ОНТОГЕНЕЗ, 2023, том 54, № 3, с. 183–195

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.25,591.465.1

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ-МАРКЕРОВ ЯИЧНИКА ВЫЯВИЛ АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ СЕРОТОНИНА И АНДРОСТЕНДИОНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС КЛЕТОК ГРАНУЛЕЗЫ МЫШИ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ

© 2023 г. Н. М. Алёшина[a], В. Р. Русанова[b], Л. А. Мальченко[a], Ю. В. Храмова[b], Ю. О. Никишина[a], В. В. Кондукторова[b], А. Ю. Евстифеева[b], Д. А. Никишин[a, b, *]

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

[b] *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия*

*****e-mail: d.nikishin@idbras.ru*

Поступила в редакцию 01.04.2023 г.
После доработки 02.05.2023 г.
Принята к публикации 03.05.2023 г.

Получение первичной культуры клеток гранулезы необходимо для комплексного исследования нормальной функции и патологий яичника. В данной работе мы предлагаем оптимизированный протокол получения первичной культуры клеток гранулезы мыши в наиболее функционально активном состоянии. Полученная культура была использована для выявления влияния андростендиона и серотонина на экспрессию мРНК маркеров яичников, отражающих функциональное состояние клеток гранулезы. Морфофункциональный анализ яичника после стимуляции гонадотропином сыворотки жеребой кобылы (ГСЖК) показал, что 48 ч после инъекции – оптимальный срок для получения клеток гранулезы в наиболее активном функциональном состоянии. Анализируя набор из 14 маркерных генов функционального состояния яичников, мы выявили, что андростендион ингибирует экспрессию маркеров клеток кумулюса и ранних, незрелых клеток гранулезы, при этом уровень экспрессии генов, характерных для зрелого состояния гранулезы, увеличивается. С помощью метода иммуноцитохимии мы показали, что клетки гранулезы экспрессируют серотонинергические рецепторы и транспортер серотонина SERT. Анализ экспрессии генов-маркеров яичника показал, что серотонин повышает экспрессию генов, характеризующих дифференцировку клеток гранулезы в клетки кумулюса. Данные, полученные в работе, позволяют заключить, что серотонин и андростендион оказывают антагонистическое действие на функциональное состояние клеток гранулезы мыши в первичной культуре *in vitro*.

Ключевые слова: клетки гранулезы, первичная культура, яичник, гены маркеры, ГСЖК, серотонин, андростендион, LCA

DOI: 10.31857/S0475145023030023, **EDN:** ZQXTMI

ВВЕДЕНИЕ

Слой клеток гранулезы представляет собой ключевой компонент развивающегося фолликула яичника, служащий посредником между развивающимся ооцитом и тканями материнского организма. Первичная культура клеток гранулезы широко используется как модель для экспериментального изучения функции яичников в норме и при патологии (Galas, 2012). При изучении этих клеток важно иметь в виду, что они способны изменять свою функцию, дифференцируясь в процессе роста фолликула, благодаря динамическому взаимодействию с созревающим ооцитом и окружающими стромальными тканями (Alam et al., 2020; Morris et al., 2022). Таким образом, оптимизация условий получения первичной культуры клеток гранулезы и стандартизация экспериментальных протоколов является важнейшим условием получения воспроизводимых результатов.

Являясь одним из классических нейротрансмиттеров, серотонин выполняет целый ряд регуляторных функций вне нервной системы, как в эмбриональном развитии, так и во взрослом организме (Buznikov, 2007). В частности, для многих животных, в том числе млекопитающих, показано участие серотонина в регуляции роста и созревания женских половых клеток (Terranova et al., 1990; Tanaka et al., 1993; Sheng et al., 2005). Серотонин в физиологических концентрациях определяется в яичниках млекопитающих, в изолиро-

ванных ооцитах и клетках кумулюса (Amireault et al., 2005), а также в фолликулярной жидкости (Bódis et al., 2020). На различных моделях показано, что серотонин стимулирует активность фолликулярных клеток. У хомяков и крыс серотонин стимулирует синтез эстрадиола в преовуляторных фолликулах, культивируемых *in vitro*, при этом специфические антагонисты серотониновых рецепторов отменяют этот эффект (Terranova et al., 1990; Tanaka et al., 1993). Стимулирующее действие серотонина наблюдается в том числе и на клетках гранулезы человека (Graveleau et al., 2000; Koppan et al., 2004). Серотонин, наряду с другими нейротрансмиттерами и нейрогормонами, вовлечен в патогенез таких заболеваний репродуктивной системы, как синдром поликистоза яичников (Szeliga et al., 2022) и опухоли яичника (Qin et al., 2021). Конкретные механизмы влияния серотонина на функциональное состояние клеток гранулезы могут сильно различаться у разных видов и требуют более детального изучения. В фолликулярных клетках мыши показана экспрессия мРНК не только ферментов синтеза и деградации серотонина, мембранного и везикулярного транспортера, но и нескольких типов серотониновых рецепторов (Nikishin et al., 2018a).

Существует ряд маркерных генов, о которых известно, что они количественно отражают функциональное состояние клеток гранулезы. Активность стероидогенеза в клетках оценивается по уровню экспрессии ими ферментов синтеза андрогенов и эстрогенов. Ген *Cyp17a1* кодирует фермент синтеза андрогенов, которые являются субстратом для синтеза эстрогенов ароматазой. Ароматаза в свою очередь кодируется геном *Cyp19a1*, уровень экспрессии мРНК которого в фолликуле коррелирует с концентрацией эстрадиола в крови и может быть использован в качестве показателя способности клеток гранулезы синтезировать эстрогены (Grzesiak et al., 2012). Ген *Star* кодирует стероидогенный острый регуляторный белок, который транспортирует холестерин к внутренним мембранам митохондрий. Этот процесс является лимитирующей стадией стероидогенеза, и уровень экспрессии *Star* легко изменяется под действием факторов, регулирующих этот синтез (Niswender, 2002; Fang et al., 2015). Важнейшими количественными показателями зрелости фолликулярных клеток являются уровни экспрессии генов рецепторов гонадотропных гормонов. Относительное содержание как транскриптов, так и белковых продуктов генов рецептора фолликулостимулирующего гормона *Fshr* и рецептора лютеинизирующего гормона *Lhr* увеличивается в процессе фолликулогенеза и достигает высоких значений в нормальных преовуляторных фолликулах, в то время как в атретических фолликулах этот уровень остается низким (Bao et al., 1997). В качестве маркеров функциональной активности клеток гранулезы также используют уровни экспрессии мРНК генов гиалуронатсинтетазы *Has2*, белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста *Igfbp4*, простагландин-эндопероксидсинтетазы *Ptgs2* и лиганда сигнального пути Hedgehog *Ihh* (Zhen et al., 2014). Для клеток гранулезы растущих фолликулов характерна способность к пролиферации. Для того, чтобы охарактеризовать пролиферативную активность клеток гранулезы может быть использована количественная оценка уровня экспрессии стандартных маркеров – ядерного антигена пролиферирующих клеток *Pcna*, маркера пролиферации *Ki-67* (*Mki67*), а также циклинов *Ccnd1* и *Ccnd2* (Han et al., 2013; Zhen et al., 2014). Помимо прочего, в культуре клеток гранулезы необходимо контролировать степень лютеинизации. Так, уровень экспрессии скорость лимитирующего фермента синтеза стероидных гормонов *Cyp11a1* повышается при активации синтеза прогестерона в крупных лютеоцитах (Rapoport et al., 1998). В клетках желтого тела по сравнению с клетками гранулезы также увеличивается количество мРНК генов *Star* и *Lhr* (Lee et al., 2013).

В данной работе мы предложили оптимизированный протокол получения первичной культуры клеток гранулезы мыши в функционально активном состоянии и выявили влияние андростендиона и серотонина на экспрессию маркеров яичников, отражающих функциональное состояние клеток гранулезы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

В экспериментах использовали самок мышей линии C57BL/6, содержащихся в ЦКП биологических моделей Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Животных содержали в контролируемых условиях (22–24°C и фотопериод 14L:10D). Мышам давали свободный доступ к пище и воде. Гормональную стимуляцию для роста фолликулов проводили путем введения гонадотропина сыворотки жеребой кобылы (ГСЖК) (“Фоллимаг”, Мосагроген, Москва, Россия) по 5 МЕ/мышь в 15–16 ч дня. Яичники выделяли через 12–60 ч после инъекции ГСЖК для дальнейшего исследования. Для молекулярно-генетического анализа интактный контрольный образец получали одновременно с началом эксперимента (0 ч).

Первичная культура клеток гранулезы

Яичники мышей, стимулированных ГСЖК, предварительно инкубировали с 6 мМ ЭГТА и 0.5 М сахарозы (Sèdes et al., 2013) и получали клетки путем пункции фолликулов иглой инсулинового шприца (26.5 G). Агрегаты клеток и ооциты удалялись путем фильтрации клеточной суспензии

через 40-мкм нейлоновый клеточный фильтр (BD Biosciences). Жизнеспособность клеток гранулезы определяли окрашиванием трипановым синим. Клетки гранулезы (0.9×10^6 на лунку в 6-луночном планшете) высевали на ночь в DMEM/F-12 с 10% FBS при 95% влажности и 5% CO_2. Андростендион (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) добавляли в культуральную среду в концентрации 100 нМ, оптимальной для поддержания функциональной активности клеток гранулезы (Corredor et al., 1983). После культивирования в течение ночи в бессывороточной среде клетки гранулезы обрабатывали 1 мкМ серотонин-креатинсульфата (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) в течение 48 часов с однократной сменой среды.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Образцы культуральной среды объемом 20 мкл растворяли в 200 мкл 0.1 N $HClO_4$ с 25 пмоль/мл 3,4-дигидроксибензиламина (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) с последующим центрифугированием при 2000 *g* в течение 20 мин. В приготовленных образцах измеряли концентрацию серотонина с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимическим детектированием по описанному протоколу (Kim et al., 2019).

ПЦР в реальном времени

Тотальную РНК выделяли из яичников или клеток с использованием реагента для выделения РНК (Евроген, Москва, Россия). Затем проводили обработку ДНКазой I типа (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), после чего 1 мкг тотальной РНК из каждой группы подвергали обратной транскрипции с использованием случайных гексадеоксинуклеотидов и обратной транскриптазы MMLV (Евроген, Москва, Россия). Реакцию ПЦР в реальном времени проводили для количественного определения уровней мРНК генов интереса с использованием системы StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) и набора qPCRmix-HS SYBR + HighROX (Евроген, Москва, Россия). В каждом эксперименте уровни экспрессии выбранных генов в каждой группе нормализовали относительно референсного гена с использованием метода $2^{-\Delta Ct}$ при одинаковых пороговых значениях для всех генов. В качестве референсных генов использовали *Rps18* и *Tbp*, для которых показана стабильная экспрессия в ткани яичника (Nikishin et al., 2018). Анализ кривой плавления и проверка правильной температуры плавления продукта ПЦР (табл. 1) использовались для оценки специфичности реакции. Все последовательности праймеров, использованные для проведения количественной ПЦР, перечислены в табл. 1.

Вестерн-блоттинг

Образцы ткани яичника гомогенизировали в буфере RIPA, а концентрацию белка измеряли с помощью набора для анализа белка BCA Pierce™ (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Образцы денатурировали в буфере Лэммли в течение 30 мин при 37°C. Белки разделяли с помощью 10% SDS-PAGE, а затем переносили на мембрану Immun-Blot® PVDF (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния, США) при помощи электрофореза. Мембраны блокировали 5% БСА в течение 1 ч при комнатной температуре и инкубировали с первичными антителами (табл. 2) в течение 1 ч при комнатной температуре. После отмывки в TBST мембраны инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (табл. 2). После отмывки в TBST конъюгированные антитела визуализировали с помощью усиленной хемилюминесценции в 0.1 М Трис-HCl, pH 8.5, 12.5 мМ люминола, 2 мМ кумаровой кислоты и 0.09% H_2O_2. Интенсивность проявления белка измеряли с использованием системы визуализации ChemiDoc™ и программного обеспечения Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния, США). Уровни экспрессии белковых продуктов генов нормализовали по белку GAPDH.

Иммуногистохимия и флуоресцентная микроскопия

Яичники фиксировали в 4% параформальдегиде (PFA) в течение ночи при 4°C, затем инкубировали в течение 1 ч в 15% сахарозе, после чего в течение ночи в 30% сахарозе и заключали в Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound (Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Чиба, Япония). Криосрезы толщиной 20 мкм получали на криостате CM1900 (Leica Biosystems, Дир-Парк, Иллинойс, США), и каждый пятый срез помещали на покрытое силаном предметное стекло. Образцы окрашивали FITC-конъюгированным агглютинином Lens Culinaris (FITC-LCA, 1 : 1000) (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), а ДНК окрашивали с помощью 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США).

Клетки гранулезы, адгезированные к покровным стеклам, покрытым полилизином, фиксировали в 4% параформальдегиде (PFA) в течение ночи при 4°C. Затем эти стекла отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и пермеабилизировали в 0.1% Triton X-100 в течение 15 мин. Образцы инкубировали в блок-растворе, содержащем 5% бычьего сывороточного альбумина (БСА), а затем

Таблица 1. Специфические олигонуклеотиды, использованные для проведения ПЦР в реальном времени

Название гена	NCBI Gene ID	Последовательности прямых (F) и обратных (R) праймеров, 5' → 3'	$T_{отж}$, °C	Длина продукта, п.н.	$T_{пл}$ продукта, °C
Adamdec1	58860	F: TGGCTCTTGTTGCACTGATGT R: CTTGAAAATGAGAACGGCTGAC	61.0 61.1	162	82.9
Ccnd1	12443	F: GACACCAATCTCCTCAACGACC R: GGCCACGATTTTCCGCATG	62.7 66.3	129	86.1
Ccnd2	12444	F: GGCGTGTTCGTCATCTGCTA R: AACTATACGGCCTTTTCCTCTCA	61.5 61.2	174	78.8
Cyp11a1	13070	F: GCCTGGAGCCATCAAGAACT R: GAAAAGCGGAATAGGTCATCACT	61.1 61.3	138	82.8
Cyp17a1	13074	F: CGGTGGCCCCCTTGCTCA R: GGCTGGTCCCATTCATTTTTATCGTG	69.2 70.2	133	84.0
Cyp19a1	13075	F: TCTCCTCATCAAACCAAACATCTTCT R: CAGTTGCAAAATCCATACAGTCTTCC	64.3 65.0	164	80.2
Fshr	14309	F: TGCTACACCCACATCTACCTCACA R: GGATCTTGGCCTTGGACACAGT	63.9 64.6	187	85.3
Has2	15117	F: GCGGAAGAAGGGACAACA R: TGCGGTGCCACAATACTG	58.5 58.7	143	82.9
Igfbp4	16010	F: GAAAGGAATGGGGTGAGGAAG R: GGTGGTGGGCAACTAGAAAGATA	62.0 62.0	195	86.0
Ihh	16147	F: CAACTACAATCCCGACATCATCTT R: TCACCCGCAGTTTCACACC	61.8 61.9	140	86.4
Lhcgr (*Lhr*)	16867	F: CTCTCACCTATCTCCCTGTCAAAGTAA R: TGTAAAAGCACCGGGTTCAATGT	63.4 65.2	197	81.7
Mgp	17313	F: CGCCGAGGAGCCAAATA R: AACCCGCAGAAGGAAGGA	59.8 59.8	162	83.4
Mki67 (*Ki67*)	17345	F: CGGGATAAAGAAAAACGAGAAG R: TTGGCCCCGAGATGTAGATT	59.9 61.4	100	81.2
Nr5a2	26424	F: CGAGGGGGCAGAAATAAGTT R: TGGAGGCGGAATGAATGTT	60.5 60.6	172	84.6
Pcna	18538	F: CCGAGACCTTAGCCACATTG R: GTTACCGCCTCCTCTTCTTTATC	60.1 60.4	144	81.6
Ptgs2	19225	F: CCCTCCGGTGTTTGTCCTT R: CCTGCAGCATTTTTCATCTTGTA	61.6 61.8	200	78.8
Rps18	20084	F: AAGAAAATTCGAGCCCATAGAGG R: TAACAGCAAAGGCCCAGAGACT	62.8 62.6	138	86.1
Runx2	12393	F: ATGATGACACTGCCACCTCTG R: CTGGGTAGTGCATTCGTGGG	60.1 63.1	165	86.3
Star	20845	F: GCCCACTTTTCTGTCCCTTAT R: CTGCCCTCGCTCACCTTA	59.6 59.0	163	80.8
Tbp	21374	F: GTAGCGGTGGCGGGTATCT R: CGTCTTCAATGTTCTGGGTTATCT	61.9 61.3	120	84.1

Таблица 2. Антитела, использованные для иммуногистохимии и вестерн-блоттинга

Антиген	Конъюгат	Животное, в котором произведены	Клональность	Производитель, каталожный номер	Разведение
Cyp19a1	Нет	Кролик	Поликлональные	ab18995, Abcam, Кэмбридж, Великобритания	ИЦХ: 1 : 1000 ВБ: 1 : 10000
Fshr	Нет	Кролик	Поликлональные	ab150557, Abcam, Кэмбридж, Великобритания	ИЦХ: 1 : 1000 ВБ: 1 : 10000
Sert	Нет	Коза	Поликлональные	ab130130, Abcam, Кэмбридж, Великобритания	ИЦХ: 1 : 1000
Htr1d	Нет	Кролик	Поликлональные	PA5-95901, Thermo Fisher Scientific, Уолтэм, Массачусетс, США	ИЦХ: 1 : 1000
Htr2a	Нет	Кролик	Поликлональные	PA5-95288, Thermo Fisher Scientific, Уолтэм, Массачусетс, США	ИЦХ: 1 : 1000
Htr7	Нет	Кролик	Поликлональные	SAB46000178, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США	ИЦХ: 1 : 1000
Gapdh	Нет	Кролик	Моноклональные	2118, Cell Signaling Technology, Массачусетс, США	ВБ: 1 : 20000
IgG кролика	CF™ 568	Осел	Поликлональные	SAB4600076, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США	ИЦХ: 1 : 1000
IgG козы	CF™ 633	Осел	Поликлональные	SAB46000128, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США	ИЦХ: 1 : 1000
IgG кролика	HRP	Коза	Поликлональные	111–035-144, Jackson ImmunoResearch Labs, Уест Гроув, Пенсильвания, США	ВБ: 1 : 50000

последовательно инкубировали с первичными и вторичными антителами (табл. 2). Для исследования специфичности антител использовался контроль без добавления первичных антител. ДНК контрастировали с DAPI.

Образцы помещали в монтирующую среду Fluoroshield (Abcam, Кембридж, Великобритания) и анализировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM880 (Carl Zeiss AG, Оберкохен, Германия). Микрофотографии анализировали с использованием программного обеспечения FIJI ImageJ.

Морфологический анализ

При окрашивании красителем FITC-LCA на микрофотографиях хорошо различаются границы фолликулов (рис. 1а). Для анализа выбирали только растущие фолликулы с ооцитом, окруженным одним или несколькими слоями клеток гранулезы с округлыми ядрами, при этом исключали примордиальные фолликулы с ооцитами, окруженными клетками прегранулезы. Фолликулы, попавшие на срез, но не содержащие ооцитов, не учитывались.

На микрофотографиях общая площадь фолликула определялась вдоль границы клеток теки и гранулезы (см. рис. 1б). Диаметр фолликула (*D* фолл.) рассчитывали по общей площади фолликула как диаметр Хейвуда. Площадь гранулезы (*S* гран.) рассчитывали, как общую площадь фолликула за вычетом площади ооцита и полостей.

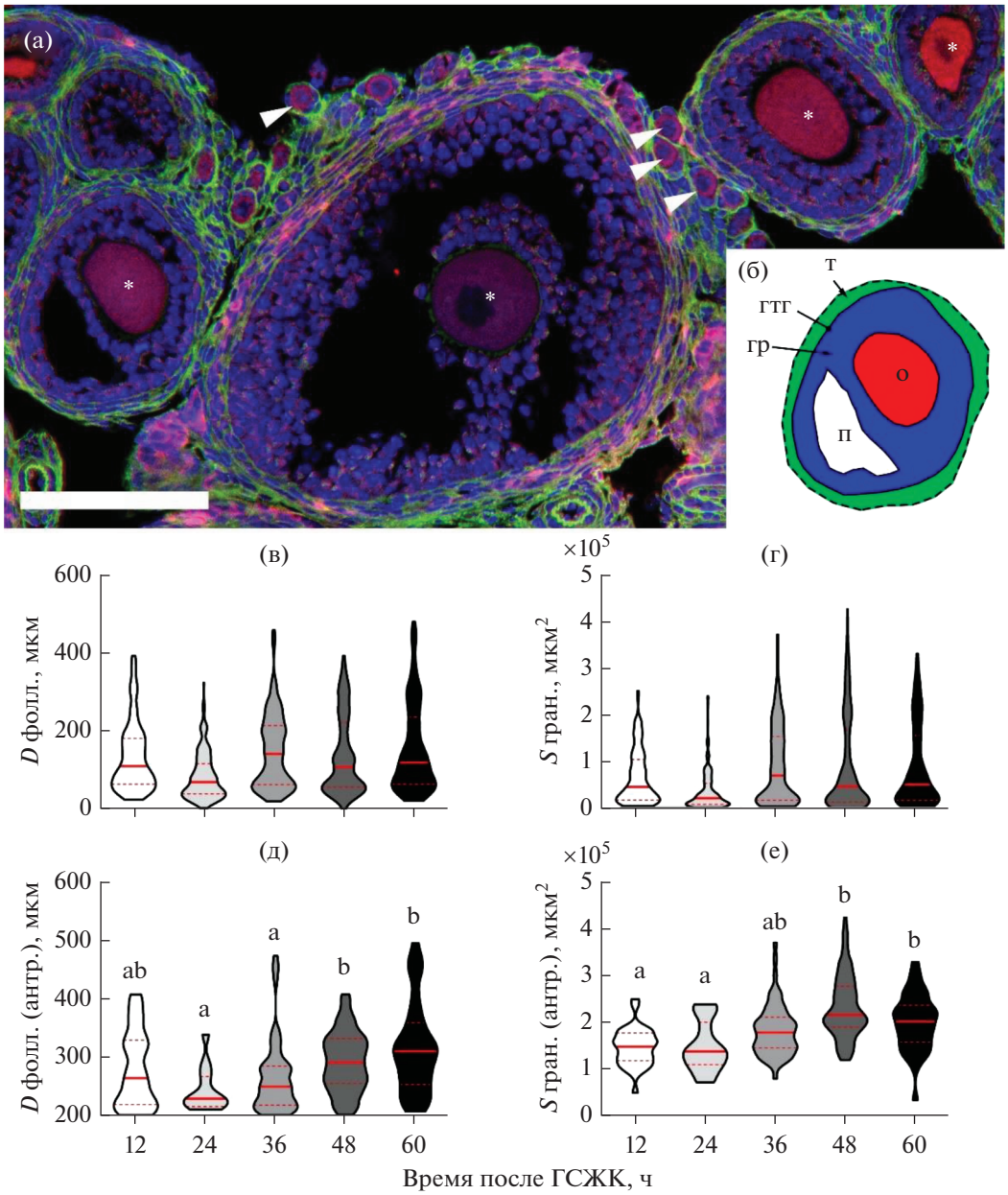

Рис. 1. Морфометрический анализ яичников после стимуляции ГСЖК. (а) Конфокальная микрофотография криосреза ткани яичника, окрашенного с помощью FITC-LCA (зеленый) и DAPI (синий), а также маркированного антителами против Ddx4 (красный). Примордиальные фолликулы отмечены стрелками, ооциты растущих фолликулов отмечены звездочками. Масштабная линейка: 100 мкм. (б) Схематическое изображение зон фолликула, отражающее методику расчета морфометрических параметров. т – слой клеток теки, гр – слой клеток гранулезы, гтг – граница клеток теки и гранулезы, о – ооцит, п – полость фолликула. (в–е) Графики, демонстрирующие распределение морфологических параметров растущих фолликулов после стимуляции ГСЖК. (в) Диаметр фолликула. (г) Зона клеток гранулезы – площадь, которую занимают клетки гранулезы на срезе фолликула. (д) Диаметр антрального фолликула. (е) Зона клеток гранулезы антрального фолликула. Медиана с межквартильным размахом отмечена красным. Разные буквы обозначают статистическую значимость между группами при $p < 0.05$ по критерию Крускала–Уоллиса с множественными сравнениями Данна.

Статистический анализ

Результаты были статистически обработаны с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США). Критерием значимости считали $p < 0.05$. Корреляционный анализ и построение коррелограммы выполнены с использованием программного обеспечения R (версия 3.2.4).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оптимальный срок получения клеток гранулезы в наиболее активном функциональном состоянии – 48 ч после инъекции ГСЖК

Оптимизация метода выделения клеток гранулезы после гормональной стимуляции необходима для получения первичной культуры в наиболее активном функциональном состоянии. Для того, чтобы оценить динамику фолликулогенеза и выявить сроки, когда возможно выделение максимального количества клеток, было проведено морфологическое исследование яичников мышей через 12, 24, 36, 48 и 60 ч после инъекции ГСЖК. Морфометрические параметры растущих фолликулов яичников измеряли на изображениях криосрезов яичников, окрашенных красителем LCA-FITC, который выявил границы зоны, занимаемой клетками гранулезы (рис. 1). Численные показатели диаметра фолликулов и площади, занятой клетками гранулезы на срезе фолликула, показаны на рис. 1в и 1г. По этим параметрам не было обнаружено существенных различий. Однако на диаграмме на рис. 1г прослеживается тенденция к увеличению площади гранулезы к 48 ч после инъекции ГСЖК. Для дальнейшего анализа отобрали только те фолликулы, диаметр которых составлял более 200 мкм. Этот размер соответствует стадии перехода от преантрального фолликула к антральному, когда в фолликуле только начинает формироваться полость и он приобретает чувствительность к гонадотропным гормонам гипофиза и, следовательно, может реагировать на сигнал ГСЖК. Диаметры и площади гранулезы антральных фолликулов показаны на рис. 1д и 1е. Эти параметры оказались значительно выше через 48 и 60 ч после инъекции по сравнению с более ранними периодами. Площадь, занимаемая клетками гранулезы антральных фолликулов, достигает максимального значения через 48 ч после инъекции ГСЖК.

Немаловажное значение для воспроизводимости результатов, полученных в экспериментах на первичной культуре, имеет функциональное состояние клеток, выделенных из динамически развивающихся фолликулов яичников. Мы провели количественное исследование экспрессии мРНК генов-маркеров функционального состояния яичников с целью уточнения оптимального времени выделения клеток гранулезы после стимуляции ГСЖК. Выбранный набор из 14 маркерных генов включал маркеры пролиферации (*Pcna*, *Mki67*), циклины D, важные для регуляции клеточного цикла клеток гранулезы (*Ccnd1*, *Ccnd2*), маркеры ранней гранулезы (*Ihh*, *Igfbp4*) и клеток кумулюса (*Has2*, *Ptgs2*), маркер лютеинизации (*Star*), основные ферменты сетроидогенеза (*Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Cyp19a1*) и рецепторы гонадотропных гормонов (*Fshr*, *Lhr*). Динамика относительной экспрессии этих генов в яичнике после стимуляции ГСЖК представлена на рис. 2а.

Большинство ключевых функциональных маркеров, таких как *Cyp17a1*, *Lhr*, *Cyp19a1* и *Fshr*, достигают максимальной экспрессии к 48–60 ч после стимуляции. К 60 ч после инъекции экспрессия *Has2* и *Igpbp4* достоверно снижается, а экспрессия *Star* и *Cyp11a1* резко возрастает, что свидетельствует о постовуляторном статусе яичника и начала лютеинизации фолликулярных клеток. Кроме того, анализ методом вестерн блот уровней экспрессии белков рецептора к ФСГ и ароматазы, имеющих решающее значение для гонадотропной чувствительности и синтеза эстрадиола в фолликуле, подтвердил, что максимальный уровень их экспрессии достигается к 48 ч после инъекции ГСЖК (рис. 2в). В совокупности полученные данные позволяют сделать вывод о том, что 48 ч после стимуляции ГСЖК являются оптимальным временем для получения клеток гранулезы в наиболее активном функционально активном состоянии.

Данные, полученные в эксперименте, были проанализированы для выявления наличия корреляции экспрессии выбранных маркерных генов в яичнике (рис. 2б). Выявлено, что эти гены можно объединить в четыре кластера: (I) *Has2* и *Ptgs2* – маркеры клеток кумулюса; (II) *Igfbp4*, *Ihh*, *Ccnd2*, *Cyp19a1*, *Fshr*, *Cyp17a1*, *Lhr* – маркеры клеток гранулезы, характерные для фазы фолликулярного роста; (III) *Cyp11a1* и *Star* – маркеры стероидогенной активности и лютеинизации; (IV) *Mki67*, *Pcna* и *Ccnd1* – маркеры, ассоциированные с пролиферативной активностью. Такой набор генов мы использовали в дальнейшем для анализа экспериментального влияния на функциональное состояние клеток гранулезы в условиях первичной культуры *in vitro*.

Подобранный набор функциональных маркеров позволил оптимизировать условия культивирования клеток гранулезы *in vitro.*

Исходя из вышеописанных результатов была выделена первичная культура клеток гранулезы через 48 ч после стимуляции ГСЖК. Анализ чистоты полученной культуры проводили с помощью исследования экспрессии мРНК маркеров клеток гранулезы и теки методом ПЦР в реальном времени (рис. 3з). Клетки, полученные в результате этого протокола, имеют выраженную экспрессию мРНК маркеров клеток гранулезы: Runx2, Nr5a2, Fshr и Cyp19a1. В то же время клетки первичной культуры не экспрессируют мРНК маркеров клеток теки: Mgp и Adamdec1, а Cyp17a1 – на очень низком уровне. Экспрессия рецептора к ФСГ и ароматазы на уровне белка была подтверждена иммуноцитохимическим окрашиванием при помощи специфических антител (рис. 3а и 3б).

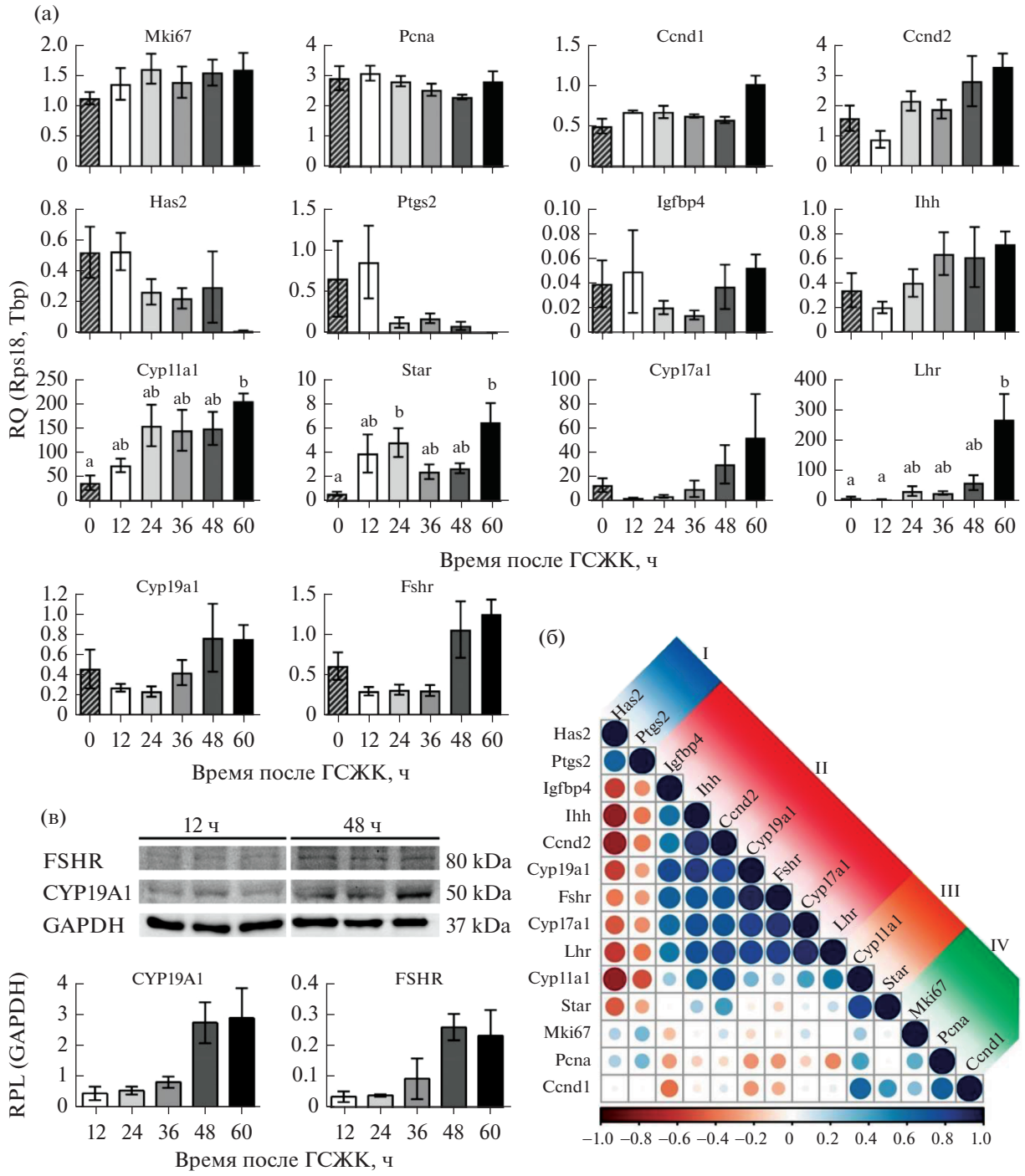

Рис. 2. Экспрессия маркеров функционального состояния яичников после стимуляции ГСЖК. (а) Экспрессия мРНК маркерных генов функционального состояния яичников. M ± SEM, разные буквы обозначают статистическую значимость между группами при $p < 0.05$ по критерию Краскела–Уоллиса с множественными сравнениями Данна. (б) Корреляционная матрица экспрессии мРНК, основанная на непараметрическом методе ранговой корреляции Спирмена. Положительные корреляции отмечены синим цветом, а отрицательные – красным, размер точки отражает статистическую значимость корреляции. (в) Вестерн-блот анализ уровней экспрессии белков FSHR и CYP19A1. Относительный уровень экспрессии белка (RPL) рассчитывали относительно GAPDH (M ± SEM).

Выбранный набор маркерных генов функционального состояния яичников использовали для оценки влияния андростендиона на функциональное состояние клеток гранулезы в первичной культуре. Полученные результаты (рис. 3к) показывают, что экспрессия мРНК Cyp19a1, Fshr и Lhr увеличивается, в то время как Has2, Ptgs2 и Igfbp4 снижается в клетках гранулезы в ответ на

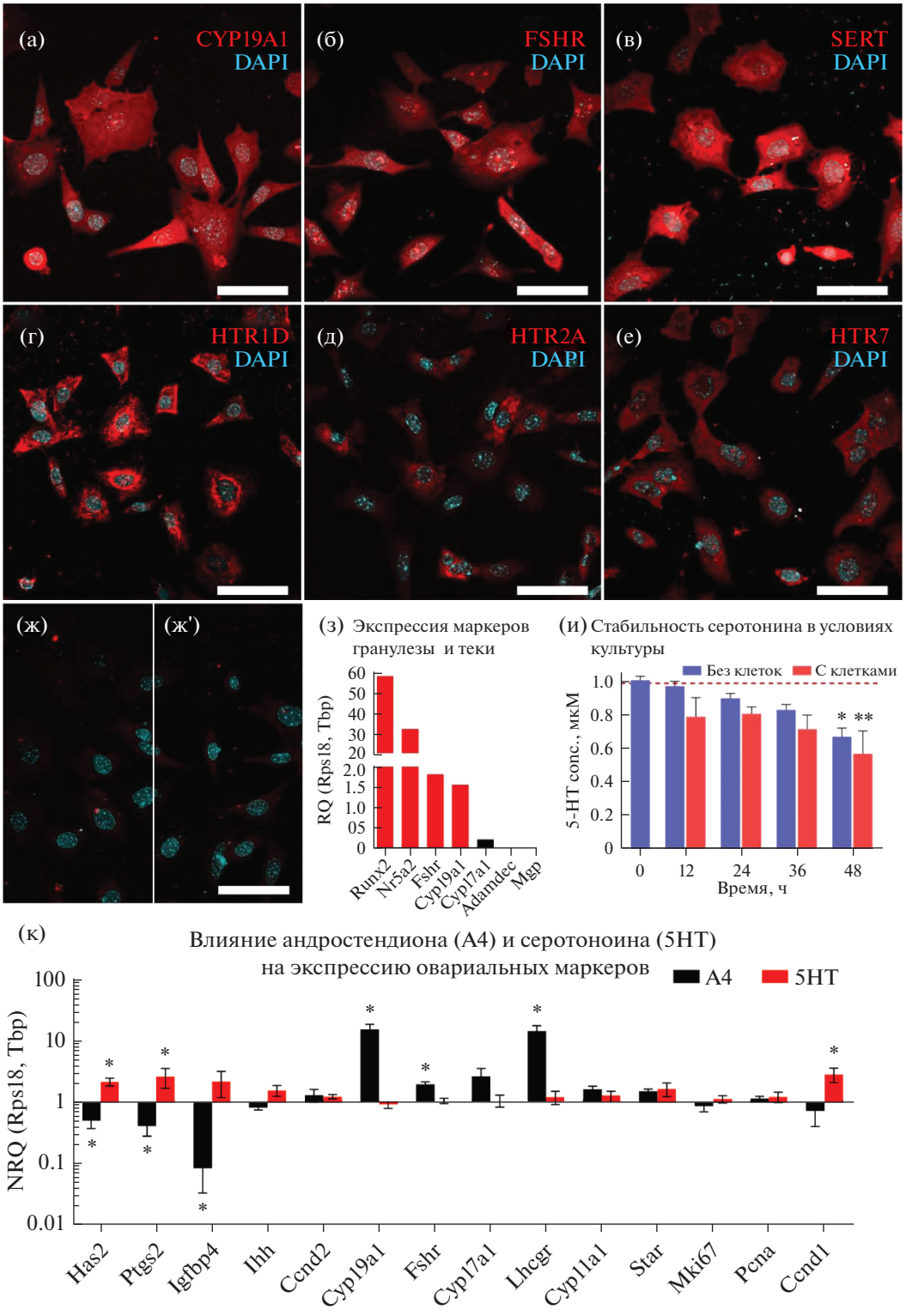

Рис. 3. Анализ полученной первичной культуры клеток гранулезы. (а–ж) Иммуноцитохимическое маркирование клеток гранулезы специфическими антителами к маркерам клеток гранулезы CYP19A1 (а) и FSHR (б); и против ключевых компонентов серотонинергической системы SERT (в), HTR1D (г), HTR2A (д) и HTR7 (е); отрицательный контроль с добавлением вторичных антител против IgG кролика (ж) и козы (ж'). Ядра окрашивали DAPI. Масштабная линейка: 50 мкм. (з) Экспрессия маркеров мРНК клеток теки и гранулезы. (и) Временная динамика изменения содержания серотонина в культуральной среде, измеренная с помощью метода ВЭЖХ. M ± SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по критерию Краскела–Уоллиса с множественными сравнениями Данна. (к) Влияние добавления 100 нМ андростендиона и 1 мкМ серотонина на экспрессию маркерных генов яичников в первичной культуре клеток гранулезы. M ± SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по критерию знаковых рангов Уилкоксона.

добавление в среду 100 нМ андростендиона. Таким образом, андростендион ингибирует экспрессию маркеров кумулюса и ранних, незрелых клеток гранулезы, и при этом стимулирует экспрессию генов стероидогенеза, характерных для зрелого состояния клеток гранулезы.

Клетки гранулезы экспрессируют компоненты серотонинергической системы в условиях культивирования in vitro

Полученную культуру клеток гранулезы также исследовали на предмет экспрессии важнейших компонентов серотонинергической системы, которые могут опосредовать действие серотонина на их функциональное состояние. Мы провели иммуноцитохимическое окрашивание рецепторов серотонина HTR1D, HTR2A и HTR7, а также мембранного транспортера SERT. Иммуномаркирование подтверждает экспрессию этих белков в клетках гранулезы (рис. 3в–3е). Эти мембранные белки, как и FSHR, в значительной степени выявляются в цитоплазме, что может свидетельствовать об их активной рециркуляции или инактивированном состоянии в клетках гранулезы.

Важным методическим моментом является стабильность серотонина в среде в условиях культивирования с исследуемыми клетками. Мы изучили динамику изменения содержания серотонина в культуральной среде при его добавлении в концентрации 1 мкМ к первичной культуре клеток гранулезы (рис. 3и). Полученные результаты свидетельствуют о том, что концентрация серотонина снижается довольно медленно, достигая примерно 0.8 мкМ через 24 ч и 0.65 мкМ через 48 ч культивирования. Исходя из полученных данных, в последующих экспериментах проводили смену питательной среды с серотонином один раз в сутки.

Серотонин влияет на экспрессию функциональных маркеров в клетках гранулезы in vitro

Мы изучили влияние серотонина на функциональное состояние клеток гранулезы на разработанной модели первичной культуры клеток гранулезы с использованием набора маркерных генов функционального состояния яичников. Экспрессию функциональных маркеров изучали методом ПЦР в реальном времени после культивирования клеток гранулезы с 1 мкМ серотонина или в его отсутствии в течение 48 ч. Мы показали, что среди 14 исследованных маркеров только три гена достоверно изменяют уровень экспрессии мРНК в ответ на серотонин: маркеры клеток кумулюса *Has2* и *Ptrgs2*, а также регулятор клеточного цикла циклин D (*Ccnd1*) (рис. 3к). Таким образом, серотонин влияет на дифференцировку клеток гранулезы в состояние клеток кумулюса, что может играть роль в процессе роста и созревания фолликулов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полноценные исследования функции яичника в норме и патологии невозможны без использования первичной культуры клеток гранулезы. Для изучения слабых модулирующих и количественных эффектов особенно важно получить первичную культуру клеток в наиболее функционально активном состоянии. В случае клеток гранулезы важно учитывать не только то, насколько в них активен стероидогенез, но и пролиферация, а также какова степень ее зрелости. Проведенный детальный морфофункциональный анализ позволяет сделать вывод о том, что оптимальным временем для получения большого количества функционально активных клеток гранулезы является 48 ч после стимуляции роста фолликулов с помощью ГСЖК. Именно в это время наблюдается как максимальный размер фолликулов, так и экспрессия ключевых ферментов стероидогенеза и рецепторов гонадотропных гормонов, при этом экспрессия маркеров лютеинизации остается на низком уровне. На других, более ранних сроках после инъекции профили экспрессии маркерных генов демонстрируют более низкий уровень функциональной активности.

В группе без инъекции ГСЖК экспрессия большинства маркерных генов имеет большой разброс, что отражает неоднородность этой группы, а следовательно, и отсутствие синхронизации. Интересно, что наибольший разброс как в морфометрическом, так и в молекулярно-генетическом анализе наблюдается через 12 ч после инъекции ГСЖК. Причиной этого является недостаточное время для синхронизации яичников, изначально неоднородных по функциональному состоянию. Действительно, 46–48 ч после стимуляции ГСЖК – наиболее распространенный период в протоколах получения клеток гранулезы мыши (Qian et al., 2022). В этой работе мы показали, что такой временной интервал оправдан, на основании морфометрических параметров роста фолликулов, динамики экспрессии маркерных генов яичников и более высокого уровня экспрессии ароматазы и рецептора к ФСГ в ткани яичника.

Для проведения морфометрического анализа с использованием флуоресцентной микроскопии применяли протокол окрашивания криосрезов яичников красителем FITC-LCA. Этот конъюгированный лектин окрашивает ткань яичника таким образом, что на полученных изображениях легко обнаружить все фолликулы и четко различить границу между клетками гранулезы и теки (рис. 1а). Хотя лектины уже давно используются для флуоресцентного окрашивания тканей и отдельных типов клеток (KleinJan et al., 2014), в этой работе LCA впервые используется для анализа морфологии яичника мыши. Описанный метод

имеет большие преимущества, в частности благодаря скорости и простоте протокола.

Концентрация серотонина, добавляемого к клеткам (1 мкМ), была выбрана в соответствии с его содержанием в фолликулярной жидкости на поздних стадиях созревания фолликула (Bódis et al., 2020). Важным методологическим моментом является вопрос об устойчивости серотонина в среде в условиях эксперимента. Прямые измерения серотонина методом ВЭЖХ показали, что в культуральной среде он медленно окислялся, а его концентрация снижалась примерно на 10% каждые 12 ч (рис. 3и). В то же время в присутствии клеток гранулезы его содержание снижается более резко – на 20% уже через 2 ч, при этом в дальнейшем снижение замедляется. Причина такой динамики заключается в том, что клетки гранулезы способны захватывать серотонин из окружающей среды и активно метаболизировать его (Alyoshina et al., 2022). В обоих случаях серотонин достаточно стабилен при 37°C в течение большого количества часов, а статистически значимое снижение концентрации (более чем на четверть) происходит только к 48 ч культивирования.

Набор из 14 маркерных генов яичников оказался удобным инструментом для экспериментального изучения состояния ткани яичника и клеток гранулезы. Этот молекулярно-генетический подход оказался не только проще в исполнении, но и информативнее традиционного морфометрического анализа. Проведенный кластерный анализ разбил используемые маркерные гены на четыре группы, которые соответствуют кластерам преантральных/кумулюсных, антральных/муральных, лютеинизированных и пролиферирующих клеток гранулезы, выявленным в результате анализа транскриптомов единичных клеток яичника (Morris et al., 2022). Такая кластеризация маркерных генов может помочь использовать меньшее количество генов на первом этапе крупных скрининговых исследований. С помощью этого набора мы показали, что андростендион не только положительно влияет на маркеры функциональной активности клеток гранулезы в культуре, что подтверждает ранее полученные данные (Hamel et al., 2005), но и ингибирует их дифференцировку в клетки кумулюса. Механизм такого эффекта андростендиона объясняется использованием этого гормона клетками гранулезы в качестве субстрата для синтеза эстрадиола, к которому эти клетки чувствительны благодаря экспрессии рецепторов к эстрогенам (Liu et al., 2017).

Серотонин является нейромедиатором и гормоном, для которого известно участие в регуляции работы женской репродуктивной системы (Dubé et al., 2007; Nikishin et al., 2021). Используя разработанную модель первичной культуры клеток гранулезы в сочетании с анализом экспрессии разработанном наборе маркерных генов, мы показали, что серотонин влияет на экспрессию генов, характеризующих дифференцировку клеток гранулезы в состояние клеток кумулюса. Среди них было обнаружено статистически значимое увеличение экспрессии мРНК гиалуронансинтазы 2 (Has2), которая кодирует ключевой белок, ответственный за синтез гиалуроновой кислоты (гиалуронана), основного компонента внеклеточного матрикса ооцит-кумулюсного комплекса (Chen et al., 1993). Простагландинсинтаза 2 (Ptgs2), также известная как циклооксигеназа 2 (Cox2), является одним из факторов, ответственных за чувствительность клеток кумулюса к гормональным сигналам, а также этот белок необходим для нормальной овуляции и дальнейшего раннего развития эмбриона (Lim et al., 1997). Кроме того, в ответ на серотонин в клетках гранулезы повышается уровень экспрессии регулятора клеточного цикла циклина D1. Было показано, что циклин D1 экспрессируется на более высоком уровне в клетках кумулюса, чем в пристеночных, муральных клетках гранулезы (Wigglesworth et al., 2015), и даже может служить количественным показателем при оценке компетентных для дальнейшего развития ооцит-кумулюсных комплексов (Xiong et al., 2019).

Наблюдаемые эффекты могут быть опосредованы работой компонентов серотонинергической системы, экспрессия которых показана для клеток гранулезы – рецепторов HTR1D, HTR2A и HTR7 или транспортером SERT. Антагонистические эффекты серотонина и андростендиона могут быть вызваны пересечением молекулярных сигнальных путей (Xiang et al., 2022), или могут быть связаны с взаимодействиями на уровне мембранных рецепторов или внутриклеточной передачи в сигнальных путях (Tang et al., 2019; Bockaert et al., 2021).

Полученные данные согласуются с представлением об эволюционно консервативной роли серотонина как фактора созревания ооцитов. Можно предположить, что серотонин, который способен накапливаться в созревающих ооцитах (Nikishin et al., 2019), является поддерживающим агентом, необходимым для функционирования клеток кумулюса. Обобщая, можно заключить, что серотонин и андростендион оказывают антагонистическое действие на функциональное состояние клеток гранулезы мыши в первичной культуре *in vitro*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Часть работы, в которой производился подбор оптимальных условий получения первичной культуры клеток гранулезы, поддержана Государственным зада-

нием № 0088-2021-0009 для Д.А. Никишина, Н.М. Алёшиной, Л.А. Мальченко и Ю.О. Никишиной. Исследование роли серотонина было поддержано грантом РНФ № 22-74-10009 для Д.А. Никишина, Н.М. Алёшиной, Ю.О. Никишиной, В.В. Кондукторовой, и А.Ю. Евстифеевой.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования все манипуляции, проводившиеся с экспериментальными животными, методы обезболивания, эвтаназии и ухода за животными до и после экспериментальных вмешательств соответствовали международным нормам по биоэтике.

КОФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Д.А. Никишин и Ю.О. Никишина придумали и разработали эксперименты. Н.М. Алешина, Л.А. Мальченко, В.Р. Русанова, Ю.О. Никишина и В.В. Кондукторова поставили эксперименты и провели анализ. А.Ю. Евстифеева провела кластерный анализ. Н.М. Алешина написала черновую версию статьи, Д.А. Никишин редактировал статью и готовил к публикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Alam M.H., Miyano T. Interaction between growing oocytes and granulosa cells *in vitro* // Reprod. Med. Biol. 2020. V. 19. № 1. P. 13–23.

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. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 23.

Amireault P., Dubé F. Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos. // Biol. Reprod. 2005. V. 73. № 2. P. 358–365.

Bao B., Garverick H.A., Smith G.W. et al. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. // Biol. Reprod. 1997. V. 56. № 5. P. 1158–1168.

Bockaert J., Bécamel C., Chaumont-Dubel S. et al. Novel and atypical pathways for serotonin signaling // Fac. Rev. 2021. V. 10.

Bódis J., Sulyok E., Kőszegi T. et al. Serum and follicular fluid levels of serotonin, kisspeptin, and brain-derived neurotrophic factor in patients undergoing *in vitro* fertilization: an observational study // J. International Medical Research. 2020. V. 48. № 4. P. 030006051987933.

Buznikov G.A. Preneural transmitters as regulators of embryogenesis. Current state of problem // Russ. J. Dev. Biol. 2007. V. 38. № 4. P. 213–220.

Chen L., Russell C.T., Larsen W.J. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: Roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass // Mol. Reprod. Dev. 1993. V. 34. № 1. P. 87–93.

Corredor A., Flickinger G.L. Hormonal regulation of progesterone secretion by cultured mouse granulosa cells // Biol. Reprod. 1983. V. 29. № 5. P. 1142–1146.

Dubé F., Amireault C. Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos // Life Sci. 2007. V. 81. № 25–26. P. 1627–1637.

Fang L., Chang H.-M., Cheng J.-C. et al. Growth differentiation factor-8 decreases StAR expression through ALK5-mediated Smad3 and ERK1/2 signaling pathways in luteinized human granulosa cells // Endocrinology. 2015. P. en20151461.

Galas J.F. Primary culture of ovarian cells for research on cell interactions in the hormonal control of steroidogenesis // Methods Mol. Biol. 2012. V. 806. P. 227–249.

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. V. 85. № 3. P. 1277–1286.

Grzesiak M., Knapczyk-Stwora K., Duda M. et al. Elevated level of 17β-estradiol is associated with overexpression of FSHR, CYP19A1, and CTNNB1 genes in porcine ovarian follicles after prenatal and neonatal flutamide exposure // Theriogenology. 2012. V. 78. № 9. P. 2050–2060.

Hamel M., Vanselow J., Nicola E.S. et al. Androstenedione increases cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid transcripts in nonluteinizing bovine granulosa cells // Mol. Reprod. Dev. 2005. V. 70. № 2. P. 175–183.

Han Y., Xia G., Tsang B.K. Regulation of cyclin D2 expression and degradation by follicle-stimulating hormone during rat granulosa cell proliferation *in vitro* // Biol. Reprod. 2013. V. 88. № 3. P. 57.

Kim A.R., Nodel M.R., Pavlenko T.A. et al. Tear fluid catecholamines as biomarkers of the Parkinson's disease: A clinical and experimental study // Acta Naturae. 2019. V. 11. № 4. P. 99–103.

KleinJan G., Buckle T., van Willigen D. et al. Fluorescent lectins for local *in vivo* visualization of peripheral nerves // Molecules. 2014. V. 19. № 7. P. 9876–9892.

Koppan 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. V. 24. № 2. P. 155–159.

Lee L., Asada H., Kizuka F. et al. Changes in histone modification and DNA methylation of the StAR and Cyp19a1 promoter regions in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in rats // Endocrinology. 2013. V. 154. № 1. P. 458–470.

Lim H., Paria B.C., Das S.K. et al. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice // Cell. 1997. V. 91. № 2. P. 197–208.

Liu W., Xin Q., Wang X. et al. Estrogen receptors in granulosa cells govern meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes in mammals // Cell Death Dis. 2017. V. 8. № 3. P. e2662.

Morris M.E., Meinsohn M.-C., Chauvin M. et al. A single-cell atlas of the cycling murine ovary // Elife. 2022. V. 11.

Nikishin D.A., Khramova Y.V., Bagayeva T.S. et al. Expression of components of the serotonergic system in follic-

ulogenesis and preimplantation development in mice // Russ. J. Dev. Biol. 2018a. V. 49. № 3. P. 184–192.

Nikishin D.A., Filatov M.A., Kiseleva M.V. et al. Selection of stable expressed reference genes in native and vitrified/thawed human ovarian tissue for analysis by qRT-PCR and Western blot // J. Assist Reprod. Genet. 2018b. V. 35. № 10. P. 1851–1860.

Nikishin D.A., Alyoshina N.M., Semenova M.L. et al. Analysis of expression and functional activity of aromatic L-amino acid decarboxylase (DDC) and serotonin transporter (SERT) as potential sources of serotonin in mouse ovary // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 12. P. 3070.

Nikishin D.A., Khramova Y.V., Alyoshina N.M. et al. Oocyte-mediated effect of serotonin on the functional status of granulosa cells // Russ. J. Dev. Biol. 2021. V. 52. № 2. P. 97–104.

Niswender G.D. Molecular control of luteal secretion of progesterone // Reproduction. 2002. V. 123. № 3. P. 333–339.

Qian J., Zhu R., Yan R. et al. Isolation of mouse ovarian follicles for single-cell RNA-seq and *in vitro* culture // STAR Protoc. 2022. V. 3. № 3. P. 101537.

Qin X., Li J., Wang S. et al. Serotonin/HTR1E signaling blocks chronic stress-promoted progression of ovarian cancer // Theranostics. 2021. V. 11. № 14. P. 6950–6965.

Rapoport R., Sklan D., Wolfenson D. et al. Antioxidant capacity is correlated with steroidogenic status of the corpus luteum during the bovine estrous cycle // Biochim. Biophys Acta. 1998. V. 1380. № 1. P. 133–140.

Sèdes L., Leclerc A., Moindjie H. et al. Anti-Müllerian hormone recruits BMPR-IA in immature granulosa cells // PLoS One. 2013. V. 8. № 11. P. 81551.

Sheng Y., Wang L., Liu X.S.J.S. et al. A serotonin receptor antagonist induces oocyte maturation in both frogs and mice: evidence that the same G protein ptor is responsible for maintaining meiosis arrest in both species // J. Cell. Physiol. 2005. V. 202. № 3. P. 777–786.

Szeliga A., Rudnicka E., Maciejewska-Jeske M. et al. Neuroendocrine determinants of polycystic ovary syndrome // International J. Environmental Research and Public Health. 2022. V. 19. № 5. P. 3089.

Tanaka E., Baba N., Toshida K. et al. Serotonin stimulates steroidogenesis in rat preovulatory follicles: involvement of 5-HT2 receptor // Life Sci. 1993. V. 53. № 7. P. 563–570.

Tang Z.R., Zhang R., Lian Z.X. et al. Estrogen-receptor expression and function in female reproductive disease // Cells. 2019. V. 8. № 10. P. 1123.

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. V. 125. № 3. P. 433–438.

Wigglesworth K., Lee K.B., Emori C. et al. Transcriptomic diversification of developing cumulus and mural granulosa cells in mouse ovarian follicles // Biol. Reprod. 2015. V. 92. № 1. P. 23–24.

Xiang G. et al. Control of Gαq signaling dynamics and GPCR cross-talk by GRKs // Sci. Adv. 2022. V. 8. № 47. P. 3363.

Xiong X.R., Lan D.L., Li J. et al. Identification of differential abundances of mRNA transcript in cumulus cells and CCND1 associated with yak oocyte developmental competence // Anim. Reprod. Sci. 2019. V. 208. P. 106135.

Zhen Y.-H., Wang L., Riaz H. et al. Knockdown of CEBPβ by RNAi in porcine granulosa cells resulted in S phase cell cycle arrest and decreased progesterone and estradiol synthesis // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 2014. V. 143. P. 90–98.

Analysis of the Ovarian Marker Genes Expression Revealed the Antagonistic Effects of Serotonin and Androstenedione on the Functional State of Mouse Granulosa Cells in Primary Culture

N. M. Alyoshina[1], V. R. Rousanova[2], L. A. Malchenko[1], Yu. V. Khramova[2], Yu. O. Nikishina[1], V. V. Konduktorova[2], A. Y. Evstifeeva[2], and D. A. Nikishin[1, 2, *]

[1]*Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, Russia*

[2]*Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty, Moscow, Russia*

**e-mail: d.nikishin@idbras.ru*

Primary culture of granulosa cells is a prerequisite for a complete study of the normal functioning of the ovary and its pathologies. In this work, we selected the optimal protocol for obtaining a primary culture of mouse granulosa cells in the most functionally active state and revealed the effects of androstenedione and serotonin on the expression of ovarian markers that reflect the functional status of granulosa cells. The morpho-functional analysis of the ovary after PMSG stimulation revealed that 48 hours after PMSG stimulation is the optimal time for obtaining granulosa cells in the most active functional state. Using the set of 14 ovarian functional state marker genes we reveal that androstenedione inhibits cumulus and immature granulosa markers but stimulates genes characteristic of the mature state of granulosa. At the same time, granulosa cells express serotonergic receptors and transporter SERT. The ovarian marker genes expression analysis revealed that serotonin affects the expression of genes characterizing the differentiation of granulosa cells towards cumulus cells. Summarizing, we can conclude that serotonin and androstenedione have an antagonistic effect on the functional state of mouse granulosa cells in primary culture *in vitro*.

Keywords: granulosa, cumulus, primary culture, ovary, marker genes, PMSG, serotonin, androstenedione, LCA