

## ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ КОМПОНЕНТОВ СЕРТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В КЛЕТКАХ ГРАНУЛЕЗЫ РАЗВИВАЮЩЕГОСЯ ОВАРИАЛЬНОГО ФОЛЛИКУЛА И ПРИ ЛЮТЕИНИЗАЦИИ

Д.А. Никишин<sup>1,2</sup>, Н.М. Алешина<sup>2</sup>, М.Л. Семенова<sup>2</sup>, Ю.Б. Шмуклер<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

### Expression dynamics of the serotonergic system components in granulosa cells of the developing ovarian follicle and after luteinization

D.A. Nikishin<sup>1,2</sup>, N.M. Alyoshina<sup>2</sup>, M.L. Semenova<sup>2</sup>, Y.B. Shmukler<sup>1</sup>

<sup>1</sup> N.K. Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, Russia

<sup>2</sup> M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Регуляция процессов роста и развития женских половых клеток является одной из консервативных функций серотонина, но конкретные механизмы реализации этих функций пока остаются нераскрытыми.

Цель работы — методами ОТ-ПЦР и ПЦР в реальном времени провести молекулярно-генетическое исследование наличия мРНК всех компонентов серотонинергической системы и динамики их экспрессии в клетках гранулезы на разных стадиях фолликулогенеза и в желтых телах. мРНК генов ферментов триптофангидроксилазы *Tph1*, декарбоксилазы ароматических аминокислот *Ddc* и моноаминоксидазы *Maoa*, мембранного транспортера *Sert* и везикулярного транспортера *Vmat2*, а также рецепторов серотонина *Htr1b*, *Htr1d*, *Htr2a*, *Htr2b*, *Htr5b* и *Htr7* выявлялась в исследуемых пробах. Количественное исследование показало, что экспрессия генов *Vmat2*, *Htr1b*, и *Htr7* более выражена на ранних стадиях фолликулогенеза, тогда как экспрессия *Vmat1* растет в ходе развития фолликула. При лютеинизации происходит увеличение количества мРНК генов *Ddc*, *Maoa*, *Vmat1* и *Htr1b*, тогда как экспрессия генов *Vmat2* и *Htr7*, наоборот, падает. Наличие экспрессии ключевых компонентов серотонинергической системы и ее динамика позволяют полагать, что они вовлечены в серотонинергическую регуляцию процессов фолликулогенеза, а также лютеинизации.

**Ключевые слова:** фолликулогенез, лютеинизация, гранулеза, желтое тело, мышь, ПЦР в реальном времени, серотонин.

### Введение

Являясь одним из классических нейротрансмиттеров, серотонин обладает целым спектром регуляторных функций вне нервной системы, как в эмбриональном развитии, так и во взрослом организме [1]. В частности, для многих животных, в том числе млекопитающих [2–4], показано участие серотонина в регуляции процессов роста и созревания женских половых клеток. Серотонин в физиологических концентрациях определяется в яичниках млекопитающих, в изолированных ооцитах и клетках кумулюса [5], а также в фолликулярной жидкости [6]. На различных моделях показано, что серотонин обладает активирующим действием на функционирование фолликулярных клеток. У хомячков и крыс серотонин стимулирует синтез эстрадиола в преовуляторных фолликулах, культивируемых *in vitro*, а специфические антагонисты серотониновых рецепторов устраняют этот эффект [2, 3]. Активирующий эффект серотонина наблюдается и на клетках гранулезы человека [7, 8]. У мышей

Regulation of the growth and development of female sex cells is one of the conservative functions of serotonin, but their specific mechanisms remain undisclosed yet. Molecular-genetic study of the presence of all components of the serotonergic system and dynamics of their expression in granulosa cells at different stages of folliculogenesis and in corpus luteum was carried out by reverse transcription with PCR and real-time PCR. Transcripts of enzymes tryptophan hydroxylase *Tph1*, aromatic amino acids decarboxylase *Ddc* and monoamine oxidase *Maoa*, membrane serotonin transporter *Sert* and vesicular monoamine transporter *Vmat2*, as well as serotonin receptors *Htr1b*, *Htr1d*, *Htr2a*, *Htr2b*, *Htr5b* and *Htr7* are detected in probes investigated. A quantitative study revealed that the expression of *Vmat2*, *Htr1b*, and *Htr7* genes is greater in the early stages of folliculogenesis, whereas the expression of the *Vmat1* gene grows by the late stages of follicular development. The relative quantity of the mRNA of the *Ddc*, *Maoa*, *Vmat1* and *Htr1b* genes increases during luteinization, while the expression of the *Vmat2* and *Htr7* genes, on the contrary, decreases. The presence of expression of key components of the serotonergic system and its dynamics allow us to suggest that they are involved in serotonergic regulation of folliculogenesis, as well as luteinization.

**Keywords:** folliculogenesis, luteinization, granulosa, corpus luteum, mouse, real-time PCR, serotonin.

с нокаутом гена транспортера серотонина *Sert* угнетена экспрессия ароматазы *Cyp19a1* и, как следствие, уменьшается содержание эстрадиола в крови. Аналогичный эффект вызывает специфический ингибитор обратного захвата серотонина пароксетин [9]. Сходные результаты получены и на других модельных объектах, например, у самок костистой рыбы *Danio rerio* ингибитор обратного захвата серотонина флуоксетин приводит к уменьшению количества икры и содержания эстрадиола в яичниках, а также к снижению уровня экспрессии мРНК овариальной ароматазы и рецепторов к гонадотропным гормонам [10].

Конкретные механизмы функционирования серотонинергической сигнальной системы в компонентах овариальных фолликулов описаны в литературе далеко не полно. Данных о динамике экспрессии компонентов серотонинергической системы в развивающемся овариальном фолликуле фактически нет, так как большая часть работ выполнена на фолликулярных клетках, выделенных из преовуляторных фолликулов, или ооцит-кумулясных комплексах [5, 11].

С целью решения этих вопросов, и для устранения имеющихся пробелов нами был выполнена полная оценка экспрессии мРНК всех компонентов серотонинергической системы в фолликулярных клетках, исследована динамика их экспрессии в ходе фолликулогенеза, а также при лютеинизации.

### Материал и методы

В работе использовали 30 самок мышей-гибридов F1 линий C57BL/6J и CBA/J в возрасте 2 мес. Содержание животных в одинаковых стандартных условиях вивария и проведение экспериментов осуществлялись в соответствии с международными правилами гуманного обращения с лабораторными животными [12]. Получение материала проводили с применением стандартных методик [13], отдельной пробой являлись клетки, полученные из яичников одной самки. Яичники препарировали в среде L-15 (Sigma-Aldrich, США) под контролем стереомикроскопа. Первичные многослойные фолликулы размером 100-175 мкм изолировали механически двумя острыми иглами и диссоциировали на клетки в растворе 1 мг/мл коллагеназы I (Sigma-Aldrich, США) и 100 мкг/мл ДНКазы I (Sigma-Aldrich, США) в течение 30 мин. при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки гранулезы из антральных и преовуляторных фолликулов размером 200–250 мкм и 400–450 мкм, соответственно, получали посредством пункции тонкой иглой. Желтые тела выделяли микрохирургически из яичников беремен-

ных (5,5 сут.) самок. Положительным контролем служила РНК, выделенная из целого плода на 18 день эмбрионального развития.

Тотальную РНК из полученных проб выделяли с использованием TRI Reagent (Sigma-Aldrich, США) и обрабатывали ДНКазой I (Fermentas, США), согласно протоколам фирм-производителей. Библиотеки кДНК синтезировали с помощью набора реактивов «MMLV RT kit» (Евроген, Россия), используя случайные гексаолигонуклеотиды и 2 мкг РНК в качестве матрицы. ПЦР проводили на амплификаторе T100 (BIO RAD, США) с применением готовой смеси для ПЦР «ScreenMix-HS» (Евроген, Россия). Продукты ПЦР анализировали с помощью агарозного гель-электрофореза и системы видеорегистрации «Взгляд» (Хеликон, Россия). ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) с использованием коммерческой смеси qPCR-HS SYBR + LowROX (Евроген, Россия) и программного обеспечения 7500 Software (Applied Biosystems, США). Относительную экспрессию генов рассчитывали методом dCt [14], контрольный ген – *Hprt*. Специфические олигонуклеотиды для проведения ПЦР (табл.) подбирали с помощью сервиса NCBI Primer-BLAST с учетом экзон-интронной структуры генов.

Каждый эксперимент был проведен в пяти повторностях. Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., США) с применением U-критерия Манна – Уитни.

**Таблица.** Специфические олигонуклеотиды для проведения ПЦР. Температура отжига для всех праймеров 60°C

Название гена NCBI GeneID	Последовательности прямых (f) и обратных (r) праймеров (5'→3')	Длина продукта ПЦР, пн
Tph1	f TGCGACATCAGCCGAGAACAGT	162
21990	r GGCGCAGAAGTCCAGGTCAGA	
Tph2	f CATGGCTCCGACCCCTCTACA	219
216343	r ATACGCCCGCAGTTGACCCTCTT	
Ddc	f TCCCCACGGCTAGCTCATACCC	133
13195	r TTCCCCAGCCAGTCCATCATCA	
Sert (Slc6a4)	f GGGAGACCTGGGGCAAGAAG	182
15567	r CAGGGCGAGCTCCATGTAGAAGA	
Vmat1 (Slc18a1)	f AGAGGCCACGAAGGAGTT	180
110877	r TGCCCAGAGGAGAGGAAAGT	
Vmat2 (Slc18a2)	f CCACTGTCCAGCTCCTACCAACC	149
214084	r GGCGATCAGCAGGAAGGCATAGC	
Maoa	f GCTGAGGAATGGGACAAGATAACC	166
17161	r TACCTCCACACTGCCTCACATACC	
Htr1a	f TGCCCAGCGAATCAGGAG	374
15550	r GCCAAAGACCGAGCCAATAA	
Htr1b	f GACCCGAGCCCAGTTGATA	170
15551	r TAGCGGCCATGAGTTTCTTC	
Htr1d	f ACCCGCACCTGGAACCTT	188
15552	r CAGACGGCCGCAATCAT	
Htr1f	f CCAAGGAAGTAGCCGTGATGATGA	396
15557	r AGGGTAGTGGCTGCTTTGCGTTCT	
Htr2a	f GAAAATCATTGCGGTGTGGAC	168
15558	r ATGATGGTTAGGGGGATGAAAA	

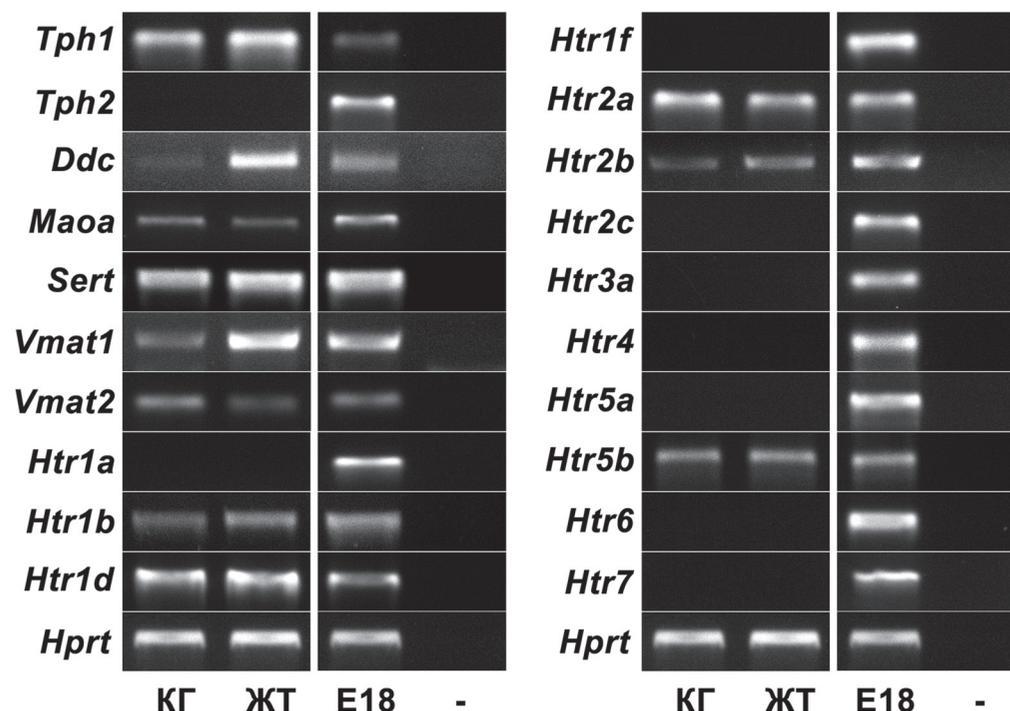
## Окончание таблицы.

Название гена NCBI GeneID	Последовательности прямых (f) и обратных (r) праймеров (5' → 3')	Длина продукта ПЦР, пн
Htr2b 15559	f GAGGGACAGGGGCATACAGT r CAATCGGCATCACAACAATC	401
Htr2c 15560	f GTGCTATTTTCAACTGCGTCCATC r AACACTTTGCTTTGTCGCCCTCAG	200
Htr3a 15561	f TGGCGATCACCGGAAGAAGT r AGGAAGATACTGGGCAGCAAGAGG	200
Htr4 15562	f TACCACAGCATCGATCTTTCAACCT r ACCCAGCAGCCTCCCAACATT	132
Htr5a 15563	f GCAAGCGTGTCTCCAATGTGATGA r GGGTACGGGGGAGACGCTGTT	276
Htr5b 15564	f CCTCTGGCGGTGGTGTCTTTC r CTCGGCGACGGGCTGTGA	157
Htr6 15565	f AACTGGGCAAAGCTCGAACATCTG r CCGTAGCCGTGCCCGTGGTGAG	192
Htr7 15566	f TCCCGTCTAGGCTTTGTGGTA r TGTTCGCTGATGACTGGTTTCT	161
Hprt 15452	f GCTGAGGCGGCGAGGGAGAG r GCTAATCACGACGCTGGGACTGC	148

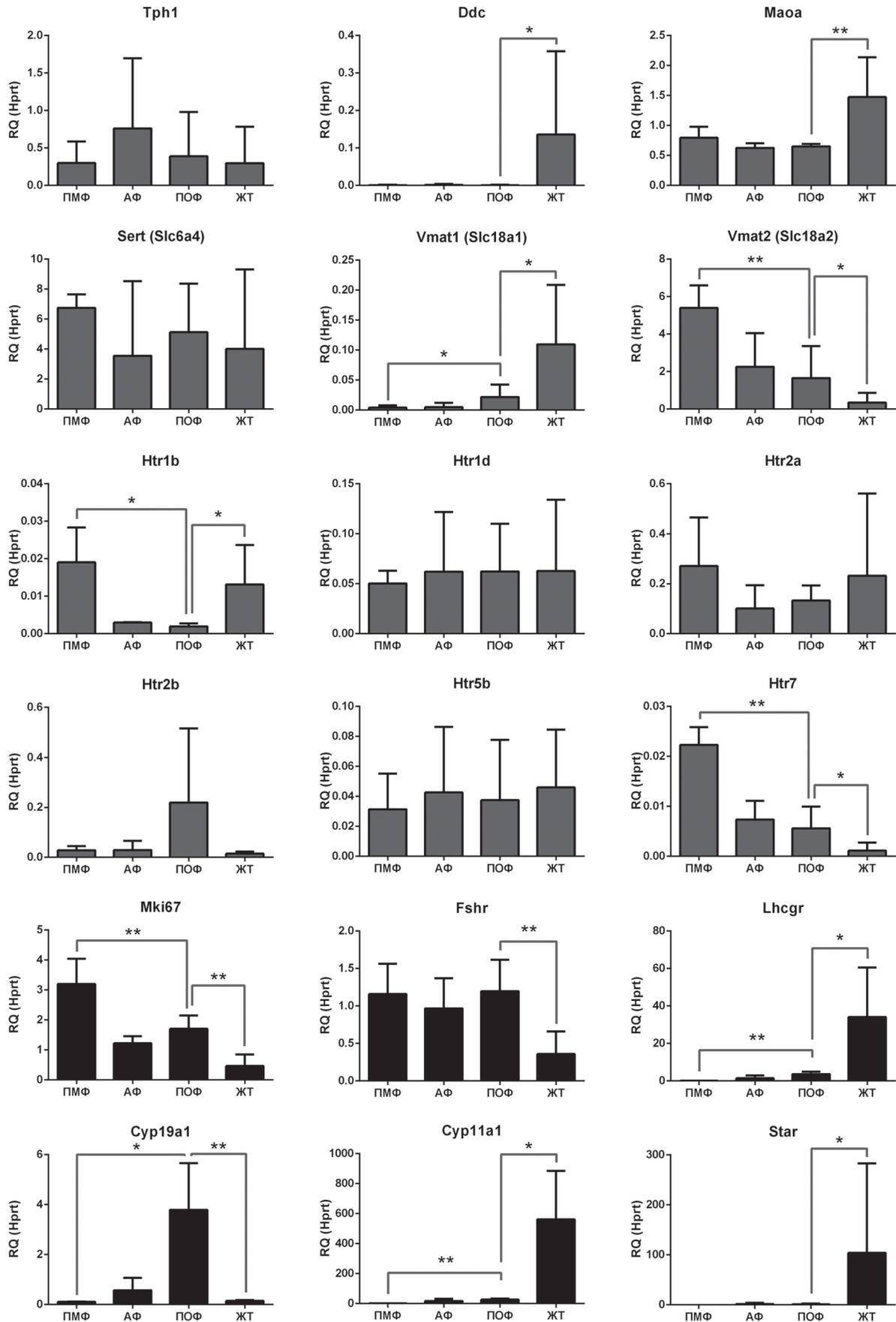
## Результаты

В результате ОТ-ПЦР исследования экспрессии всех основных компонентов серотонинергической сигнальной системы было обнаружено, что в клетках гранулезы преовуляторных фолликулов и желтых тела экспрессируется мРНК ферментов триптофангидроксилазы *Tph1*, декарбоксилазы ароматических аминокислот *Ddc* и моноаминоксидазы *Maoa*, транспортеров *Sert*, *Vmat1* и *Vmat2*,

рецепторов серотонина *Htr1b*, *Htr1d*, *Htr2a*, *Htr2b*, *Htr5b* и *Htr7* (рис. 1). мРНК генов *Tph2*, *Htr1a*, *Htr1f*, *Htr2c*, *Htr3a*, *Htr4*, *Htr5a* и *Htr6* не детектировалась в исследуемых пробах. Для выявления динамики экспрессии мРНК генов серотонинергической системы в ходе фолликулогенеза и оценки изменения их экспрессии при лютеинизации был проведен количественный анализ методом ПЦР в реальном времени (рис. 2).



**Рис. 1.** Экспрессия компонентов серотонинергической системы в клетках гранулезы (КГ) развивающегося овариального фолликула и желтом теле (ЖТ). Положительный контроль — эмбрион 18 дней внутриутробного развития (E18), отрицательный контроль — ПЦР без матрицы (-). Контрольный ген домашнего хозяйства — гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза *Hprt*



**Рис. 2.** Динамика экспрессии компонентов серотонинергической системы (светло-серые) и маркеров функциональной активности фолликулярных клеток (темно-серые) в клетках гранулезы в ходе фолликулогенеза и при лютеинизации: ПМФ – первичные многослойные фолликулы, АФ – антральные фолликулы, ПОФ – преовуляторные фолликулы, ЖТ – желтое тело. Относительная экспрессия (RQ) генов нормирована по гену домашнего хозяйства Hprt. Статистическая значимость различий: \*  $p < 0,1$ ; \*\*  $p < 0,05$

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ряд генов серотонинергической системы: *Tph1*, *Ddc*, *Maoa*, *Sert*, *Htr1d*, *Htr2a*, *Htr2b* – не обладают выраженной динамикой экспрессии в ходе фолликулярного роста. Это справедливо и для генов рецептора фолликулостимулирующего гормона *Fshr* и гена *Star*. При этом для мРНК гена *Vmat1* наблюдается тенденция к увеличению количества на поздних стадиях, что характерно для таких маркеров функционального состояния фолликулярных клеток, как рецептор лютеинизирующего гормона *Lhcgr* и ключевые ферменты синтеза стероидных гормонов *Cyp11a1* и *Cyp19a1*. В то же время, относительное количество мРНК генов *Vmat2*, *Htr1b* и *Htr7* уменьшается в ходе фолликулогенеза. Такая же динамика прослеживается для маркера пролиферации *Mki67*. В желтых телах, по сравнению с клетками гранулы преовуляторного фолликула, экспрессия генов *Tph1*, *Sert*, *Htr1d*, *Htr2a* и *Htr2b* значимо не изменяется, а для генов *Htr1b*, *Maoa*, *Vmat1*, *Ddc* наблюдается увеличение относительной экспрессии, как и в случае классических маркеров лютеинизации *Lhcgr*, *Star*, *Cyp11a1*. Количество мРНК генов *Htr7*, *Vmat2*, также как и маркеров функционального состояния фолликулярных клеток *Mki67*, *Cyp19a1* и *Fshr*, уменьшается при лютеинизации.

### Обсуждение

В фолликулярных клетках развивающегося овариального фолликула экспрессируется целый ряд компонентов серотонинергической системы, которые могут составить функционально полноценную сигнальную систему. Ранее показана экспрессия отдельных компонентов серотонинергической системы для клеток кумулюса, выделенных из ооциткумулюсных комплексов, и культур клеток гранулы [15]. В нашей работе мы подтвердили литературные данные и провели полную проверку экспрессии всех компонентов серотонинергической системы, результаты которой позволяют полагать, что в фолликулярных клетках активны системы мембранного и везикулярного транспорта, деградации и рецепции серотонина, а в желтых телах, возможно, появляется синтез трансммиттера.

Динамика экспрессии гена является важным показателем его функциональной активности. Выявленные изменения уровня экспрессии гена могут свидетельствовать о его функциональной активности на той или иной стадии. Так, в ходе фолликулярного роста наблюдается активация синтеза эстрогенов, которая сопровождается увеличением количества мРНК генов *Cyp11a1* и *Cyp19a1*, кодирующих стероидогенные ферменты. Также увеличивается экспрессия гена рецептора лютеинизирующего гормона *Lhcgr*, играющего важную роль на поздних стадиях фолликулогенеза. Ген везикулярного транспортера моноаминов *Vmat1* обладает такой же динамикой экспрессии, что может указывать на его роль в регуляции стероидогенной активности фолликулярных клеток на поздних стадиях фолликулогенеза. В то же время, для ранних стадий фолликулярного роста характерна повышенная способность фолликулярных клеток к пролиферации, которой сопутствует увеличенная экспрессия мРНК маркера *Mki67*. Везикулярный транспортер моноаминов *Vmat2* и рецепторы

серотонина *Htr1b* и *Htr7* экспрессируются на более высоком уровне в первичных фолликулах, что может говорить о возможной роли этих генов в регуляции пролиферативной активности клеток гранулы на ранних стадиях фолликулогенеза. В пользу этого предположения говорит то, что серотонин является регулятором пролиферативной активности различных типов клеток, как в норме, так и при патологиях [16–18].

В норме после овуляции фолликулярные клетки достигают терминальной стадии дифференцировки и становятся большими клетками желтого тела. Преждевременная лютеинизация известна как одна из причин бесплодия [19] и считается негативным явлением при культивировании клеток гранулы [20]. Процесс лютеинизации сопряжен с изменением уровня экспрессии ряда генов [21]. Активация усиленного синтеза прогестерона происходит на фоне увеличения экспрессии генов *Cyp11a1* и *Star*, а также рецептора к лютеинизирующему гормону и хорионическому гонадотропину *Lhcgr*. В то же время в желтом теле увеличивается экспрессия таких компонентов серотонинергической системы, как *Ddc*, *Vmat1*, *Maoa*, *Htr1b*, которые, по всей вероятности, играют роль в функционировании желтого тела. В то же время экспрессия ряда генов, наоборот, падает при лютеинизации – это характерно для ароматазы *Cyp19a1*, рецептора *Fshr* и маркера пролиферации *Mki67*. Такую же картину мы видим для *Vmat2* и *Htr7*. Именно эти гены можно считать возможными эффекторами серотонинергической регуляции функционального состояния фолликулярных клеток во время фолликулогенеза.

Полученные данные отражают динамику экспрессии мРНК, однако регуляция экспрессии и активности генов может происходить на последующих стадиях трансляции и посттрансляционных модификаций. Безусловно, активность генов серотонинергической системы на тех или иных стадиях фолликулогенеза в последующем необходимо подтвердить, используя методы выявления белка. Тем не менее, мы видим, что в ходе фолликулярного роста и при лютеинизации экспрессируются гены ряда компонентов серотонинергической сигнальной системы. Отдельные ее компоненты, а именно *Vmat1*, *Vmat2*, *Htr1b*, *Htr2b*, *Htr7*, обладают выраженной динамикой экспрессии мРНК в ходе фолликулярного роста, что указывает на их возможную роль в качестве регуляторов функционального состояния фолликулярных клеток на той или иной стадии фолликулогенеза. Кроме того, полученные данные свидетельствуют о перестройке серотонинергической системы, происходящей во время лютеинизации. Ряд генов, такие как *Ddc*, *Maoa*, *Vmat1*, *Htr1b*, можно считать количественными маркерами лютеинизации и использовать для контроля этого процесса в работах по культивированию фолликулярных клеток. При этом гены *Vmat2* и *Htr7*, напротив, являются маркерами фолликулярной стадии.

### Благодарности

Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП ИБР им. Н.К. Кольцова РАН, при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-34-60250 мол\_а\_дк и гранта Президента Российской Федерации МК-1304.2017.4.

## ЛИТЕРАТУРА:

1. Бузников Г.А. Донервные транмиттеры как регуляторы эмбриогенеза. Современное состояние проблемы. Онтогенез 2007; 38(4): 262-70.
2. Terranova P.F., Uilenbroek J.T., Saville L. et al. Serotonin enhances oestradiol production by hamster preovulatory follicles in vitro: effects of experimentally induced atresia. J. Endocrinol. 1990; 125(3): 433-8.
3. Tanaka E., Baba N., Tshida K. et al. Serotonin stimulates steroidogenesis in rat preovulatory follicles: involvement of 5-HT2 receptor. Life Sci. 1993; 53(7): 563-70.
4. Sheng Y., Wang L., Liu X.S.J. et al. A serotonin receptor antagonist induces oocyte maturation in both frogs and mice: evidence that the same G protein-coupled receptor is responsible for maintaining meiosis arrest in both species. J. Cell. Physiol. 2005; 202(3): 777-86.
5. Amireault P., Dubé F. Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos. Biol. Reprod. 2005; 73(2): 358-65.
6. Bòdis J., Bognár Z., Hartmann G. et al. Measurement of nor-adrenaline, dopamine and serotonin contents in follicular fluid of human graafian follicles after superovulation treatment. Gynecol. Obstet. Invest. 1992; 33(3): 165-7.
7. Koppán M., Bodis J., Verzar Z. et al. Serotonin may alter the pattern of gonadotropin-induced progesterone release of human granulosa cells in superfusion system. Endocrine 2004; 24(2): 155-9.
8. Graveleau C., Paust H.J., Schmidt-Grimminger D. et al. Presence of a 5-HT7 receptor positively coupled to adenylate cyclase activation in human granulosa-lutein cells. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2000; 85(3): 1277-86.
9. Zha W., Ho H.T.B., Hu T. et al. Serotonin transporter deficiency drives estrogen-dependent obesity and glucose intolerance. Sci. Rep. 2017; 7(1): 1137.
10. Lister A., Regan C., Van Zwol J. et al. Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: A mechanistic evaluation. Aquat. Toxicol. 2009; 95(4): 320-9.
11. Amireault P., Dubé F. Intracellular cAMP and calcium signaling by serotonin in mouse cumulus-oocyte complexes. Mol. Pharmacol. 2005; 68(6): 1678-87.
12. Европейская конвенция об охране позвоночных животных, используемых для экспериментов и в других научных целях (ETS №123). Страсбург, 18 марта 1986 года, <http://conventions.coe.int/Treaty/EN/Treaties/PDF/123-Arev.pdf>.
13. Дыбан А.П., Пучков В.Ф., Баранов В.С. и др. Лабораторные млекопитающие: мышь *Mus musculus*, крыса *Rattus norvegicus*, кролик *Oryctolagus cuniculus*, хомячок *Cricetus griseus*. В: Бакулина Э.Д., Баранов В.С., Белорусов Л.В. и др., редакторы. Объекты биологии развития. М.: Наука; 1975. с. 505-66.
14. Bookout A.L., Cummins C.L., Mangelsdorf D.J. et al. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. In: Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E. et al., editors. Current Protocols in Molecular Biology. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2006. Chapter 15: Unit 15.8.
15. Dubé F., Amireault P. Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos. Life Sci. 2007; 81(25-6): 1627-37.
16. Yavarone M.S., Shuey D.L., Tamir H. et al. Serotonin and cardiac morphogenesis in the mouse embryo. Teratology 1993; 47(6): 573-84.
17. Azmitia E.C. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. Brain Res. Bull. 2001; 56(5): 413-24.
18. Siddiqui E.J., Thompson C.S., Mikhailidis D.P. et al. The role of serotonin in tumour growth (review). Oncol. Rep. 2005; 14(6): 1593-7.
19. Van Kasteren Y.M., Schoemaker J. Premature ovarian failure: A systematic review on therapeutic interventions to restore ovarian function and achieve pregnancy. Hum. Reprod. Update 1999; 5(5): 483-92.
20. Myers M., van den Driesche S., McNeilly A.S. et al. Activin A reduces luteinisation of human luteinised granulosa cells and has opposing effects to human chorionic gonadotropin in vitro. J. Endocrinol. 2008; 199(2): 201-12.
21. Sugino N. Molecular mechanisms of luteinization. Obstet. Gynecol. Sci. 2014; 57(2): 93-101.

Поступила: 13.07.2017