

В.О. Полякова^{1,2}, Д.С. Медведев³, Н.С. Линькова¹, А.Э. Пухальская³

ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ТРАНСПОРТЕРА СЕРОТОНИНА *SLC6A4* И СИНТЕЗА СЕРОТОНИНА В ЯИЧНИКАХ

¹ Белгородский государственный национальный исследовательский университет, 308015, Белгород, ул. Победы, 85, e-mail: miauy@yandex.ru; ² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2; ³ Санкт-Петербургский медико-социальный институт, 195271, Санкт-Петербург, Кондратьевский пр., 72, лит. А

В мире наблюдают тенденцию к повышению возраста первородящих женщин. В связи с социальными особенностями жизни общества многие женщины откладывают рождение детей на возраст после 30–40 лет. Это часто приводит к трудностям в зачатии и вынашивании беременности. Понимание молекулярных механизмов старения яичников имеет важную практическую значимость. Серотонин и его транспортер SERT, кодируемый у человека геном *SLC6A4*, играют важную роль в функционировании яичников в различные репродуктивные периоды жизни женщин. Цель работы — оценка возрастной динамики экспрессии гена транспортера серотонина *SLC6A4* и синтеза серотонина в яичниках в различные возрастные периоды жизни женщины. Исследование выполнено на аутопсийном материале 164 яичников, полученных от людей в возрасте от нескольких месяцев до 92 лет. Оценку синтеза серотонина в яичниках проводили методом иммуногистохимии, а экспрессию гена транспортера серотонина изучали методом ПЦР-анализа. С возрастом уровень серотонина в яичниках у женщин снижается, достигая минимальных значений в возрасте после 45 лет, что может быть связано с наступлением менопаузы. Такая же возрастная тенденция выявлена и для экспрессии гена транспортера серотонина *SLC6A4*. Эти данные подчеркивают значимость серотонина и его транспортера SERT для оценки и разработки средств профилактики возрастных изменений яичников.

Ключевые слова: серотонин, транспортер серотонина SERT, яичники, старение

Актуальность вопросов, связанных со старением яичников, значительно возросла в последнее время. Все больше пар в развитых странах предпочитают отложить родительство на более поздний возраст женщины, и это часто приводит к трудностям при зачатии и вынашивании беременности. Механизмы, связанные со старением яичников, не полностью изучены и являются многофакторными [15]. Для оптимизации диагностических тестов и лечения в случае патологии яичников необходимы более полные знания о возрастном снижении функций яичников и их преждевременном старении.

Важную роль в поддержании нейроэндокринной функции яичников, в том числе при их возрастной эволюции, играет серотонин (5-гидрокситриптамин, 5-HT) [2, 11].

Впервые серотонин и ацетил-серотонин были обнаружены в экстрактах яичников человека [9]. Присутствие серотонина в ткани яичников и его различные концентрации во время эстрального цикла позволяют предположить, что он принимает участие в регуляции функции яичников и в процессе овуляции в качестве одного из нескольких медиаторов реакции воспалительного типа, предшествующего разрыву фолликула [14]. Недавно показано, что серотонин играет важную роль в созревании ооцитов и эмбриональном развитии [6]. Рецепторы серотонина обнаружены на поверхности гранулезных и кумулюсных клеток, ооцитов и эмбрионов на ранней стадии развития [5]. Экспрессия серотонинового транспортера SERT, являющегося продуктом гена *SLC6A4*, обнаружена в ооцитах и эмбрионах, а серотонин-продуцирующий фермент триптофан-гидроксилаза 1 (TPH-1) обнаружен в кумулюсных клетках. У самок крыс с нокаутом *Tph1* наблюдали нарушения раннего развития эмбриона [5]. Немногочисленные данные свидетельствуют о том, что серотонин играет важную роль в регуляции эмбриогенеза и женской репродуктивной системы в целом. Это обуславливает необходимость более подробного изучения роли серотонина и его транспортера в функционировании яичников.

Целью работы стала оценка возрастной динамики экспрессии гена транспортера серотонина *SLC6A4* и синтеза серотонина в яичниках в различные возрастные периоды жизни женщины.

Материалы и методы

Исследование проводили на аутопсийном материале яичников ($n=164$). В соответствии с возрас-

том пациенток были выделены следующие экспериментальные группы: 1-я — дети до 12 мес ($n=10$); 2-я — дети 1 года ($n=10$); 3-я — дети 2–4 лет ($n=5$); 4-я — дети 5–11 лет ($n=5$); 5-я — подростки 12–15 лет ($n=11$); 6-я — женщины раннего репродуктивного возраста 16–18 лет ($n=20$); 7-я — женщины репродуктивного возраста 19–29 лет ($n=23$); 8-я — женщины позднего репродуктивного возраста 30–44 лет ($n=24$); 9-я — женщины в период менопаузы 45–59 лет ($n=21$); 10-я — женщины в период менопаузы 60–74 лет ($n=19$); 11-я — женщины в период постменопаузы 75–89 лет ($n=10$); 12-я — женщины в период постменопаузы 90–92 лет ($n=6$). Критерием исключения из исследования было наличие патологии репродуктивной и эндокринной систем. Все пациентки, включенные в исследование, не имели патологии эндокринной системы и не принимали гормональные и иные препараты в течение 3 лет до начала исследования.

Экспрессию гена *SLC6A4* в яичниках определяли методом ПЦР [10] и сравнивали в разных возрастных группах. Содержание серотонина в ткани, учитывая возможность его захвата из кровяного русла посредством транспортера *SLC6A4*, оценивали методом иммунофлюоресцентного окрашивания с последующим морфометрическим анализом. Дизайн исследования одобрен этическим комитетом Санкт-Петербургского медико-социального института (№ 4/23 от 15.12.2023). Анализ морфофункционального состояния яичников проводили с использованием клинических данных и заключений патоморфологических исследований, проведенных кафедрой патологической анатомии Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета и кафедрой патологической анатомии Городской больницы Св. Георгия.

Для иммунофлюоресцентного окрашивания парафиновые срезы толщиной 4–6 мкм монтировали на стекла с поли-L-лизинным покрытием («Sigma», Япония). В качестве первичных антител использовали поликлональные антитела козы к серотонину («Abcam», США, ab66047). В качестве вторичных антител для иммунофлюоресцентной реакции использовали антитела, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor 647 (1:1000, «Abcam», США). Срезы инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. Ядра клеток визуализировали с помощью Hoechst 33,258 («Sigma», Япония, «Livonia», США).

В качестве отрицательного контроля иммуногистохимическую реакцию проводили без использования первичных антител. Специфичность антител проверяли в контрольных экспериментах.

Результаты иммунофлюоресцентного окрашивания визуализировали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе «Zeiss LSM 980» («Zeiss», Германия). Морфометрический анализ проводили с помощью программного обеспечения Image J (версия 1.8.0_112) для оценки площади и оптической плотности иммунопозитивной области. Для каждого образца было получено пять микрофотографий. Площадь иммунопозитивной области (%) рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади поля зрения. Для вычисления площади и оптической плотности иммунопозитивной области в программе ImageJ интересные (иммуноокрашенные) области изображения выделяли вручную. Микрофотографию открывали в программе ImageJ. Затем в меню «Analyze» выбирали пункт «Set Scale». Устанавливали соотношение пиксел/мкм, чтобы получить все данные в микронах. Далее в этом же меню выбирали пункт «Set Measurements», чтобы оценить площадь и оптическую плотность иммунопозитивной области. Затем накладывали на изображение «маску», по которой проводили расчёты с помощью инструмента Threshold. После этого проводили анализ, выбрав пункт меню «Analyze Particles».

Для проведения ПЦР тотальную РНК из нефиксированной ткани яичника стабилизировали с помощью раствора для стабилизации РНК IntactRNA («Евроген», Россия). Выделение РНК проводили с помощью набора «RNeasy MiniKit» («Qiagen», Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Для оценки чистоты РНК использовали спектрофотометрический анализ. Соотношение оптической плотности на длине волн 260 и 280 нм ($A_{260/280}$) составляло около 2. Целостность каждого образца РНК оценивали на основе распределения размеров фрагментов, на которое указывали два пика, соответствующие 18S и 28S рибосомальным РНК, и сигнал от малых РНК. Качество РНК оценивали на основе значений числа целостности РНК (RIN) в диапазоне 1–10, где 1 соответствует наиболее деградированной, а 10 — наиболее неповрежденной, с использованием алгоритма RIN [9]. Число целостности РНК (RIN) в нашем исследовании составляло 8. Диапазон концентраций выделенной РНК составил около 800–1000 нг/мкл.

Первую цепь кДНК синтезировали с помощью набора «Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit» («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) с использованием 100 нг РНК на 20 мкл реакционной смеси. Полученную кДНК использовали непосредственно в качестве матрицы для количественной ПЦР в концентрации 1 мкл на 24 мкл реакционной смеси. Количественную ПЦР проводили с помощью DT-322 (DNK-388 Technology, Россия) с использованием набора для амплификации «qPCRmix-HS SYBR + ROX» («Евроген», Россия). Количественную ПЦР использовали для оценки экспрессии гена *SLC6A4*. Олигонуклеотидные праймеры были разработаны с помощью онлайн-сервиса NCBI Primer-Blast. Использовали пары праймеров, в которых один из них соответствовал участкам двух соседних экзонов. Синтез олигонуклеотидов проводили в НПО «Синтол» (Москва, Россия). Последовательности праймеров для гена *SLC6A4* представлены в табл. 1. Уровень экспрессии гена *SLC6A4* определяли относительно референтного гена домашнего хозяйства *GAPDH* [4] методом 2-ΔΔCq. Исследовали по три независимых образца из каждой группы. Проводили минимум три параллельные реакции в соседних слотах.

Статистическую обработку результатов морфометрического исследования и экспрессии гена *GAPDH* проводили с использованием дисперсионного анализа (Anova) в случае параметрического характера распределения, и теста Крускала—Уоллиса — в случае непараметрического характера. Характер распределения выявляли при помощи теста Колмогорова—Смирнова. Для оценки межгрупповых различий в случае нормально распределенных данных использовали t-критерий Стьюдента, в случае отличия распределения от нормального — медианный тест. Гипотезу о равенстве средних значений в изучаемых группах отклоняли при $p < 0,05$. Построение диаграмм для анализа экспрессии гена *GAPDH* проводили в программе Microsoft Excel 2021. Статистический анализ всех данных проводили в программе Statistica 7.0.

Результаты и обсуждение

Серотонин был верифицирован в овариальных фолликулах, преимущественно в клетках гранулы. В табл. 2 и на рис. 1 представлены результаты измерения площади и оптической плотности иммунопозитивной области серотонина в тканях яичников в разных возрастных группах. Площадь иммунопозитивной области серотонина в ткани яичников имела тенденцию к двукратному увеличению по сравнению с антенатальным периодом, с последующим ее снижением вдвое к 5–11 годам. После небольшого увеличения площади иммунопозитивной области к 16–18 годам отмечали ее постепенное снижение без формирования пиков подъема показателя. Выявлено увеличение оптической плотности иммунопозитивной области серотонина с формированием двух пиковых подъемов значений от 1 года до 2–4 лет (в 1,5 раза) и от 5–11 лет до 16–18 лет (в 2 раза). Далее выявлено систематическое снижение оптической плотности иммунопозитивной области серотонина.

Результаты измерения относительной экспрессии мРНК гена *SLC6A4* в тканях яичников представлены на рис. 2. Этот показатель снижался к 2–4-летнему возрасту на 18% по сравнению с показателем в возрастной группе до 1 года. Далее также происходило постепенное снижение экспрессии мРНК серотонинового транспортера. В тканях яичников, полученных от женщин репродуктивного возраста, этот показатель в среднем был на 46% ниже, чем в возрастной группе 5–11 лет. У женщин в период менопаузы он был на 54% ниже, чем в возрастной группе 5–11 лет. Начиная с 60 лет, значение этого показателя снижалось на 50–88% по сравнению с показателем в группе 16–18 лет (см. рис. 2).

Из представленных данных можно сделать несколько важных выводов, касающихся роли серотонина в старении женской репродуктивной системы. Серотонин, как известно, играет важную роль в функционировании ооцитов и поддержании нормальной активности фолликулов, при этом его накопление в яичниках млекопитающих происходит с участием транспортера SERT [2]. Показано,

Таблица 1

Последовательность праймеров для генов *SLC6A4* и *GAPDH*

Ген	Последовательность
<i>SLC6A4</i>	Forward: 5'-TCC TCC GCT TTG GCG CCT CTT CC-3'
	Reverse: 5'-TGG GGG TTG CAG GGG AGA TCC TG-3'
<i>GAPDH</i>	Forward: 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'
	Reverse: 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'

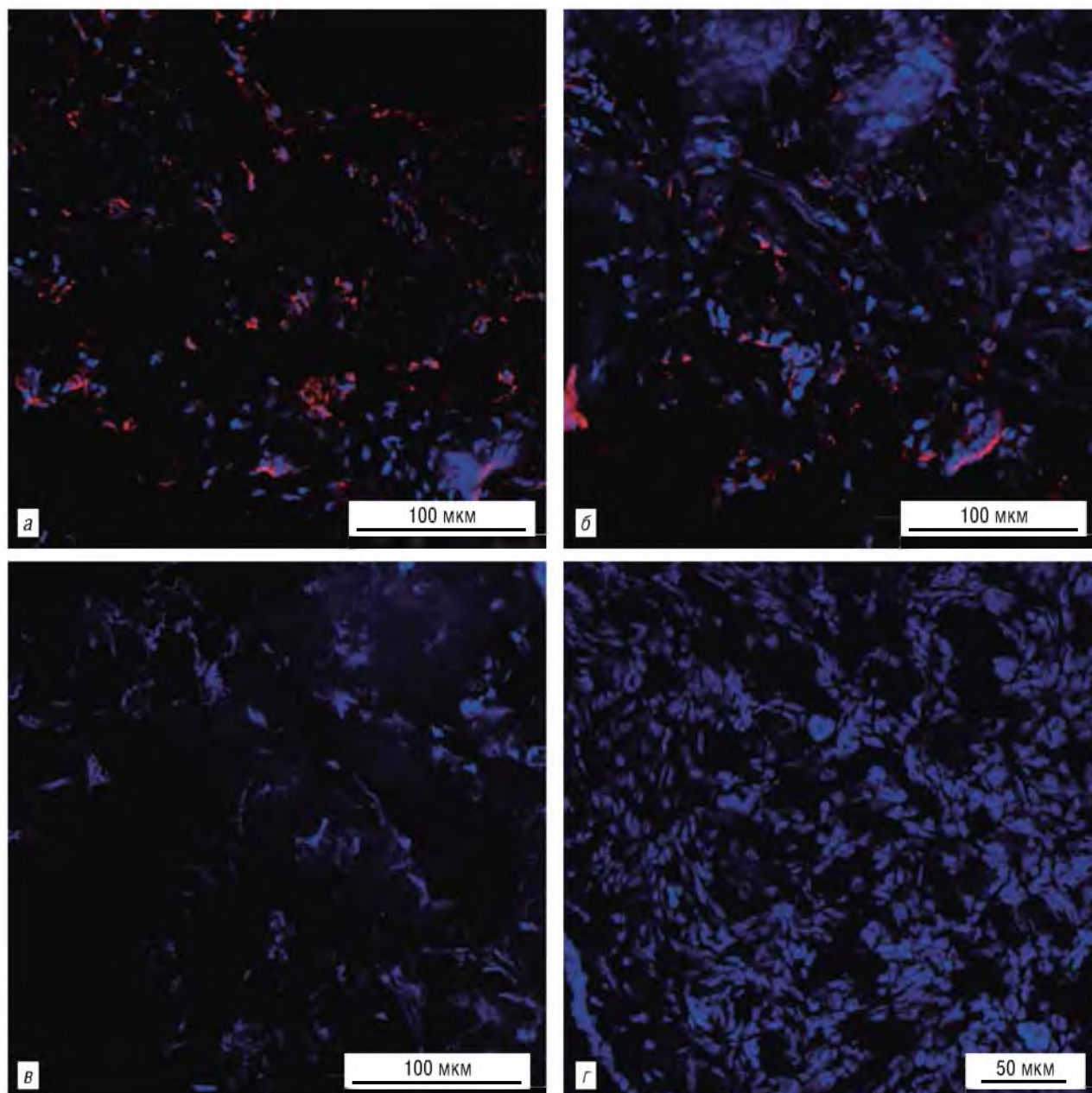


Рис. 1. Возрастная динамика иммунопозитивной области серотонина в яичниках. Иммунофлуоресцентная конфокальная микроскопия. Ядра клеток окрашены Hoechst 33258 — синяя флуоресценция, экспрессия серотонина — розовая флуоресценция (Alexa Fluor 567): а — 1 год; б — 43 года; в — 75 лет; г — контроль без первичных антител, 43 года

что для нормального функционирования гранулезных клеток необходим мембранный транспорт серотонина [12, 13], а нокаут гена *Sert* приводит к угнетению функциональной активности гранулезных клеток [1, 16].

Интересно, что у женщин уровень серотонина и его транспортера, оцениваемый при помощи иммуноокрашивания и экспрессии мРНК соответственно, по мере старения постепенно снижается. Наименьший уровень экспрессии серотонина и гена его транспортера *SLC6A4* наблюдали после 45 лет, что может свидетельствовать о переходных процессах, связанных с менопаузой. Исследование уровня серотонина у половозрелых крыс показало

его пиковое значение в период эструса, в то время как у неполовозрелых особей серотонин в яичниках не был обнаружен [3]. G.F. Gonzales и соавт. установили, что у женщин с аменореей, в период постменопаузы и у женщин с овариэктомией уровень серотонина в крови был ниже, чем у женщин репродуктивного возраста с регулярной менструацией. При этом у женщин в постменопаузе уровень серотонина в крови повышался после приема эстрогензаместительной терапии до значений, аналогичных тем, которые наблюдали у женщин с регулярной менструацией. У женщин с овариэктомией уровень серотонина в крови был обратно пропорционален возрасту. В том же исследовании наблюда-

Синтез серотонина в тканях яичников в разных возрастных группах

Возрастная группа, лет	Площадь иммунопозитивной области серотонина, %	Оптическая плотность иммунопозитивной области серотонина, у. е.
До 1 года	17,36 (16,13; 18,27)	27,07 (24,05; 29,87)
1 год	30,03 (27,91; 30,41)	25,45 (23,16; 26,89)
2–4	15,58 (14,90; 16,71)*	22,24 (18,99; 21,20)
5–11	14,31 (13,40; 14,89)*	21,35 (19,77; 20,80)*
12–15	17,28 (16,88; 17,79)*	20,77 (24,18; 21,01)*
16–18	18,14 (17,67; 18,40)*	21,08 (19,61; 20,85)*
19–29	11,75 (11,01; 12,83)*	21,04 (16,79; 23,66)*
30–44	6,35 (5,77; 6,55)*, **	12,47 (11,19; 13,44)*, **
45–59	3,07 (2,41; 3,34)*, **	7,21 (6,64; 8,03)*, **
60–74	1,57 (1,34; 2,14)*, **	4,88 (4,42; 5,42)*, **
75–89	0,69 (0,62; 0,87)*, **	3,39 (2,35; 3,60)*, **
>90	0,26 (0,17; 0,29)*, **	0,83 (0,37; 1,57)*, **

Примечание. Данные представлены как медиана, 1-й и 3-й квартили. * $p < 0,05$ по сравнению с возрастной группой 1 год; ** $p < 0,05$ по сравнению с возрастной группой 19–29 лет.

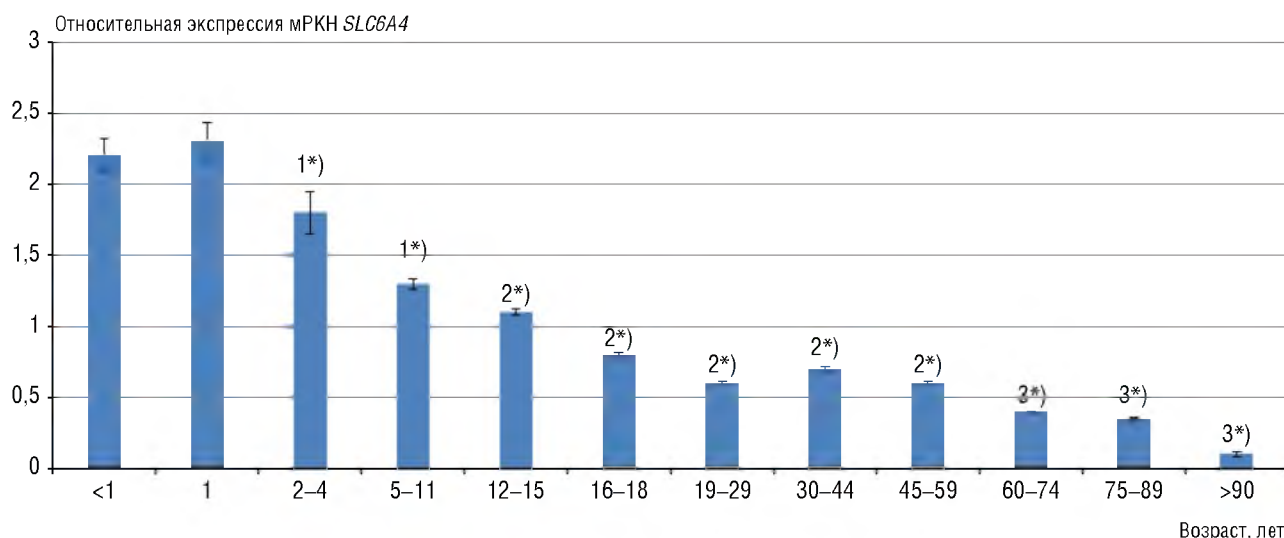


Рис. 2. Относительная экспрессия мРНК гена SLC6A4 в тканях яичников пациенток разных возрастных групп.

Уровень экспрессии гена SLC6A4 определяли относительно референтного гена домашнего хозяйства GAPDH, принятого за 1. Данные представлены как среднее и стандартное отклонение. 1*) $p < 0,05$ по сравнению с возрастной группой до 1 года; 2*) $p < 0,05$ по сравнению с возрастной группой 5–11 лет; 3*) $p < 0,05$ по сравнению с возрастной группой 16–18 лет

ли прямую связь уровня сывороточного эстрадиола и серотонина в цельной крови [8].

Полученные данные также указывают на возможную взаимосвязь снижения содержания серотонина и экспрессии гена SLC6A4 в клетках granulosa яичников и снижения овариального резерва женщин и возраста. Зависимость содержания серотонина в клетках яичников от овариального резерва была описана в исследовании S. Gok и соавт., что подтверждает данную гипотезу [7].

Выводы

Результаты исследования показали значительный вклад серотонина и его транспортера SERT в функционирование яичников у детей, девушек и женщин разного возраста. Эти данные могут служить основой для дальнейших исследований, направленных на предиктивную диагностику и профилактику старения яичников и женской репродуктивной системы.

Конфликт интересов отсутствует.

Литература

1. Никишин Д.А., Алешина Н.М., Семенова М.Л. и др. Влияние серотонина на экспрессию маркеров функционального состояния клеток гранулезы в культуре *in vitro* // Мед. Социол. Философия. Прикладные исследования. 2018. № 4. С. 12–17.
2. Alyoshina N.M., Tkachenko M.D., Malchenko L.A. et al. Uptake and Metabolization of Serotonin by Granulosa Cells Form a Functional Barrier in the Mouse Ovary // *Int. J. molec. Sci.* 2022. № 23 (23). P. 4828. <https://doi.org/10.3390/ijms232314828>
3. Clausell D.E., Soliman K.F. Ovarian serotonin content in relation to ovulation // *Experientia*. 1978. № 3 (34). P. 410–411. <https://doi.org/10.1007/BF01923065>
4. Conceição Braga L., Gonçalves B.Ó.P., Coelho P.L. et al. Identification of best housekeeping genes for the normalization of RT-qPCR in human cell lines // *Acta Histochem.* 2022. № 1 (124). P. 151821. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151821>
5. Dubé F., Amireault P. Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos // *Life Sci.* 2007. № 25–26 (81). P. 1627–1637. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.09.034>
6. Frolova V.S., Nikishina Y.O., Shmukler Y.B. et al. Serotonin signaling in mouse preimplantation development: insights from transcriptomic and structural-functional analyses // *Int. J. molec. Sci.* 2024. № 23 (25). P. 12954. <https://doi.org/10.3390/ijms252312954>
7. Gök S., Gök B.C., Alataş E. et al. Effects of Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Treatment on Ovarian Reserves in Patients with Depression // *Medicina (Kaunas)*. 2023. № 59 (3). P. 517. <https://doi.org/10.3390/medicina59030517>
8. Gonzales G.F., Carrillo C. Blood serotonin levels in postmenopausal women: effects of age and serum oestradiol levels // *Maturitas*. 1993. № 1 (17). P. 23–29. [https://doi.org/10.1016/0378-5122\(93\)90120-7](https://doi.org/10.1016/0378-5122(93)90120-7)
9. Itoh M.T., Ishizuka B., Kuribayashi Y. et al. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary // *Molec. Hum. Reprod.* 1999. № 5 (5). P. 402–408. <https://doi.org/10.1093/molehr/5.5.402>
10. Jun E., Oh J., Lee S. et al. Method Optimization for Extracting High-Quality RNA From the Human Pancreas Tissue // *Translat. Oncol.* 2018. № 3 (11). P. 800–807. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.04.004>
11. Li Y., Hao Y., Zhu J. et al. Serotonin released from intestinal enterochromaffin cells mediates luminal non-cholecystokinin-stimulated pancreatic secretion in rats // *Gastroenterology*. 2000. № 6 (118). P. 1197–1207. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(00\)70373-8](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(00)70373-8)
12. Moore C.J., DeLong N.E., Chan K.A. et al. Perinatal administration of a selective serotonin reuptake inhibitor induces impairments in reproductive function and follicular dynamics in female rat offspring // *Reprod. Sci. (Thousand Oaks, Calif.)*. 2015. № 10 (22). P. 1297–1311. <https://doi.org/10.1177/1933719115578925>
13. Romero-Reyes J., Cárdenas M., Damián-Matsumura P. et al. Inhibition of serotonin reuptake in the prepubertal rat ovary by fluoxetine and effects on ovarian functions // *Reproduct. Toxicol. (Elmsford, N.Y.)*. 2016. № 59. P. 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.12.006>
14. Schmidt G., Kannisto P., Owman C. et al. Is serotonin involved in the ovulatory process of the rat ovary perfused *in vitro*? // *Acta Physiol. Scand.* 1988. № 2 (132). P. 251–256. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1988.tb08324.x>
15. Tesarik J., Galán-Lázaro M., Mendoza-Tesarik R. Ovarian Aging: Molecular Mechanisms and Medical Management // *Int. J. molec. Sci.* 2021. № 3 (22). P. 1371. <https://doi.org/10.3390/ijms22031371>
16. Zha W., Ho H.T.B., Hu T. et al. Serotonin transporter deficiency drives estrogen-dependent obesity and glucose intolerance // *Sci. Rep.* 2017. № 1 (7). P. 1137. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01291-5>

Поступила в редакцию 06.03.2025

После доработки 22.04.2025

Принята к публикации 12.05.2025

Adv. geront. 2025. Vol. 38, № 3. P. 386–391

V.O. Polyakova^{1,2}, D.S. Medvedev³, N.S. Linkova¹, A.E. Puchalskaya³AGE-RELATED DYNAMICS OF *SLC6A4* SEROTONIN TRANSPORTER GENE EXPRESSION AND SEROTONIN SYNTHESIS IN OVARIES

¹ Belgorod State National Research University, 85 Pobedy str., Belgorod 308015; ² Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, 2 Litovskaya str., St. Petersburg 194100; ³ Saint-Petersburg Medical-Social Institute, 72 lit. A, Kondratyevsky ave., St. Petersburg 195271, e-mail: miayy@yandex.ru

There is a worldwide trend towards an increase in the age of first-time mothers. Due to the social peculiarities of society, many women postpone the birth of children after the age of 30–40 years. This often leads to difficulties in conceiving and carrying a pregnancy. Understanding the molecular mechanisms of ovarian aging has important practical significance. Serotonin and its SERT transporter, encoded in humans by the *SLC6A4* gene, play an important role in the functioning of the ovaries during various reproductive periods of women's lives. The aim of the study was to evaluate the age-related dynamics of the expression of the serotonin transporter gene *SLC6A4* and the synthesis of serotonin in the ovaries at different ages of women's lives. The study was performed on autopsy material from 164 ovaries obtained from people aged several months to 92 years. The synthesis of serotonin in the ovaries was evaluated by immunohistochemistry, and the expression of the serotonin transporter gene was studied by PCR analysis. The level of serotonin in the ovaries of women decreases in aging, reaching minimum values after the age of 45, which may be associated with the onset of menopause. The same age-related trend was found for the expression of the *SLC6A4* serotonin transporter gene. These data highlight the importance of serotonin and its SERT transporter for the assessment and development of prevention tools for age-related ovarian changes.

Key words: serotonin, SERT serotonin transporter, ovaries, aging