепторов не ограничивается их способностью вызывать мембранные токи; на "микромерной модели" (Шмуклер и др., 1981а, б; Шмуклер, 1981) эффекты агониста и антагониста 5-HT₃-рецепторов полностью соответствуют показанным ранее эффектам серотонинергических веществ (Шмуклер, 1981, 1992), изменяя соответствующим образом тип деления половинных зародышей. Усовершенствование методики изоляции впервые позволило получить на зародышах *P. lividus* фракцию бластомеров, изолированных до адгезии в ходе 1-го деления деления и не образующих микромеры на 4-м делении деления, а также продемонстрировать эффект агониста серотониновых рецепторов. Возможно, ранее эффекты специально синтезированных антагонистов серотониновых рецепторов (Шмуклер, 1992), таких как йодметилаты инимекарба и препарата КЮР-14, обусловлены их взаимодействием с 5-HT₃-рецептороподобными структурами. Можно также предположить, что эти эффекты лигандов 5-HT₃-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 цитокортика 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 межblastomерной 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 totipotentialность изолированного бластомера.

Возникновение и(или) активность этих рецепторов сопряжены по времени с 1-м делением дробления и локализованы в области межblastomерного 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 межblastomерного контакта (рис. 5).

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

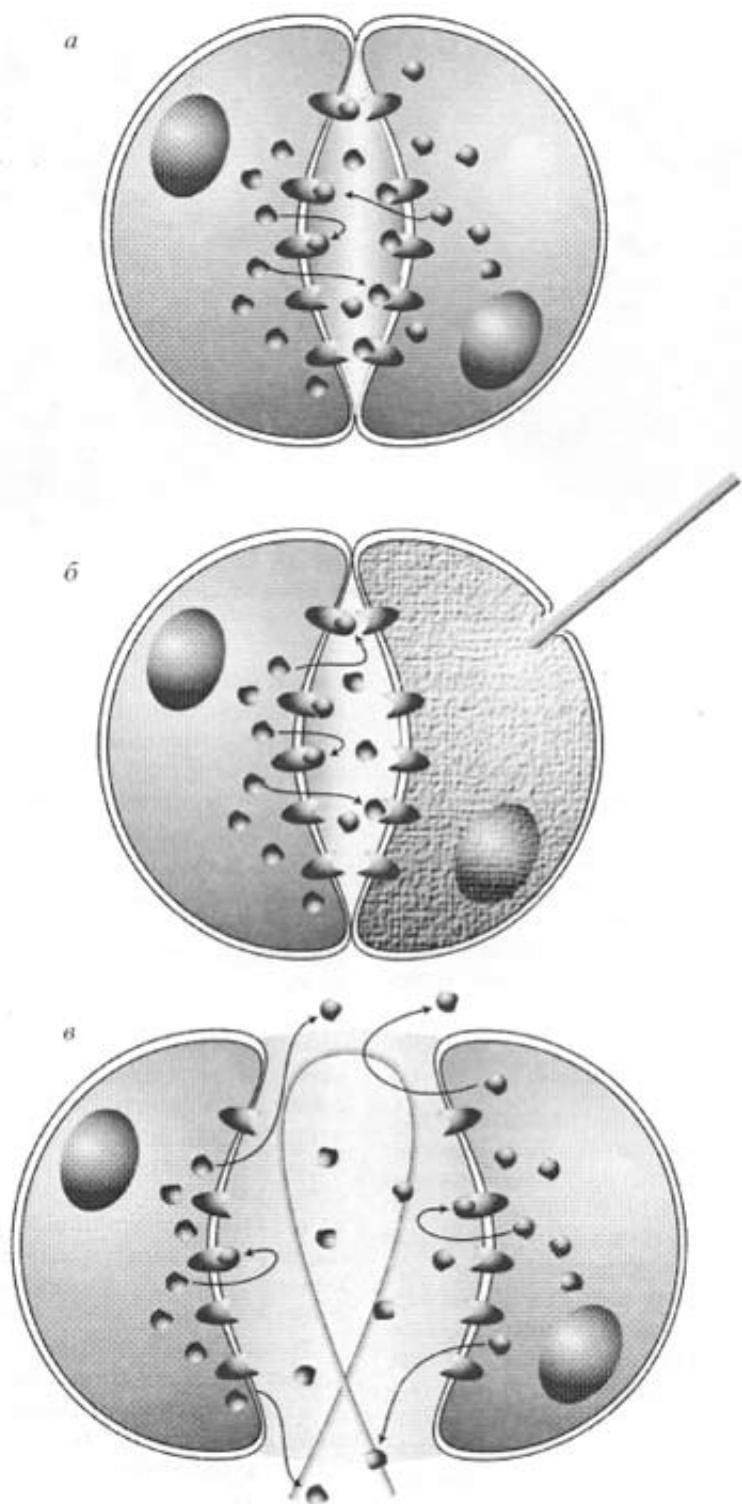


Рис. 6. Протосинапс (а) и схемы опытов Ру (б) и Мак-Клендона (в).

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

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

трансмиттера, выбрасываемого во внешнюю среду из интактного бластомера, сохраняется в виде коагулированного бластомера (рис. 6), а следовательно, сохраняется и асимметрия воздействия трансмиттера. Таким образом определяется пропективная 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. Нейротрансмиттеры 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 [H^3]8-OH-DPAT ранними зародышами морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* // Биол. мембранны. 1992. Т. 9. № 10–11. С. 1167–1169.

Шмуклер Ю.Б., Чайлахян Л.М., Карпович 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.

McClendon J.F. The development of isolated blastomeres of frog's egg // Am. J. Anat. 1910. V. 10. P. 425–430.

Roux W. Über die künstliche Hervorbringung halber Embryonen durch Zerstörung einer der beiden ersten Furchungszellen, sowie über die Nachtentwicklung (Postgeneration) der fehlenden Koreperhalften // 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 "prenervous" 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. Devol. 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 Serotoninergic 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@hotbox.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.