
ВОСПРОИЗВОДСТВО

УДК 636.5:612.621:612.018.2

DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2025.4.65-73

**ВЛИЯНИЕ ГОРМОНА РОСТА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК
ГРАНУЛЁЗЫ И ТЕКИ ИЗ ПРЕОВУЛЯТОРНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ МОЛОДЫХ
И РЕПРОДУКТИВНО ПОСТАРЕВШИХ КУР *in vitro***

Смекалова А.А., Лебедева И.Ю.,

*ФИЦ животноводства – ВИЖ им. Л.К. Эрнста, Подольск - Дубровицы
Московской области, Российская Федерация*

Гормон роста (ГР) является позитивным регулятором репродуктивной функции у птиц, однако его роль в процессах овариального старения остаётся неясной. Цель представленной работы – сравнительное исследование *in vitro* влияния ГР на пролиферативную активность и апоптотические изменения клеток гранулёзы и теки из преовуляторных фолликулов кур в период максимальной интенсивности яйцекладки и в период её последующего снижения. В экспериментах использовали две группы кур несушек породы Хайсекс Уайт: молодые в возрасте 27-32 недели с длинными циклами кладки яиц (МДК) и репродуктивно постаревшие в возрасте 71-97 недель с короткими циклами яйцекладки (ПКК). Клетки выделяли из самого зрелого преовуляторного фолликула F1, овулирующего в текущем цикле и следующего по величине F2 и культивировали в течение 24 ч в отсутствие (контроль) или в присутствии рекомбинантного ГР кур (25 нг/мл). Пролиферативную активность и апоптотические изменения оценивали иммуноцитохимическим методом по уровню экспрессии маркера пролиферации PCNA и проапоптотического белка Вах. Исследование проводили в 8-9 повторностях. Гормон роста повышал ($P < 0,01-0,05$) долю PCNA-позитивных гранулёзных и текальных клеток у птиц обеих сравниваемых групп, при этом у ПКК кур этот эффект был менее выраженным в клетках из фолликула F2. ГР снижал ($P < 0,01-0,05$) экспрессию проапоптотического белка Вах в клетках гранулёзы из фолликулов F1 и F2 в группе МДК и не влиял на его экспрессию в группе ПКК. В то же время ГР повышал ($P < 0,01$) долю Вах-позитивных клеток теки из фолликулов F1 и F2, но только у МДК кур. Таким образом, в процессе репродуктивного старения снижается чувствительность фолликулярных клеток к ростостимулирующему действию ГР, особенно у клеток из фолликулов F2, и приобретает резистентность к апоптоз-модулирующему действию гормона.

*Ключевые слова: куры-несушки, гормон роста, преовуляторные фолликулы, клетки гранулёзы, клетки теки, пролиферация *in vitro*, апоптоз, репродуктивное старение.*

Проблемы биологии продуктивных животных, 2025, 4: 65-73.

Введение

Используемые обозначения: ГР – гормон роста; ИФР-1 – инсулиноподобный фактор роста-1; МДК куры – молодые куры с длинными циклами кладки яиц; ПКК куры – постаревшие куры с короткими циклами кладки яиц.

Репродуктивная способность домашних кур (*Gallus gallus domesticus*) в поздний продуктивный период характеризуется постепенным снижением яйценоскости, вызванным сокращением длительности периодов ежедневной яйцекладки и повышением частоты ановуляторных циклов, а также ухудшением качества яиц (Lebedeva et al., 2010; Eltahan et al.,

2023). Эти процессы сопровождаются нарушениями в функционировании эндокринной системы, что, в свою очередь, неблагоприятно влияет на яичную продуктивность (Eltahan et al., 2023; He et al., 2023). Куры-несушки в возрасте 27–28 недель вступают в фазу максимальной яйценоскости, которая может длиться в течение 20 и более недель, затем продуктивность птиц постепенно снижается, причем существенное снижение наблюдается уже после 480 дней жизни (Liu et al., 2018; Chen et al., 2024). К 71-75 неделям жизни яйценоскость может упасть на 30% и более по сравнению с максимальным уровнем (Нао et al., 2021). Качество яиц (прочность скорлупы, содержание белка) при этом также ухудшается (Padhi et al., 2013). Таким образом, понимание механизмов регуляции процессов, ведущих к снижению репродуктивной функции несушек, имеет ключевое значение для разработки способов продления периода их продуктивного использования и повышения экономической эффективности промышленного птицеводства.

Возрастное снижение яйценоскости вызвано репродуктивным старением — совокупностью морфологических, эндокринных, молекулярных и клеточных изменений, происходящих с течением времени в яичнике и яйцеводе несушек. С возрастом у домашних кур отмечается значительная атрофия яичника: резко уменьшается общее количество растущих фолликулов, как преиерархических, так и иерархических (преовуляторных), на фоне увеличения доли атретических (дегенерированных) фолликулов. Эти морфофункциональные изменения тесно коррелируют со снижением яйценоскости (Нао et al., 2021). Атрезия фолликулов может быть обусловлена множеством внешних (питание, условия окружающей среды) и внутренних факторов, в том числе аномальными уровнями репродуктивных гормонов и факторов роста, дисфункцией гипоталамо-гипофизарно-овариальной оси, деструктивными эпигенетическими изменениями и т.п. (Ru et al., 2024). Одной из основных причин репродуктивного старения, действующих на молекулярном уровне, является развитие окислительного стресса: в яичниках возрастных кур наблюдается накопление активных форм кислорода, что вызывает повреждение основных клеточных компонентов — ДНК, липидов и белков. Одновременно в крови и овариальных тканях снижается содержание/активность главных ферментов антиоксидантной системы (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы), что усугубляет повреждение клеток (Liu et al., 2018; Нао et al., 2021). Повышенный уровень окислительного стресса активирует каспазы и другие проапоптотические белки (Вах, Вах). При этом снижается экспрессия генов, кодирующих антиапоптотические белки (например, Bcl-2), что приводит к массовой гибели гранулезных и текальных клеток и, как следствие, к атрезии фолликулов (Ru et al., 2024). В связи с вышеизложенным, весьма актуальны исследования, направленные на изучение роли различных факторов в регуляции возрастных функциональных изменений фолликулярных клеток. Результаты таких исследований открывают пути для продления репродуктивного долголетия и поддержания высокой яйценоскости кур в поздний продуктивный период.

Одним из наиболее важных модуляторов овариальной функции служит гормон роста (ГР), основной функцией которого является контроль метаболизма в организме животных (Donato et al., 2021). В последние годы накоплен ряд убедительных доказательств того, что ГР участвует в регуляции фолликулогенеза, влияя на стероидогенез, пролиферацию, дифференцировку и апоптоз фолликулярных клеток не только у млекопитающих, но и у птиц (Hull, Harvey, 2001; Hrabia, 2015; Devesa et al., 2019; Смекалова, Лебедева, 2024). Действие ГР реализуется как через эндокринные, так и через паракринные/аутокринные механизмы, поскольку, помимо гипофиза, ГР синтезируется и непосредственно в овариальных тканях. Экспрессия ГР на уровне мРНК и белка обнаружена во всех структурных компонентах яичника курицы, включая строму, гранулезные и текальные клетки фолликулов разного размера и уровня зрелости — от малых белых фолликулов до преовуляторных (Ahumada-Solórzano et al., 2012; Luna et al., 2014; Hrabia, 2015).

Разнообразие эффектов ГР является результатом либо его прямого воздействия на свои рецепторы, локализованные в клетках-мишенях, либо непрямого влияния через инсулиноподобный фактор роста-1 (ИФР-1), вырабатываемый главным образом в печени в ответ на стимуляцию ГР. Рецепторы ГР являются мембранными гликопротеинами, относящимися к классу I семейства рецепторов цитокинов, которые после связывания с гормоном и образования димерного комплекса активируют нерецепторную тирозинкиназу JAK2 и киназы семейства Src (Frank, 2020). Реакция тканей на ГР опосредуется несколькими сигнальными путями (STAT, PI3K и ERK), специфичными для каждого типа клеток, и может включать реорганизацию цитоскелета, миграцию клеток, хемотаксис, митогенез и/или предотвращение апоптоза и транскрипцию определенных генов (Pilecka et al. 2007).

Участие ГР в регуляции репродуктивной функции у кур подтверждается рядом экспериментальных данных. Так, наличие рецепторов ГР было выявлено в строме развивающегося яичника и в разных слоях стенки фолликулов с различной степенью зрелости у половозрелых кур (Heck et al., 2003; Lebedeva et al., 2004; Hrabia et al., 2008; Ahumada-Solórzano et al., 2012). Обнаружена корреляция между повышением концентрации ГР в плазме крови и началом яйцекладки у кур молодок (Williams et al., 1986). В то же время при прекращении яйцекладки наблюдалось значительное снижение секреции ГР у кур и индеек (Bedrak et al., 1981). Введение рекомбинантного куриного ГР цыплятам за несколько недель до полового созревания приводило к увеличению массы яичника, росту числа мелких фолликулов и ускорению формирования крупных желтых фолликулов (Hrabia et al., 2011). Во время паузы в яйцекладке, вызванной голоданием, ГР усиливал атрезию желтых иерархических фолликулов, а затем стимулировал активацию примордиальных фолликулов и их переход в пул растущих фолликулов (Socha et al., 2019). Это свидетельствует о том, что при определенных условиях ГР может оказывать терапевтическое воздействие и улучшать репродуктивные показатели птиц. Вместе с тем известно и о способности данного гормона ускорять процессы старения в организме животных (Chesnokova et al., 2021; Bartke, 2022). У возрастных кур-несушек сокращение циклов яйцекладки было ассоциировано с повышением концентрации ГР в плазме крови (Smekalova et al., 2019), что указывает на возможное участие гормона в процессах репродуктивного старения.

Эксперименты *in vitro* показали стимулирующее влияние ГР на пролиферацию гранулезных клеток кур из преиерархических фолликулов, которое достигалось посредством активации киназы Erk1/2 и индукции локального синтеза ИФР-1 (Ahumada-Solórzano et al., 2016). При этом иммуонейтрализация ИФР-1 приводила к исчезновению ростостимулирующего эффекта ГР. Кроме того, ингибирование локального синтеза ГР в культуре клеток гранулёзы с помощью специфической малой интерферирующей РНК вызывало снижение скорости клеточной пролиферации. Результаты этого исследования подтверждают физиологическую значимость локально продуцируемого ГР и возможность реализации его влияния через ИФР-1. Кроме того, ранее нами было выявлено модулирующее действие ГР на экспрессию маркеров пролиферации и апоптоза в культуре клеток теки и гранулёзы из самого зрелого преовуляторного фолликула у кур несушек (Смекалова и др., 2021).

Несмотря на значительный прогресс в понимании роли ГР в функционировании яичника, остаётся не до конца выясненным возрастное изменение его регуляторного влияния на функциональное состояние фолликулярных клеток.

Цель исследования – *in vitro* оценка влияния ГР на функциональное состояние клеток гранулёзы и теки из преовуляторных фолликулов кур в период максимальной интенсивности яйцекладки и в период её последующего снижения.

Материал и методы

В эксперименте были использованы две группы кур несушек породы Хайсекс Уайт, различающиеся по возрасту и интенсивности яйцекладки: 1-я группа: МДК – молодые куры в

возрасте 27-32 недели с длинными циклами кладки яиц (не менее 10 яиц в каждом цикле); 2-я группа: ПМК – репродуктивно постаревшие птицы в возрасте 71-97 недель с короткими циклами кладки (3-6 яиц на цикл). Птиц содержали в индивидуальных клетках при 12-часовом освещении. Время яйцекладки регистрировали с использованием видеонаблюдения. Фолликулы выделяли через 7 ч после овуляции с целью синхронизации стероидогенной активности фолликулов у разных птиц. Время овуляции рассчитывали, исходя из того, что она происходит через 30 мин после откладывания яйца (Guo et al., 2025). Все эксперименты с птицей проводили согласно принципам ветеринарной медицинской этики и Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS №123, Страсбург, 1986), а также требованиям надлежащей лабораторной практики (ГОСТ 33215–2014).

Для выделения клеток были использованы два самых крупных жёлтых иерархических фолликула – F1 и F2 (согласно общепринятой классификации, F1 – самый зрелый фолликул, овулирующий в текущем цикле, а F2 – следующий по величине фолликул) (Kui et al., 2023). Клетки теки и гранулёзы выделяли согласно методике, описанной ранее (Lebedeva et al., 2010), предварительно удаляя из гранулёзного слоя участок, примыкающий к зародышевому диску. Культивирование клеток осуществляли на покровных стёклах в чашках Петри в среде DMEM, содержащей 25 мМ НЕРЕС, 1 г/л глюкозы, 1 мМ глутамин, 10 мл/л раствора антибиотика-антимикотика (все – Sigma-Aldrich, США) и 10% фетальной бычьей сыворотки (Hyclone, США). После образования монослоя среду заменяли на бессывороточную среду и инкубировали клетки в течение 24 ч в отсутствие (контроль) или в присутствии рекомбинантного ГР кур (ProSpec, Израиль) в концентрации 25 нг/мл. Используемая концентрация ГР была выбрана, как максимально эффективная, на основании результатов наших более ранних исследований (Смекалова и др., 2021).

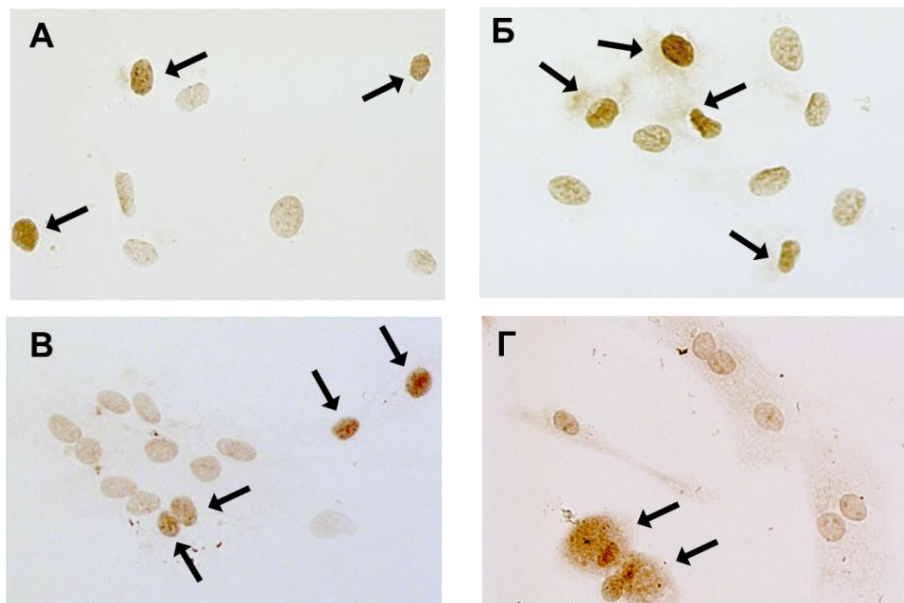


Рис. 1. Иммуноцитохимический анализ экспрессии маркера пролиферации PCNA (А, В) и маркера апоптоза Bax (Б, Г) в культуре клеток гранулёзы (А, Б) и в культуре клеток теки (В, Г) кур. Стрелками показано позитивное окрашивание ядер на PCNA и цитоплазмы на Bax.

После культивирования клетки фиксировали 2% раствором параформальдегида и пермеабелизировали с помощью 0,2% Тритона X-100. Для блокировки неспецифического связывания антител образцы обрабатывали 10%-ным раствором нормальной лошадиной

сыворотки (Abscam, Великобритания). Далее клетки инкубировали с первичными мышинными антителами к ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA, Dako, США) или к проапоптотическому белку Вах (Bio-Rad, США) в течение 18 ч при 4 °С и затем – со вторыми биотинилированными антителами (лошадиными антимышными иммуноглобулинами; Vector Laboratories, Inc., США) в течение 30 мин при комнатной температуре. Специфическое связывание визуализировали с помощью системы Vectastain ABC и хромогена DAB (диаминобензидин), дающего коричневую окраску. Долю PCNA- и Вах-позитивных клеток определяли, как процент коричнево-окрашенных (иммунореактивных) клеток от общего числа клеток (рис. 1).

Эксперименты были выполнены в 8–9 независимых повторностях, при этом в каждом повторе использовали фолликулярные клетки, выделенные от одной курицы. Статистический анализ данных проводили с применением дисперсионного анализа ANOVA в программе SigmaStat 4.0 (Systat Software, Inc., США). В качестве изучаемых факторов использовали категорию фолликулов (F1 и F2) и наличие ГР в среде культивирования. Для множественного сравнения средних использовали апостериорный тест Тьюки. Все данные представлены как средние значения ± стандартные ошибки.

Результаты и обсуждение

Пролиферативную активность и апоптотические изменения в фолликулярных клетках оценивали методом иммуноцитохимического анализа по уровню экспрессии ядерного антигена пролиферирующих клеток PCNA и проапоптотического белка Вах, соответственно (рис. 1).

При проведении исследований было обнаружено стимулирующее действие ГР на пролиферативную активность клеток гранулёзы из фолликулов F1 и F2 и у молодых (МДК), и у репродуктивно постаревших (ПКК) кур (рис. 2 А). Гормон повышал ($p < 0,01-0,05$) долю PCNA-позитивных гранулёзных клеток из фолликулов F1 у птиц обеих групп. В клетках из фолликула F2 стимулирующее воздействие на экспрессию PCNA было более выраженным у МДК кур ($p < 0,001$), чем у ПКК ($p < 0,05$). При этом ГР снижал ($p < 0,01-0,05$) экспрессию проапоптотического белка Вах в клетках гранулёзы из фолликулов F1 и F2 только в группе МДК, тогда как у птиц в группе ПКК он не оказывал существенного влияния на экспрессию Вах (рис. 2 Б).

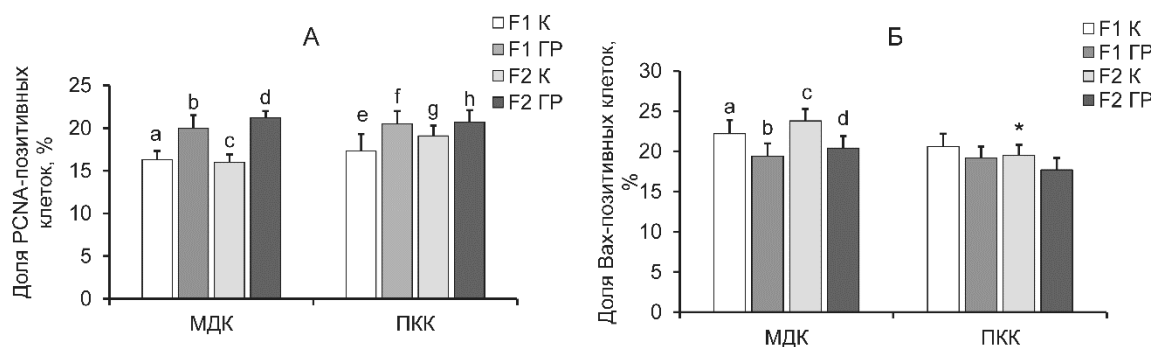


Рис. 2. Экспрессия маркера пролиферации PCNA (А) и проапоптотического белка Вах (Б) в клетках гранулёзы из преовуляторных фолликулов молодых (МДК) и репродуктивно постаревших (ПКК) кур в отсутствие (К) и в присутствии 25 нг/мл гормона роста (ГР). F1 – самый зрелый фолликул, овулирующий в текущем цикле, F2 – следующий по величине фолликул, К – контроль, ГР – гормон роста. Значимость различий между системами культивирования: $a,bP < 0,01$; $c,dP < 0,001$; $e,fP < 0,05$; $g,hP < 0,05$ (А); $a,bP < 0,05$; $c,dP < 0,01$ (Б). Значимость различий между МДК и ПКК курами: $*P < 0,05$. На диаграммах показаны: среднегрупповые значения и стандартные ошибки, оцененные по тесту Тьюки: $t = S/\sqrt{n}$, где S – внутригрупповая сумма квадратов отклонений, $n = 8$.

Следует также отметить, что уровень экспрессии проапоптотического белка Вах в клетках гранулёзы был выше у МДК, чем у ПКК кур, особенно в группе клеток из фолликула F2 ($p < 0,05$), что свидетельствует о более высокой скорости обновления пула гранулёзных клеток у молодых птиц.

Внесение ГР в культуру клеток теки также оказывало ростостимулирующее воздействие: у кур: в группе МДК доля клеток из фолликулов F1 и F2 с позитивной реакцией на PCNA увеличивалась ($P < 0,01$), а в группе ПКК возрастание ($P < 0,001$) наблюдалось в клетках из самого зрелого фолликула F1 (рис. 3 А). У молодых птиц влияние ГР на апоптотические изменения в клетках теки отличалось от его влияния на клетки гранулёзы: гормон повышал ($P < 0,01$) долю Вах-позитивных клеток теки из фолликулов F1 и F2 у МДК кур (рис. 3 Б), но не оказывал проапоптотического влияния на клетки теки из фолликулов обеих категорий у птиц в группе ПКК. Как следствие, у молодых птиц наблюдалась более высокая экспрессия проапоптотического белка Вах в клетках теки, культивируемых в присутствии ГР, по сравнению с репродуктивно постаревшими птицами ($P < 0,001-0,01$).

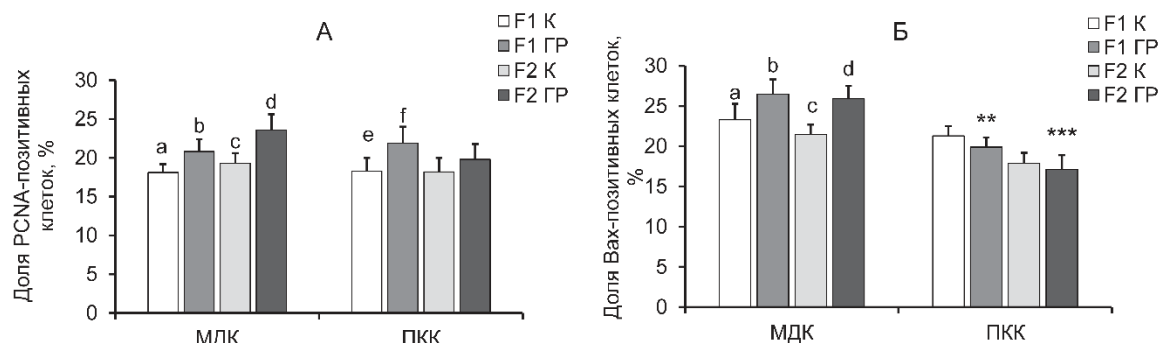


Рис. 3. Экспрессия маркера пролиферации PCNA (А) и проапоптотического белка Вах (Б) в клетках теки из преовуляторных фолликулов молодых (МДК) и репродуктивно постаревших (ПКК) кур в отсутствие (К) и в присутствии 25 нг/мл гормона роста (ГР). Значимость различий между системами культивирования: ^{a,b} $P < 0,01$; ^{c,d} $P < 0,01$; ^{e,f} $P < 0,001$ (А); ^{a,b} $P < 0,01$; ^{c,d} $P < 0,01$ (Б). Значимость различий между МДК и ПКК курами: ^{**} $P < 0,01$; ^{***} $P < 0,001$.

Ранее было показано пролиферативное действие ГР на клетки преиерархических фолликулов домашней курицы (Hrabia et al., 2011; Ahumada-Solórzano et al., 2016). В настоящем исследовании ГР оказывал *in vitro* ростостимулирующее влияние на клетки гранулёзы и теки двух самых больших иерархических фолликулов у молодых несушек, аналогично его влиянию на клетки из антральных фолликулов с разной степенью зрелости у млекопитающих (Hull, Harvey, 2001; Ipsa et al., 2019). При этом гормональный эффект был более выражен в клетках гранулёзы, по сравнению с клетками теки, что согласуется с данными о повышении концентрации рецепторов ГР в гранулёзном слое и ее снижении в текальном слое по мере созревания преовуляторных фолликулов кур (Lebedeva et al., 2004).

У МДК кур выявлено разнонаправленное тканеспецифическое влияние ГР на экспрессию проапоптотического белка Вах. Антиапоптотическое действие этого гормона на клетки гранулёзы было схожим с его действием на гранулёзные клетки из преовуляторных фолликулов млекопитающих (Markström et al., 2002), а также на клетки малых белых фолликулов во время полового созревания у кур несушек (Hrabia et al., 2011). В то же время, ГР повышал экспрессию Вах в клетках теки, что указывает на различия в механизме гормонального воздействия на устойчивость к апоптозу фолликулярных клеток разного типа. Эти данные также позволяют предположить возможное участие ГР у молодых птиц в ускорении обновления пула текальных клеток в преовуляторных фолликулах за счёт стимуляции деления и апоптоза. Таким образом, в

период максимальной яйценоскости кур ГР может способствовать выживаемости клеток гранулёзы, но не клеток теки, что, очевидно, обусловлено ключевой ролью гранулёзных клеток в инициации фолликулярной атрезии вследствие их высокой подверженности апоптозу (Ru et al., 2024).

При проведении исследования установлено, что репродуктивное старение снижает чувствительность клеток гранулёзы и теки к воздействию ГР. В случае ростостимулирующего действия гормона этот возрастной эффект был более выражен в клетках из фолликула F2, в сравнении с F1. В то же время способность ГР модулировать экспрессию проапоптотического белка Вах в клетках гранулёзы и теки была полностью утрачена в конце продуктивного периода. Следовательно, стимулирующее влияние ГР на жизнеспособность наиболее зрелых иерархических фолликулов F1 и F2 могло быть реализовано только у молодых кур с высокой яйценоскостью, и оно исчезало у репродуктивно постаревших птиц, что, вероятно, служило одной из причин их низкой яичной продуктивности.

Заключение

В проведенном исследовании установлено, что гормон роста может стимулировать *in vitro* пролиферацию гранулёзных и текальных клеток из двух самых зрелых преовуляторных фолликулов у молодых кур. Кроме того, ГР может оказывать антиапоптотическое влияние на клетки гранулёзы и проапоптотическое влияние на клетки теки в период максимально интенсивной яйцекладки у кур-несушек. В процессе репродуктивного старения снижается чувствительность фолликулярных клеток к ростостимулирующему действию ГР, особенно у клеток из менее зрелых преовуляторных фолликулов, и приобретает резистентность к апоптоз-модулирующему действию гормона.

Работа выполнена по государственному заданию (тема FGGN-2024-0014).

Список литературы

1. Смекалова А.А., Лебедева И.Ю. Роль соматотропного гормона в эндокринном и локальном контроле репродуктивной функции у домашней курицы (*Gallus domesticus* L.) (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2024. Т. 59. № 6. С. 1076-1090. DOI: 10.15389/agrobiology.2024.6.1076rus
2. Смекалова А.А., Митяшова О.С., Алейникова О.В., Монтвила Е.К., Лебедева И.Ю. Модулирующее действие соматотропного гормона на функциональное состояние культивируемых клеток из преовуляторных фолликулов кур // Генетика и разведение животных. 2021. № 4. С. 108-113. DOI: 10.31043/2410-2733-2021-4-108-113
3. Ahumada-Solórzano S.M., Carranza M.E. et al. Local expression and distribution of growth hormone and growth hormone receptor in the chicken ovary: effects of GH on steroidogenesis in cultured follicular granulosa cells. // Gen. Comp. Endocrinol. 2012. Vol. 175. nr 2. P. 297-310. DOI: 10.1016/j.ygcen.2011.11.027
4. Ahumada-Solórzano S.M., Martínez-Moreno C.G. et al. Autocrine/paracrine proliferative effect of ovarian GH and IGF-I in chicken granulosa cell cultures. // Gen. Comp. Endocrinol. 2016. Vol. 234. P. 47–56. DOI: 10.1016/j.ygcen.2016.05.008
5. Bartke A. Somatotropic axis, pace of life and aging. // Front. Endocrinol. (Lausanne). 2022. Vol. 13. Article ID 916139. DOI: 10.3389/fendo.2022.916139
6. Bedrak E., Harvey S., Chadwick A. Concentrations of pituitary, gonadal and adrenal hormones in serum of laying and broody white rock hens (*Gallus domesticus*). // J. Endocrinol. 1981. Vol. 89. nr 2. P. 197–204. DOI: 10.1677/joe.0.0890197
7. Chen Y., Yang Z., Bai J. et al. Bioactive lignan honokiol alleviates ovarian oxidative stress in aging laying chickens by regulating SIRT3/AMPK pathway. // Antioxidants (Basel). 2024. Vol. 13. nr 3. P. 377. DOI: 10.3390/antiox13030377
8. Chesnokova V., Zonis S., Apostolou A. et al. Local non-pituitary growth hormone is induced with aging and facilitates epithelial damage. // Cell Rep. 2021. Vol. 37. nr 11. Article ID 110068. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.110068

9. Devesa J, Caicedo D. The role of growth hormone on ovarian functioning and ovarian angiogenesis. // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2019. Vol. 10. P. 450. DOI: 10.3389/fendo.2019.00450
10. Donato J.Jr., Wasinski F., Furigo I.C., Metzger M., Frazão R. Central regulation of metabolism by growth hormone // *Cells*. 2021. Vol. 10. nr 1. P. 129. DOI: 10.3390/cells10010129.
11. Eltahan H.M., Cho S., Rana M.M. et al. Dietary exogenous phytase improve egg quality, reproductive hormones, and prolongs the lifetime of the aging Hy-Line brown laying hens fed nonphytate phosphorus. // *Poult. Sci.* 2023. Vol. 102. nr 9. Article ID 102895. DOI:10.1016/j.psj.2023.102895.
12. Frank S.J. Classical and novel GH receptor signaling pathways. // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2020. Vol. 518. Article ID 110999. DOI: 10.1016/j.mce.2020.110999
13. Guo Y., Chen Y., Guo H. et al. Genome-wide association study revealed candidate genes associated with egg-laying time traits in layer chicken. // *Poult. Sci.* 2025. Vol. 104. nr 7. Article ID 105255. DOI: 10.1016/j.psj.2025.105255
14. Hao E.Y., Wang D.H., Chen Y.F., Zhou R.Y., Chen H., Huang R.L. The relationship between the mTOR signaling pathway and ovarian aging in peak-phase and late-phase laying hens. // *Poult. Sci.* 2021. Vol. 100. nr 1. P. 334–347. DOI: 10.1016/j.psj.2020.10.005
15. He W., Wang H., Tang C., Zhao Q., Zhang J. Dietary supplementation with astaxanthin alleviates ovarian aging in aged laying hens by enhancing antioxidant capacity and increasing reproductive hormones. // *Poult. Sci.* 2023. Vol. 102. nr 1. Article ID 102258. DOI: 10.1016/j.psj.2022.102258
16. Heck A., Metayer S., Onagbesan O.M., Williams J. mRNA expression of components of the IGF system and of GH and insulin receptors in ovaries of broiler breeder hens fed ad libitum or restricted from 4 to 16 weeks of age. // *Domest. Anim. Endocrinol.* 2003. Vol. 25. nr 3. P. 287–294. DOI: 10.1016/s0739-7240(03)00064-x
17. Hrabia A. Growth hormone production and role in the reproductive system of female chicken. // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2015. Vol. 220. P. 112–118. DOI: 10.1016/j.ygcen.2014.12.022
18. Hrabia A., Paczoska-Eliasiewicz H.E. et al. Expression and localization of growth hormone and its receptors in the chicken ovary during sexual maturation. // *Cell Tissue Res.* 2008. Vol. 332. nr 2. P. 317–328. DOI: 10.1007/s00441-008-0595-7
19. Hrabia A., Sechman A., Gertler A., Rząsa J. Effect of growth hormone on steroid content, proliferation and apoptosis in the chicken ovary during sexual maturation. // *Cell Tissue Res.* 2011. Vol. 345. nr 1. P. 191–202. DOI: 10.1007/s00441-011-1187-5
20. Hull K.L., Harvey S. Growth hormone: roles in female reproduction. // *J. Endocrinol.* 2001. Vol. 168. nr 1. P. 1–23. DOI: 10.1677/joe.0.1680001
21. Ipsa E., Cruzat V.F., Kagize J.N. et al. Growth hormone and insulin-like growth factor action in reproductive tissues. // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2019. Vol. 10. P. 777. DOI: 10.3389/fendo.2019.00777
22. Kui H., Li P., Wang T. et al. Dynamic mRNA expression during chicken ovarian follicle development. // *G3 (Bethesda)*. 2023. Vol. 14. nr 1. Article ID jkad237. DOI: 10.1093/g3journal/jkad237
23. 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
24. Lebedeva I.Y., Lebedev V.A., Grossmann R., Kuzmina T.I., Parvizi N. Characterization of growth hormone binding sites in granulosa and theca layers at different stages of follicular maturation and ovulatory cycle in the domestic hen. // *Biol. Reprod.* 2004. Vol. 71. nr 4. P. 1174–1181. DOI: 10.1095/biolreprod.104.030056
25. Liu X., Lin X., Mi Y., Li J., Zhang C. Grape seed proanthocyanidin extract prevents ovarian aging by inhibiting oxidative stress in the hens. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018. Vol. 2018. Article ID 9390810. DOI: 10.1155/2018/9390810.
26. Luna M., Martínez-Moreno C.G. et al. Extrapituitary growth hormone in the chicken reproductive system. // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2014. Vol. 203. P. 60–68. DOI: 10.1016/j.ygcen.2014.02.021
27. Markström E., Svensson E.C., Shao R., Svanberg B., Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. // *Reproduction.* 2002. Vol. 123. nr 1. P. 23–30. DOI: 10.1530/rep.0.1230023
28. Padhi M., Chatterjee R., Haunshi S., Ullengala R. Effect of age on egg quality in chicken. // *Indian J. Poult. Sci.* 2013. Vol. 48. nr 1. P. 122–125.
29. Pilecka I., Whatmore A. et al. Growth hormone signalling: sprouting links between pathways, human genetics and therapeutic options. // *Trends Endocrinol. Metab.* 2007. Vol. 18. nr 1. P. 12–18. DOI: 10.1016/j.tem.2006.11.004

30. Ru M., Liang H., Ruan J. et al. 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
31. Smekalova A., Lebedeva I., Parvizi N., Grossmann R. Plasma levels of growth hormone in laying hens in relation to developmental and hormonal factors. // *J. Anim. Sci.* 2019. Vol. 97. Suppl. 3. P. 367–368. DOI: 10.1093/jas/skz258.733
32. Socha J.K., Hrabia A. Response of the chicken ovary to GH treatment during a pause in laying induced by fasting. // *Domest. Anim. Endocrinol.* 2019. Vol. 69. P. 84-95. DOI: 10.1016/j.domaniend.2019.05.001
33. Williams J., Harvey S., Leclercq B. Plasma levels of luteinizing hormone, growth hormone, and estradiol from six weeks of age to sexual maturity in two lines of chickens selected for low or high abdominal fat content. // *Poult. Sci.* 1986. Vol. 65. nr 9. P. 1782–1786. DOI: 10.3382/ps.0651782

References (for publications in Russian)

1. Smekalova A.A., Lebedeva I.Yu. [The role of somatotrophic hormone in the endocrine and local control of reproductive function in the domestic hen (*Gallus domesticus* L.): a review]. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya (Agricultural Biology)*. 2024. 59(6): 1076-1090. DOI: 10.15389/agrobiology.2024.6.1076eng
2. Smekalova A.A., Mityashova O.S., Aleinikova O.V., Montvila E.K., Lebedeva I.Yu. [Modulating effect of growth hormone on the functional state of cultured cells from hen preovulatory follicles]. *Genetika i razvedenie zhivotnykh (Animal genetics and breeding)*. 2021. 4: 108-113. DOI: 10.31043/2410-2733-2021-4-108-113

UDC 636.5:612.621:612.018.2

***In vitro* effects of growth hormone on the functional state of granulosa and theca cells from preovulatory follicles in young and reproductively aged chickens aged hens**

Smekalova A.A., Lebedeva I.Yu.

*Federal Research Center for Animal Husbandry, Ernst VIZh,
Podolsk-Dubrovitsy, Moscow oblast, Russian Federation*

ABSTRACT. Growth hormone (GH) is a positive regulator of reproductive function in birds; however, its role in ovarian aging remains unclear. The aim of this study was to comparatively investigate the *in vitro* effects of GH on the proliferative activity and apoptotic changes in granulosa and theca cells from preovulatory follicles of hens during the period of peak egg production intensity and during its subsequent decline. Two groups of Hisex White laying hens were used in the experiments: young hens aged 27-32 weeks with long egg-laying cycles (LEC) and reproductively aged hens aged 71-97 weeks with short egg-laying cycles (SEC). Cells were isolated from the most mature preovulatory follicle F1, ovulating in the current cycle, and the next largest F2, and cultured for 24 h in the absence (control) or presence of recombinant hens' GH (25 ng/ml). Proliferative activity and apoptotic changes were assessed by immunocytochemistry based on the expression level of the proliferation marker PCNA and the pro-apoptotic protein Bax. The study was performed in 8-9 replicates. Growth hormone increased ($p < 0.01-0.05$) the proportion of PCNA-positive granulosa and thecal cells in birds of both compared groups, while in PDC hens this effect was less pronounced in cells from the F2 follicle. GH decreased ($P < 0.01-0.05$) the expression of the pro-apoptotic protein Bax in granulosa cells from F1 and F2 follicles in the MDC group and did not affect its expression in the PDC group. At the same time, GH increased ($P < 0.01$) the proportion of Bax-positive theca cells from F1 and F2 follicles, but only in PDC hens. Thus, during the process of reproductive aging, the sensitivity of follicular cells to the growth-stimulating effect of GH decreases, especially in cells from F2 follicles, and resistance to the apoptosis-modulating effect of the hormone is acquired.

Keywords: *laying hens, growth hormone, preovulatory follicles, granulosa cells, theca cells, in vitro proliferation, apoptosis, reproductive aging.*

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh (Productive Animal Biology). 2025, 4: 65-73.

Поступило в редакцию:

Получено после доработки

Сведения об авторах

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

Лебедева Ирина Юрьевна, д.б.н., г.н.с., зав. лаб.: irladv@mail.ru