

ФАКТОРЫ, МОДУЛИРУЮЩИЕ СТЕРИДОГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК В ПРЕОВУЛЯТОРНЫХ ФОЛЛИКУЛАХ ДОМАШНЕЙ КУРИЦЫ

Смекалова А.А., Митяшова О.С., Лебедева И.Ю.

ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, Подольск -Дубровицы Московской обл.

Возрастные нарушения в функционировании гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси связаны со снижением яйценоскости у домашних кур. Целью представленной работы было изучение способности гранулезного слоя (ГС) и текального слоя (ТС) из преовуляторных фолликулов F1 и F2 секретировать стероидные гормоны в зависимости от паракринного взаимодействия между разными типами клеток и наличия признаков репродуктивного старения у кур-несушек. В эксперименте были использованы 4 группы кур: 1) молодые птицы с длинными кладками яиц (МДК) и постаревшие птицы: 2) с длинными кладками (ПДК), 3) с ановуляторными циклами в длинных кладках (ПАК) и 4) с короткими кладками (ПКК). Слои теки и гранулезы выделяли из фолликулов через 7 ч после овуляции и инкубировали индивидуально или совместно в течение 18 ч. Концентрацию гормонов в культуральных средах определяли иммуноферментным методом. Способность ГС из фолликулов F1 секретировать прогестерон (P4) возрастала в 1,3 раза ($p < 0,05$) в процессе фолликулярного созревания от стадии F2 до стадии F1 у кур в группах ПАК и ПКК. В условиях сокультивирования ГС и ТС это возрастание сохранялось только в группе ПАК. При индивидуальной и совместной инкубации фолликулярных слоев разного типа продукция тестостерона (Т) текальными клетками была в 1,8-3,2 раза выше ($p < 0,001-0,05$) в фолликулах F2, чем в фолликулах F1 у птиц во всех группах, кроме ПАК. Совместное культивирование ГС и ТС у всех кур приводило к снижению продукции P4 в 2,0-3,8 раза ($p < 0,001$) и к повышению продукции Т в 2,4-4,6 раза ($p < 0,001-0,1$). Таким образом, преждевременное повышение секреции P4 и отсутствие своевременного снижения секреции Т клетками фолликулов F1 ассоциировано с высокой частотой ановуляций у постаревших кур, тогда как паракринная коммуникация между ГС и ТС влияет на стероидогенную активность преовуляторных фолликулов независимо от возраста и яйценоскости птиц.

Ключевые слова: куры-несушки, стероидогенез, преовуляторные фолликулы, клетки теки, клетки гранулезы, репродуктивное старение.

Проблемы биологии продуктивных животных. 2026. 3:59-70

Введение

Используемые обозначения: ГС – гранулезный слой; Е2 – эстрадиол-17 β ; МДК куры – молодые куры с длинными циклами кладки яиц; ПАК куры – постаревшие куры с частыми ановуляторными циклами в пределах длинной кладки; ПДК куры – постаревшие куры с длинными кладками яиц; ПКК куры – постаревшие куры с короткими циклами кладки яиц; P4 – прогестерон; Т – тестостерон; ТС – текальный слой.

Яйценоскость домашних кур (*Gallus gallus domesticus*) регулируется сочетанием условий окружающей среды, генотипа и эндокринных факторов (Du et al., 2020), причем гипоталамо-гипофизарно-гонадная ось выполняет ключевую роль в такой регуляции (Bédécarrats, 2015; Zhao et al., 2023). Возрастные нарушения в функционировании этой оси связаны со снижением яйценоскости, которое у кур наблюдается после 70-80 недель жизни

(Williams, Sharp, 1978; Ciccone et al., 2005, Lebedeva et al., 2010).

Овариальные стероидные гормоны, как компоненты гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, участвуют в регуляции разнообразных репродуктивных процессов, включая овуляцию и локальный контроль фолликулогенеза посредством аутокринного/паракринного механизма (Hrabia, 2022). Яичник несушки содержит гроздь фолликулов, находящихся на разных стадиях развития и обладающих различной стероидогенной активностью. Самые крупные пять-восемь желтых фолликулов (диаметром от 9 до 36 мм) организованы в характерную иерархию, обозначаемую Fn-F1, где F1 – самый зрелый фолликул. Фолликулы диаметром от 6 до 8 мм формируют когорту преиерархических фолликулов. Также в яичнике различают многочисленные белые фолликулы диаметром от 1 до 5 мм и примордиальные фолликулы, расположенные в стромах, диаметром менее 1 мм (Johnson, 2015). В преиерархических фолликулах клетки гранулезного слоя (ГС) не способны к стероидогенезу, а клетки текального слоя (ТС) служат основным источником эстрадиола-17 β (E2), и в меньшей степени — андрогенов (Hrabia, 2022). В иерархических (преовуляторных) фолликулах и гранулезный, и текальный слои являются стероидогенно активными. Клетки ГС продуцируют прогестерон (P4) под воздействием лютеинизирующего гормона (ЛГ), причем по мере роста фолликулов синтез P4 постепенно увеличивается. Самый крупный фолликул F1 становится основным источником P4 в кровотоке и индуцирует преовуляторное повышение ЛГ, стимулируя высвобождение гонадотропин-рилизинг-гормона. Клетки теки иерархических фолликулов являются главным источником тестостерона (Т). В процессе развития этих фолликулов синтез Т постепенно увеличивается вплоть до стадии F3, когда его секреция достигает максимума, а затем — уменьшается, при этом фолликул F1 теряет способность превращать P4 в Т за 12 ч до овуляции (Rangel, Gutierrez, 2014). Хотя секреция E2 текой постепенно снижается по мере созревания фолликула до стадии F1, преовуляторные фолликулы также представляют важный источник этого гормона, как строма и преиерархические фолликулы (Proszkowiec-Weglarz et al., 2005).

Половые стероидные гормоны выполняют разную роль в регуляции фолликулогенеза и овуляции у домашней птицы. Основная функция P4 заключается в стимуляции преовуляторного повышения уровня ЛГ путем индукции освобождения гонадотропин-рилизинг-гормона (Hrabia, 2022). Локализация рецепторов P4 в специфических овариальных тканях, таких как зародышевый эпителий, также указывает на непосредственное участие этого гормона в процессах, связанных с фолликулярным созреванием и овуляцией. Прайминг эстрадиолом необходим для адекватного ответа гипоталамуса на преовуляторный пик P4 и формирования своевременного всплеска ЛГ (Etches, 1990). Тестостерон играет в этом процессе не менее важную роль, поскольку иммунизация против Т или применение его специфического антагониста блокирует овуляцию у кур, подавляя преовуляторное возрастание уровней P4 и ЛГ (Rangel et al., 2006). Кроме того, Т повышает экспрессию мРНК ферментов, связанных со стероидогенезом (StAR, P450_{scc}), и рецепторов ЛГ в клетках ГС кур при культивировании *in vitro* (Rangel et al., 2009), а также стимулирует выработку P4 гранулезными клетками в преовуляторных фолликулах даже в отсутствие ЛГ (Rangel et al., 2006; Caicedo Rivas et al., 2016). Показано, что предварительная обработка клеток гранулезы эстрадиолом не изменяет продукцию P4, но усиливает стимулирующее действие ЛГ на эту продукцию. Вместе с тем E2 способен оказывать стимулирующее влияние на секрецию P4 и Т текальными клетками (Caicedo Rivas et al., 2016). К тому же эстрогены могут подавлять атрезию фолликулов у кур, связываясь со своими рецепторами в клетках гранулезы и запуская сигнальный каскад RAS/RAF/ERK, который блокирует апоптоз и стимулирует пролиферацию (Ru et al., 2024). Образование предшественников желтка в печени и секреция белка в яйцевоме также в значительной степени контролируются эстрогенами (Hrabia, 2022).

Установлено, что дисрегуляция преовуляторного пика репродуктивных гормонов (ЛГ и половых стероидных гормонов), индуцирующего овуляцию фолликула, приводит к снижению

интенсивности яйцекладки у индеек (Brady et al., 2020). При этом в преовуляторных фолликулах птиц с высокой и низкой яйценоскостью обнаружены различия в экспрессии генов, связанных со стероидогенезом, которые наблюдаются не только, во время преовуляторной волны, но и при базальных условиях. Также показано, что у высокопродуктивных кур-несушек концентрация E2 в крови выше, чем у низкопродуктивных, причем наибольший уровень этого гормона достигается в конце периода максимальной яйценоскости, снижаясь к исходу первого продуктивного периода (Mehlhorn et al., 2022). Таким образом, исследование возрастных изменений стероидогенной активности овариальных фолликулов необходимо для понимания роли половых стероидных гормонов в снижении яйценоскости у домашних кур и разработки новых подходов к торможению этого процесса.

В связи с вышеизложенным целью представленной работы было изучение способности клеток гранулезы и теки из преовуляторных фолликулов секретировать стероидные гормоны в зависимости от паракринного взаимодействия между разными типами фолликулярных слоев и наличия признаков репродуктивного старения у кур-несушек.

Материал и методы

В эксперименте были использованы 4 группы кур-несушек породы Хайсекс Уайт, различающиеся по возрасту и характеру яйцекладки:

1) молодые куры в возрасте 30-35 недель с длинными (>8) кладками яиц (МДК, n=9) и постаревшие птицы в возрасте 68-81 недель:

2) с длинными кладками яиц (ПДК, n=11),

3) с частыми ановуляторными циклами в пределах длинной кладки (ПАК, n=10), определяемыми по отсутствию яиц при сохранении 24-часового межовуляторного интервала (Lebedeva et al., 2010),

4) с короткими (3-6 яиц на цикл) кладками яиц (ПКК, n=11),

Кур содержали в индивидуальных клетках при 12- часовом световом режиме. Время яйцекладки фиксировали с помощью видеонаблюдения. Фолликулы выделяли через 7 часов после овуляции для синхронизации стероидогенной активности фолликулов у разных особей. Время овуляции определяли, исходя из установленного факта, что овуляция у кур происходит через 30 минут после откладывания яйца (Scanes, 2022). Все эксперименты проводились в строгом соответствии с принципами ветеринарной медицинской этики, положениями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123, Страсбург, 1986), а также требованиями надлежащей лабораторной практики, регламентированными ГОСТ 33215–2014.

В исследовании использовали два самых крупных преовуляторных фолликула, обозначаемые согласно общепринятой классификации — F1 и F2 (Johnson, 2015). Слои теки и гранулезы кур выделяли в соответствии с методом A.B. Gilbert и соавт. (Gilbert et al., 1977) и отмывали от желтка стерильным фосфатно-солевым раствором Дюльбекко, содержащим 50 мкг/мл гентамицина. Из ГС удаляли часть, примыкающую к зародышевому диску, с целью получения слоя клеток с одинаковой цитодифференцировкой (Wojtysiak et al., 2011). Оба слоя разрезали на 4 части, после чего ГС и ТС культивировали в стеклянных флаконах индивидуально или совместно друг с другом (при отсутствии межклеточных контактов). Для совместного культивирования использовали только слои, полученные из одного и того же фолликула. Инкубацию проводили в 1 мл среды в течение 18 ч при 39° С в атмосфере с 5% CO₂ и 90%-ной влажностью. Для культивирования применяли среду DMEM, содержащую 1 г/л глюкозы и 25 мМ HEPES (ООО «Панэко», Россия), с добавлением 1 мМ глутамин («Sigma-Aldrich», США) и 10 мл/л раствора антибиотика-антимикотика («Sigma-Aldrich»). При индивидуальном культивировании ТС среда дополнительно содержала 5 нг/мл P4, который служил в качестве субстрата для синтеза Т в отсутствие ГС. В каждом независимом эксперименте были

использованы фолликулярные слои, полученные от одной курицы.

После культивирования эксплантаты фолликулярных слоев слегка подсушивали с помощью фильтровальной бумаги и взвешивали. Среды центрифугировали при 400 g в течение 10 мин, замораживали и хранили при -70°C . Вследствие разной стероидогенной активности фолликулярных слоев (Hrabia, 2022) в культуральных средах определяли содержание следующих гормонов: P4 (ГС); Т и Е2 (ТС); P4, Т и Е2 (ГС+ТС). Концентрацию половых стероидных гормонов в среде измеряли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью планшетного спектрофотометра Униплан («Пикон», Россия). При проведении ИФА использовали коммерческие наборы реагентов ООО «Хема», Россия. Чувствительность метода составляла: 0,25 нмоль/л для прогестерона, 0,025 нмоль/л для эстрадиол-17 β и 0,15 нмоль/л для тестостерона. Все образцы анализировали в двух повторностях, коэффициент вариации не превышал 17 %.

Полученные результаты обрабатывали методом однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями при помощи программы SigmaStat 4.0 (Systat Software, Inc.). Фактором повторных измерений служила категория фолликулов (F1 или F2). Все данные выражали как средние значения $\pm$ стандартные ошибки. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с использованием критерия Тьюки.

Результаты и обсуждение

При индивидуальном культивировании ГС из преовуляторных фолликулов F2 продукция прогестерона (P4) была одинаковой у птиц разного возраста и репродуктивного статуса (рис. 1А). В то же время стероидогенная активность клеток гранулы из фолликулов F1 была в 1,6 раза выше ($p<0,05$) у кур с признаками репродуктивного старения (ПАК и ПКК), чем у молодых птиц. Причем у кур в группах ПАК и ПКК секреция P4 возрастала в 1,3 раза ($p<0,05$) в процессе созревания фолликулов от стадии F2 до стадии F1, тогда как у молодых и постаревших особей с высокой яйценоскостью эта секреция не изменялась.

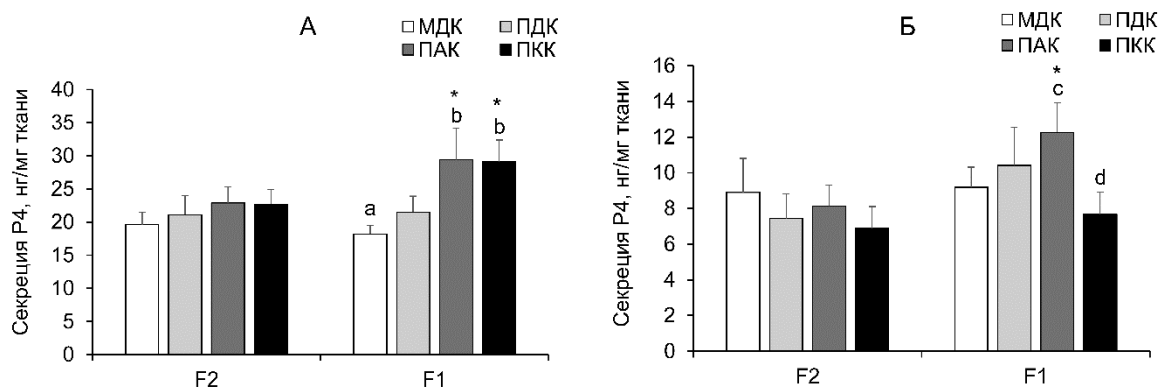


Рис. 1. Секреция прогестерона (P4) при культивировании слоя гранулы индивидуально (А) или совместно со слоем теки (Б) из преовуляторных фолликулов F1 и F2 у кур разного возраста и репродуктивного статуса. Различия между группами: ^{a,b} $p<0,05$; ^{c,d} $p<0,05$. Различия между фолликулами F1 и F2: * $p<0,05$.

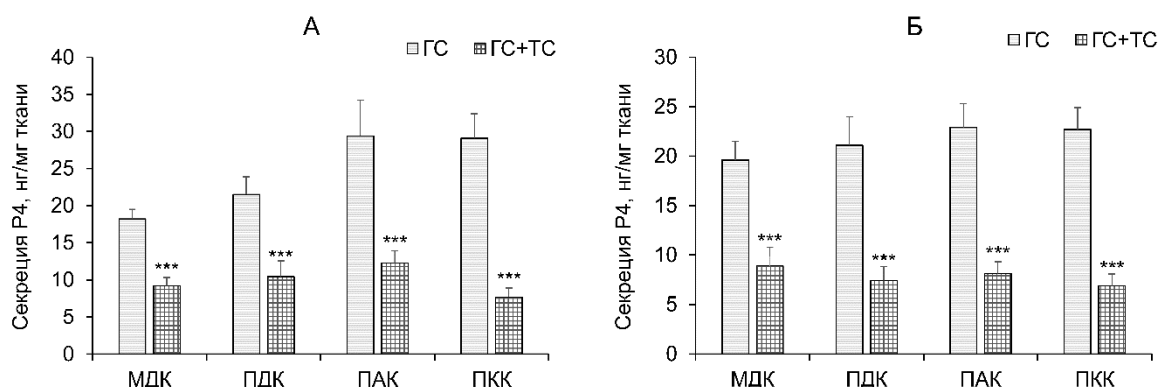


Рис. 2. Секреция прогестерона (P4) при культивировании слоя гранулезы индивидуально (ГС) или совместно со слоем теки (ГС+ТС) из преовуляторных фолликулов F1 (А) и F2 (Б) у кур разного возраста и репродуктивного статуса. Различия между системами культивирования: *** $p < 0,001$.

При совместном культивировании слоев гранулезы и теки из фолликулов F2 продукция P4 также не зависела от возраста и яйценоскости птиц (рис. 1Б). В условиях сокультивирования ГС и ТС из фолликулов F1 у кур в группе ПАК сохранялось возрастание этой продукции (в 1,5 раза, $p < 0,05$) по сравнению с соответствующими фолликулами F2 у тех же особей. Напротив, такое возрастание не было обнаружено у ПКК кур. Как следствие, секреция P4 клетками фолликулов F1 была в 1,6 раза выше ($p < 0,05$) у птиц в группе ПАК, чем в группе ПКК.

Анализ данных также показал, что внесение ТС в систему культивирования соответствующего ГС приводит к снижению секреции P4 в 2,0-3,8 раза ($p < 0,001$) независимо от степени зрелости фолликулов, возраста и репродуктивного статуса кур (рис. 2А и Б).

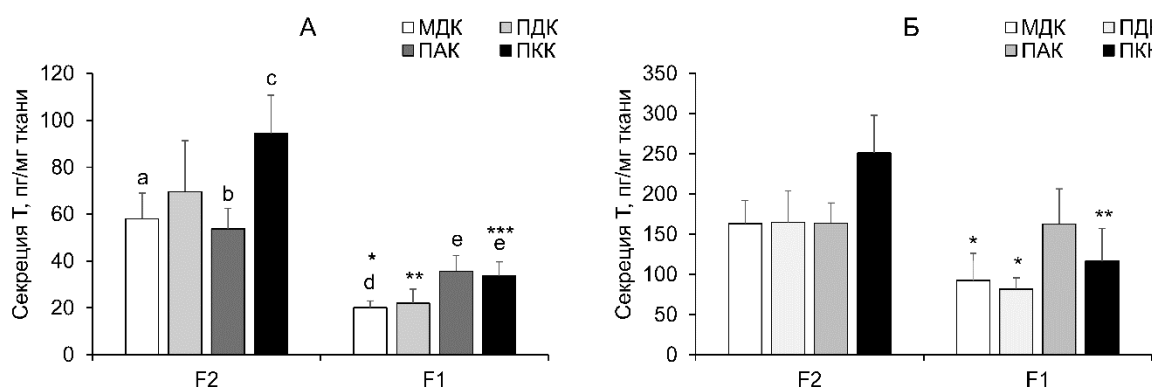


Рис. 3. Секреция тестостерона (Т) при культивировании слоя теки индивидуально (А) или совместно со слоем гранулезы (Б) из преовуляторных фолликулов F1 и F2 у кур разного возраста и репродуктивного статуса. Различия между группами: ^{a,c} $p < 0,1$; ^{b,c} $p < 0,05$; ^{d,e} $p < 0,1$. Различия между фолликулами F1 и F2: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

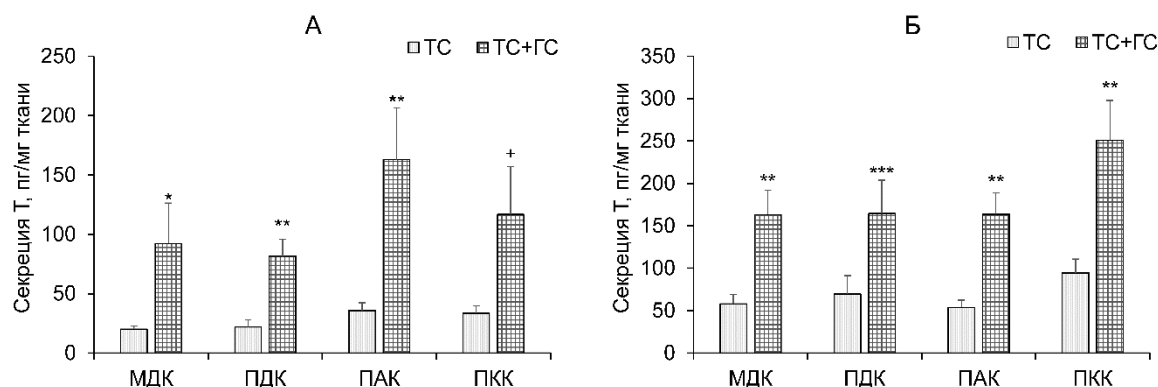


Рис. 4. Секреция тестостерона (Т) при культивировании слоя теки индивидуально (ТС) или совместно со слоем гранулезы (ТС+ГС) из преовуляторных фолликулов F1 (А) и F2 (Б) у кур разного возраста и репродуктивного статуса. Различия между системами культивирования: ⁺ $p < 0,1$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Во время раздельного культивирования способность клеток теки секретировать Т снижалась в 2,8-3,2 раза ($p < 0,001-0,05$) в процессе развития фолликулов от стадии F2 до стадии F1 у кур-несушек в группах МДК, ПДК и ПКК, но изменялась менее существенно у кур в группе ПАК (рис. 3А). В случае фолликулов F2 эта секреция была самой высокой у постаревших птиц с короткой кладкой, превышая в 1,8 раза ($p < 0,05$) таковую у особей с ановуляторными циклами. При этом наблюдалась тенденция к увеличению в 1,6 раза ($p < 0,1$) продукции Т клетками из F2 фолликулов у ПКК кур по сравнению с МДК курами. Кроме того, секреция Т текой из фолликулов F1 проявляла тренд к повышению (в 1,7-1,8 раз, $p < 0,1$) у птиц в группах ПАК и ПКК относительно этой секреции у молодых птиц.

При совместной инкубации фолликулярных слоев разного типа продукция Т текальными клетками была в 1,8-2,2 раза выше ($p < 0,01-0,05$) в фолликулах F2, чем в фолликулах F1 у кур в группах МДК, ПДК и ПКК (рис. 3Б). У птиц в группе ПАК секреция Т текой в присутствии ГС не снижалась с повышением степени зрелости фолликулов при переходе от стадии F2 к стадии F1. При этом не было выявлено статистически значимых различий в продукции Т клетками теки из фолликулов F2 или F1 при сравнении кур разного возраста и репродуктивного статуса.

Независимо от возраста кур и их яйценоскости, культивирование ТС в присутствии ГС обуславливало повышение продукции тестостерона, по сравнению с культивированием одной теки, в 2,4-3,0 раза ($p < 0,001-0,01$) в случае фолликулов F2 и в 3,5-4,6 раза ($p < 0,01-0,1$) в случае фолликулов F1 (рис. 4А и Б).

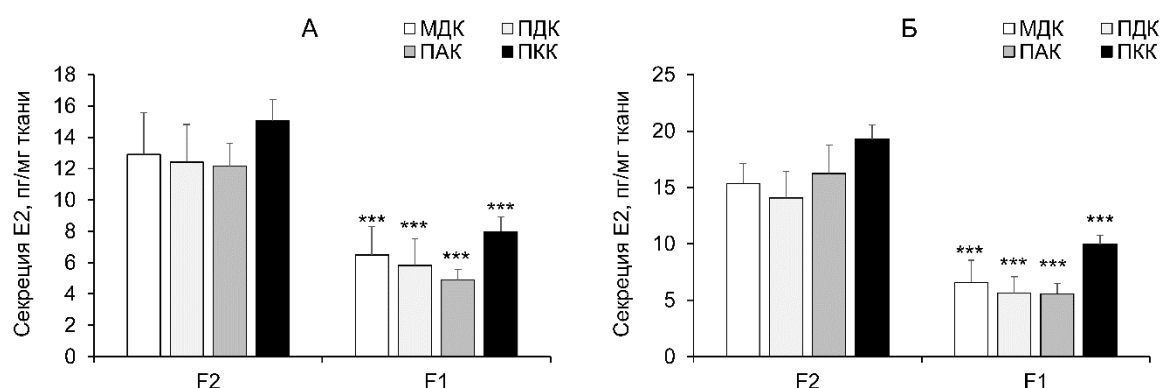


Рис. 5. Секреция эстрадиола-17 β (E2) при культивировании слоя теки индивидуально (А) или совместно со слоем гранулезы (Б) из преовуляторных фолликулов F1 и F2 у кур разного возраста и репродуктивного статуса. Различия между фолликулами F1 и F2: *** $p<0,001$.

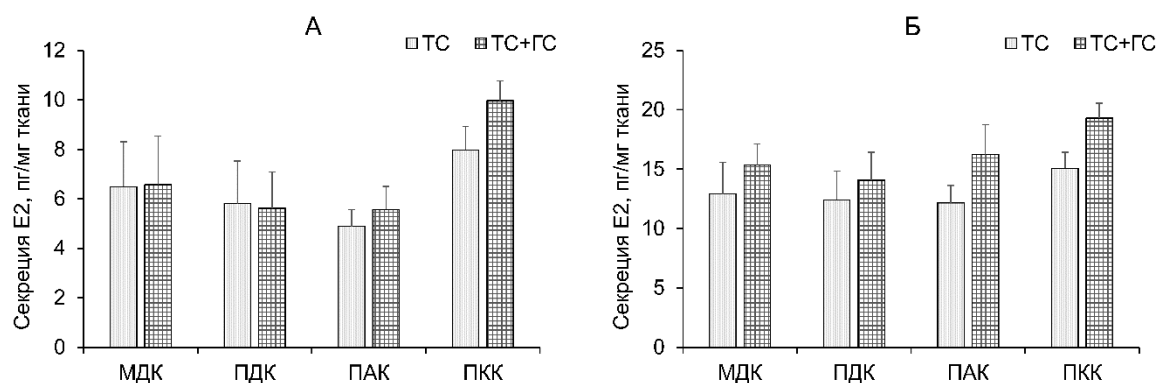


Рис. 6. Секреция эстрадиола-17 β (E2) при культивировании слоя теки индивидуально (TC) или совместно со слоем гранулезы (TC+GC) из преовуляторных фолликулов F1 (А) и F2 (Б) у кур разного возраста и репродуктивного статуса.

Как при изолированном культивировании ТС, так и при его совместной инкубации с ГС, секреция E2 была в 1,9-2,9 раза выше ($p<0,001$) при использовании фолликулов F2, чем фолликулов F1 у кур всех сравниваемых групп (рис. 5А и Б). В то же время гранулеза не влияла на способность теки из преовуляторных фолликулов на разных стадиях развития секретировать E2 у птиц разного возраста и с разным репродуктивным потенциалом (рис. 6А и Б).

Результаты настоящего исследования в целом показали, что ухудшение репродуктивной функции у постаревших кур-несушек, особенно в группе ПАК, связано с изменением способности преовуляторных фолликулов секретировать Р4 и Т. Как известно, возрастное снижение яйценоскости вызвано двумя основными причинами: 1) сокращением периода непрерывной кладки яиц (короткая яйцекладка) вследствие удлинения межовуляторного интервала с 24 ч до 26-27 ч и 2) повышением частоты ановуляторных циклов, которые наблюдаются как «пропущенные яйца» в пределах длинной кладки (Lebedeva et al., 2010; Scanes, 2022). При этом ановуляторные циклы в основном являются результатом внутрибрюшной овуляции, вызванной рассинхронизацией функционирования яичника и яйцевода, хотя иногда могут быть обусловлены повышенной атрезией преиерархических или атрезией одиночных

иерархических фолликулов, которая изредка встречается у репродуктивно постаревших птиц (Navara et al., 2015). Возможно, что изменение стероидогенной активности преовуляторных фолликулов, в первую очередь фолликула F1, служит одним из факторов нарушения синхронности процессов овуляции яйцеклетки и ее захвата воронкой яйцевода у постаревших птиц.

Способность изолированного ГС из самого зрелого фолликула F1 секретировать Р4 была повышена у кур, проявляющих признаки репродуктивного старения (ПАК и ПМК), по сравнению с молодыми особями, что являлось следствием возрастания секреции Р4 при созревании фолликулов от стадии F2 к стадии F1. Тем не менее в более физиологичных условиях (в присутствии соответствующего ГС) это возрастание сохранялось только у ПАК кур. Ранее в работе А. Hrabia и соавт. было показано, что у молодых кур-несушек продукция Р4 фолликулом F1 выше, чем фолликулом F2 только при культивировании ГС, выделенного после преовуляторной волны гормонов (которая наблюдается через 18-20 ч после овуляции). Однако эта продукция была одинаковой для фолликулов F1 и F2 при выделении ГС в начале овуляторного цикла (Hrabia et al., 2014). В нашем исследовании преовуляторные фолликулы изолировали через 7 ч после предшествующей овуляции. Поэтому выявленное повышение секреции Р4 клетками гранулезы из фолликулов F1 у кур в группе ПАК могло быть преждевременным и неблагоприятно влиять на воронку яйцевода, экспрессирующего соответствующие рецепторы (Hrabia, 2022).

Ингибирующее действие ТС на секрецию Р4 гранулезными клетками преовуляторных фолликулов F1 и F2, наблюдаемое в настоящем исследовании, согласуется с данными, полученными ранее для фолликулов F1 у кур с короткими кладками (Johnson et al., 1987). Этот эффект ТС не может быть связан с продукцией Т или Е2, поскольку оба гормона стимулируют продукцию Р4 *in vitro* (Caicedo Rivas et al., 2016). Необходимо подчеркнуть, что супрессирующее влияние теки на секрецию Р4 проявлялось у всех кур, в том числе в группе ПАК. Тем не менее ТС не подавлял преждевременное повышение продукции Р4 у ПАК птиц, что указывает на независимость лежащего в его основе механизма от паракринного взаимодействия клеток теки и гранулезы при этом типе репродуктивных нарушений.

Полученные нами данные, демонстрирующие снижение секреции Т на завершающем этапе развития преовуляторных фолликулов у кур в группах МДК, ПДК и ПМК, согласуются с ранее описанными закономерностями стероидогенеза (Marrone, Hertelendy, 1985; Robinson, Etches, 1986, Hernández-Vértiz et al., 1993; Sechman et al., 2014). В то же время у кур с частыми ановуляциями (группа ПАК) обнаружено отсутствие такого снижения при культивировании ТС из фолликула F1 как в отсутствие, так и в присутствии ГС. Хотя Т необходим для индукции овуляции у птиц, и его уровень в крови повышается за 6 часов до овуляции (Rangel et al., 2006; Rangel and Gutierrez, 2014), в избыточной концентрации он может оказывать негативное влияние на репродукцию и подавлять созревание фолликулов и/или овуляцию. Так, обработка кур-бройлеров тестостероном за 5 часов до предполагаемой овуляции приводила к отсутствию яйцекладки у подавляющего большинства птиц. В 60% случаев причиной такого отсутствия стала внутренняя овуляция, определяемая по наличию желтка в брюшной полости (Navara et al., 2015). Эти данные позволяют предположить, что избыток тестостерона нарушает нормальное взаимодействие между яичником и яйцеводом, что препятствует своевременному захвату ооцита воронкой. Также было показано, что введение экзогенного Т курам-несушкам вызывает значительное снижение яйценоскости, обусловленное торможением роста фолликулов вследствие замедления процесса отложения желтка (Dean et al., 2022). Нельзя исключить и возможное влияние Т на атрезию преовуляторных фолликулов птиц, поскольку у млекопитающих андрогены могут усиливать апоптоз гранулезных клеток (Billig et al., 1993). Следовательно, избыточная секреция тестостерона на завершающей стадии фолликулогенеза может быть одним из факторов, обуславливающих нарушение или отсутствие овуляции у кур.

Во всех экспериментальных группах кур культивирование ТС из фолликулов F1 и F2 в присутствии ГС приводило к существенному повышению секреции Т по сравнению с индивидуальным культивированием ТС. Как известно, клетки гранулезы преовуляторных фолликулов являются основным источником Р4, который служит субстратом для синтеза тестостерона клетками теки (Caicedo Rivas et al., 2016). В настоящем исследовании при совместном культивировании ГС и ТС максимальная продукция Р4 достигалась в самом крупном фолликуле F1 у кур с частыми ановуляторными циклами. Соответственно, именно у птиц в группе ПАК добавление ГС при культивировании ТС обуславливало наиболее выраженное повышение секреции тестостерона.

Результаты нашего исследования стероидогенной активности ТС согласуются с многочисленными работами других авторов, в которых было продемонстрировано уменьшение продукции Е2 по мере созревания фолликулов, связанное со снижением экспрессии в теке фермента ароматазы P450arom, ответственной за превращение андрогенов в эстрогены (Armstrong, 1984; Robinson, Etches, 1986, Sechman et al., 2014, Wang, Gong, 2017). Также ранее было установлено, что концентрация Е2 в плазме крови тесно коррелирует с возрастом и яичной продуктивностью кур (Liu et al., 2018; Mehlhorn et al., 2022). Результаты нашего исследования не выявили взаимосвязи между секрецией Е2 клетками теки двух самых больших преовуляторных фолликулов и возрастными нарушениями репродуктивной функции. По-видимому, возрастные изменения уровня Е2 в крови обусловлены в основном вкладом малых желтых фолликулов и стромы, так как на их долю приходится до 50% всей ароматазной активности яичника (Armstrong, 1984).

Хотя добавление ГС при культивировании ТС приводило к существенному увеличению секреции тестостерона, выступающего предшественником в синтезе эстрадиола-17β, сама секреция Е2 при этом не возрастала. Это, очевидно, связано с тем, что ароматаза практически перестает экспрессироваться в текальных клетках на завершающих стадиях фолликулогенеза (Sechman et al., 2014, Wang, Gong, 2017).

Заключение

Результаты настоящего исследования показывают, что преждевременное повышение секреции прогестерона клетками гранулезы и отсутствие своевременного снижения секреции тестостерона клетками теки из фолликулов F1 ассоциировано с высокой частотой ановуляторных циклов у репродуктивно постаревших кур-несушек. В то же время паракринная коммуникация между гранулезным и текальным слоями влияет на стероидогенную активность преовуляторных фолликулов независимо от возраста и яйценоскости птиц. При этом не выявлено взаимосвязи между продукцией эстрадиола-17β слоем теки из преовуляторных фолликулов F1 и F2 и возрастным снижением репродуктивной функции кур.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки по государственному заданию (тема FGGN-2024-0014).

Список литературы

1. Armstrong D.G. Ovarian aromatase activity in the domestic fowl (*Gallus domesticus*) // J. Endocrinol. 1984. Vol. 100. nr 1. P. 81–86. DOI: 10.1677/joe.0.1000081
2. Bédécarrats G.Y. Control of the reproductive axis: Balancing act between stimulatory and inhibitory inputs // Poult. Sci. 2015. Vol. 94. nr 4. P. 810–815. DOI: 10.3382/ps/peu042
3. Billig H., Furuta I., Hsueh A.J. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis // Endocrinology. 1993. Vol. 133. nr 5. P. 2204–2212. DOI: 10.1210/endo.133.5.8404672
4. Brady K., Porter T.E., Liu H.C., Long J.A. Characterization of the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in low and high egg producing turkey hens // Poult. Sci. 2020. Vol. 99. nr 2. P. 1163–1173. DOI: 10.1016/j.psj.2019.12.028.

5. Caicedo Rivas R.E., Nieto M.P., Kamiyoshi M. Effects of steroid hormone in avian follicles // *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 2016. Vol. 29. nr 4. P. 487–499. DOI: 10.5713/ajas.15.0310
6. Ciccone N.A., Sharp P.J., Wilson P.W., Dunn I.C. Changes in reproductive neuroendocrine mRNAs with decreasing ovarian function in ageing hens // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2005. Vol. 144. nr 1. P. 20–27. DOI: 10.1016/j.ygcen.2005.04.009
7. Dean C.R., Mendonça M.T., Navara K.J. Exogenous testosterone administration decreases rates of ovarian follicle growth in domestic chickens // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2022. Vol. 329. Article ID 114121. DOI: 10.1016/j.ygcen.2022.114121
8. Du Y., Liu L., He Y., Dou T., Jia J., Ge C. Endocrine and genetic factors affecting egg laying performance in chickens: a review // *Br. Poult. Sci.* 2020. Vol. 61. nr 5. P. 538–549. DOI: 10.1080/00071668.2020.1758299
9. Etches R. J. The ovulatory cycle of the hen // *Poultry Biology.* 1990. Vol. 2. P. 293–313.
10. Gilbert A.B., Evans A.J., Perry M.M., Davidson M.H. A method for separating the granulosa cells, the basal lamina and the theca of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*) // *J. Reprod. Fertil.* 1977. Vol. 50. nr 1. P. 179–181. DOI: 10.1530/jrf.0.0500179.
11. Hernández-Vértiz A., González del Pliego M., Velázquez P., Pedernera E. Morphological changes in the thecal layer during the maturation of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*) // *Gen. Comp. Endocrinol.* 1993. Vol. 92. nr 1. P. 80–87. DOI: 10.1006/gcen.1993.1145
12. Hrabia A. Reproduction in the female. In: *Sturkie's avian physiology (seventh edition)* /C.G. Scanes, D. Sami (eds.). Academic Press, 2022. P. 941–986. DOI: 10.1016/B978-0-12-819770-7.00002-5
13. Hrabia A., Sechman A., Rzasz J. Effect of growth hormone on basal and LH-stimulated steroid secretion by chicken yellow ovarian follicles. An in vitro study // *Folia Biol. (Krakow).* 2014. Vol. 62. nr 4. P. 313–319. DOI: 10.3409/fb62_4.313
14. Johnson A.L. Ovarian follicle selection and granulosa cell differentiation // *Poult. Sci.* 2015. Vol. 94. nr 4. P. 781–785. DOI: 10.3382/ps/peu008
15. Johnson P.A., Stoklosowa S., Bahr J.M. Interaction of granulosa and theca layers in the control of progesterone secretion in the domestic hen // *Biol. Reprod.* 1987. Vol. 37. nr 5. P. 1149–1155. DOI: 10.1095/biolreprod37.5.1149.
16. Lebedeva I.Y., Lebedev V.A., Grossmann R., Parvizi N. Age-dependent role of steroids in the regulation of growth of the hen follicular wall // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2010. Vol. 8. P. 15. DOI: 10.1186/1477-7827-8-15
17. Liu X.T., Lin X., Mi Y.L., Zeng W.D., Zhang C.Q. Age-related changes of yolk precursor formation in the liver of laying hens // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 2018. Vol. 19. nr 5. P. 390–399. DOI: 10.1631/jzus.B1700054
18. Marrone B.L., Hertelendy F. Decreased androstenedione production with increased follicular maturation in theca cells from the domestic hen (*Gallus domesticus*) // *J. Reprod. Fertil.* 1985. Vol. 74. nr 2. P. 543–550. DOI: 10.1530/jrf.0.0740543
19. Mehlhorn J., Höhne A., Baulain U., Schrader L., Weigend S., Petow S. Estradiol-17 β is influenced by age, housing system, and laying performance in genetically divergent laying hens (*Gallus gallus* f.d.) // *Front. Physiol.* 2022. Vol. 13. Article ID 954399. DOI: 10.3389/fphys.2022.954399
20. Navara K.J., Pinson S.E., Chary P., Taube P.C. Higher rates of internal ovulations occur in broiler breeder hens treated with testosterone // *Poult. Sci.* 2015. Vol. 94. nr 6. P. 1346–1352. DOI: 10.3382/ps/pev103
21. Proszkowiec-Weglarz M., Rzasz J., Słomczyńska M., Paczoska-Eliasiewicz H. Steroidogenic activity of chicken ovary during pause in egg laying // *Reprod. Biol.* 2005. Vol. 5. nr 2. P. 205–225.
22. Rangel P.L., Rodríguez A., Rojas S., Sharp P.J., Gutierrez C.G. Testosterone stimulates progesterone production and STAR, P450 cholesterol side-chain cleavage and LH receptor mRNAs expression in hen (*Gallus domesticus*) granulosa cells // *Reproduction.* 2009. Vol. 138. nr 6. P. 961–969. DOI: 10.1530/REP-09-0071
23. Rangel P.L., Gutierrez C.G. Reproduction in hens: is testosterone necessary for the ovulatory process? // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2014. Vol. 203. P. 250–261. DOI: 10.1016/j.ygcen.2014.03.040
24. Rangel P.L., Sharp P.J., Gutierrez C.G. Testosterone antagonist (flutamide) blocks ovulation and preovulatory surges of progesterone, luteinizing hormone and oestradiol in laying hens // *Reproduction.* 2006. Vol. 131. nr 6. P. 1109–1114. DOI: 10.1530/rep.1.01067
25. Ru M., Liang H., Ruan J., Haji R.A., Cui Y., Yin C., Wei Q., Huang J. Chicken ovarian follicular atresia: interaction network at organic, cellular, and molecular levels // *Poult. Sci.* 2024. Vol. 103. nr 8. Article ID 103893. DOI: 10.1016/j.psj.2024.103893

26. Scanes C.G. Discontinuities in understanding follicular development, the ovulatory cycle and the oviposition cycles in the hen: Advances, opportunities, slow downs and complete stops // *Front. Physiol.* 2022. Vol. 13. Article ID 1023528. DOI: 10.3389/fphys.2022.1023528
27. Sechman A., Antos P., Katarzyńska D., Grzegorzewska A., Wojtysiak D., Hrabia A. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on secretion of steroids and STAR, HSD3B and CYP19A1 mRNA expression in chicken ovarian follicles // *Toxicol. Lett.* 2014. Vol. 225. nr 2. P. 264–274. DOI: 10.1016/j.toxlet.2013.12.021
28. Wang J., Gong Y. Transcription of CYP19A1 is directly regulated by SF-1 in the theca cells of ovary follicles in chicken // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2017. Vol. 247. P. 1–7. DOI: 10.1016/j.ygcen.2017.03.013
29. Williams J.B., Sharp P.J. Age-dependent changes in the hypothalamo-pituitary-ovarian axis of the laying hen // *J. Reprod. Fertil.* 1978. Vol. 53. nr 1. P. 141–146. DOI: 10.1530/jrf.0.0530141
30. Wojtysiak D., Okólski A., Sechman A. Structure and steroidogenic activity of the granulosa layer of F1 preovulatory ovarian follicles of the hen (*Gallus domesticus*) // *Folia Biol (Krakow)*. 2011. V. 59. nr 1-2. P. 59–64. DOI: 10.3409/fb59_1-2.59-64.
31. Zhao J., Pan H., Liu Y., He Y., Shi H., Ge C. Interacting Networks of the Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis Regulate Layer Hens Performance // *Genes (Basel)*. 2023. Vol. 14. nr 1. Article ID 141. DOI: 10.3390/genes14010141

UDC 636.5:612.621:612.018

Factors modulating steroidogenic activity of preovulatory follicle cells in the domestic hen

Smekalova A.A., Mityashova O.S., Lebedeva I.Yu.

*Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Podolsk -Dubrovitsy,
Moscow Region*

ABSTRACT. Age-related dysfunctions in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis are associated with declining egg production in domestic hens. The aim of this study was to examine the ability of the granulosa layer (GL) and theca layer (TL) from F1 and F2 preovulatory follicles to secrete steroid hormones, depending on the paracrine interaction between different cell types and signs of reproductive aging in laying hens. Four groups of hens were used in the experiment: 1) young birds with long egg-laying clutches (YLC) and old birds: 2) with long clutches (OLC), 3) with anovulatory cycles within long clutches (OAC), and 4) with short clutches (OSC). The theca and granulosa layers were isolated from the follicles 7 hours after ovulation and incubated individually or together for 18 hours. Hormone concentrations in the culture media were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The ability of the GL from F1 follicles to secrete progesterone (P4) increased 1.3-fold ($p < 0.05$) during follicular maturation from the F2 stage to the F1 stage in hens from the OAC and OSC groups. Under GL and TL co-culture conditions, this increase was maintained only in the OAC group. During individual and joint incubation of different follicular layers, the testosterone (T) production by thecal cells was 1.8–3.2 times higher ($p < 0.001–0.05$) in F2 follicles than in F1 follicles in all groups except OAC. Co-culturing of GL and TL in all hens led to a 2.0–3.8-fold decrease in the P4 production ($p < 0.001$) and a 2.4–4.6-fold increase in the T production ($p < 0.001–0.1$). Thus, a premature elevation of the P4 secretion and the lack of a timely decrease in the T secretion by F1 follicle cells are associated with a high frequency of anovulation in aged hens, while paracrine communication between the GL and TL affects the steroidogenic activity of preovulatory follicles regardless of the age and egg-laying capacity of the birds.

Keywords: laying hens, steroidogenesis, preovulatory follicles, theca cells, granulosa cells, reproductive aging.

Problemy biologii produktivnykh zhivtnykh (Productive Animal Biology). 2026. 3:59-70

Поступило в редакцию: 07.06.2026

Получено после доработки: 08.09. 2026

Сведения об авторах:

Смекалова Араксия Ашотовна, м.н.с., araksia86@mail.ru;

Митяшова Ольга Сергеевна, с.н.с., mityashova_o@mail.ru;

Лебедева Ирина Юрьевна, д.б.н., г.н.с., irledv@mail.ru