

И. Ю. Лебедева, А. А. Смекалова, Е. К. Монтвила, О. В. Алейникова

Влияние возраста на секреторную активность разных слоев преовуляторных фолликулов у кур-несушек

Аннотация. Возрастное ухудшение фертильности женских особей связано главным образом со снижением количества и качества овариальных фолликулов, что приводит, в свою очередь, к различным эндокринным нарушениям. В представленной работе изучали *in vitro* стероидогенную активность слоев теки и гранулезы из преовуляторных фолликулов кур-несушек разного возраста. В экспериментах использовали молодых кур в возрасте 32–33 недель с длинным циклом яйцекладки и постаревших птиц в возрасте 74–76 недель с коротким циклом яйцекладки. Гранулезный и текальный слой выделяли из двух самых больших преовуляторных фолликулов F1 и F2 и культивировали отдельно в течение 18 ч. После культивирования в средах определяли концентрацию половых стероидных гормонов методом ИФА. Продукция прогестерона гранулезным слоем была в 1,5–2,0 раза выше у репродуктивно постаревших несушек, чем у молодых кур. При этом секреторная активность клеток гранулезы повышалась с развитием фолликулов от стадии F2 до стадии F1 только у возрастных птиц (с $74,0 \pm 7,5$ до $97,0 \pm 10,9$ пмоль/мг ткани, $P < 0,05$). Кроме того, продукция тестостерона текальным слоем у постаревших кур в 2,0–2,8 раза превышала таковую у молодых кур, но не изменялась существенно с ростом фолликулов у птиц обеих групп. В то же время способность клеток теки секретировать эстрадиол-17 β была в 1,6–2,3 раза ниже ($P < 0,001$) в фолликулах F1, чем в F2 независимо от возраста птиц. Полученные данные показывают, что процессы, связанные со старением яичника, модулируют стероидогенную активность фолликулярных клеток у кур-несушек, причем возрастное сокращение цикла яйцекладки сопряжено с повышением базальной продукции прогестерона и тестостерона в двух самых больших преовуляторных фолликулах.

Ключевые слова: куры-несушки, цикл яйцекладки, старение яичника, преовуляторные фолликулы, гранулеза, тека, половые стероидные гормоны.

Авторы:

Лебедева Ирина Юрьевна — доктор биологических наук; e-mail: irledv@mail.ru;

Смекалова Араксия Ашотовна — младший научный сотрудник; e-mail: araksia86@mail.ru;

Монтвила Елена Кястучо — младший научный сотрудник; e-mail: montvila94@bk.ru;

Алейникова Ольга Викторовна — младший научный сотрудник; e-mail: 68ovk@mail.ru.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»; 142132, Россия, Московская область, городской округ Подольск, поселок Дубровицы, д. 60.

Введение. Яичник кур-несушек содержит пул преовуляторных фолликулов, состоящий из 5–7 больших желтых фолликулов (больше 8 мм в диаметре), избежавших атрезии и различающихся по размеру и стадии созревания. Постоянное пополнение этого пула путем селекции малых фолликулов, а также выстраивание преовуляторных фолликулов в так называемую «иерархию» по степени зрелости позволяют им последовательно овулировать в течение длительного периода [1]. В этой связи яичник курицы представляет удоб-

ную модель для детального изучения фолликулогенеза у птиц.

У кур, по сравнению с млекопитающими, гормональная регуляция фолликулогенеза имеет ряд особенностей, касающихся в первую очередь стероидогенной функции структурных элементов овариальных фолликулов. Клетки гранулезы кур не обладают ароматазной активностью и продуцируют главным образом прогестерон [2], хотя у млекопитающих они являются основным источником эстрогенов [3]. Синтез андрогенов осуществляет-

ся интерстициальными клетками теки «интерна», а ароматазные клетки, секретирующие эстрогены, входят в состав теки «экстерна» [4]. Ароматазная активность текальных клеток падает в процессе созревания фолликулов кур [2, 5], тогда как в доминантных фолликулах млекопитающих достигается максимальный уровень секреции эстрогенов [3]. Способность клеток теки продуцировать андрогены также снижается у кур в двух самых зрелых фолликулах [4, 5]. Секреция прогестерона, наоборот, положительно связана со степенью созревания преовуляторных фолликулов [2, 6]. Кроме того, стероидогенная активность фолликулярных клеток существенно варьирует в течение овуляторного цикла [6].

Как известно, с возрастом репродуктивный потенциал самок постепенно ухудшается, что обусловлено снижением количества и качества овариальных фолликулов, что, в свою очередь, приводит к различным эндокринным нарушениям [7]. У кур-несушек процессы старения яичника инициируются уже через 65–70 недель жизни [8]. Это приводит к снижению интенсивности яйцекладки, связанному с увеличением интервала между овуляциями и, как следствие, сокращением цикла яйцекладки, а также с повышением частоты ановуляторных циклов [8, 9]. Однако до сих пор не ясно, какие именно эндокринные расстройства сопряжены с разными возрастными нарушениями функциональной активности яичника кур.

Цель исследований — сравнительное изучение *in vitro* стероидогенной активности слоев теки и гранулезы из преовуляторных фолликулов с разной степенью зрелости у молодых и репродуктивно постаревших кур-несушек.

Материалы и методы. Исследования проводили на курах Хайсекс Уайт в возрасте 32–33 недель с длинным циклом яйцекладки (несущих непрерывно не менее 10 яиц) и в возрасте 74–76 недель с коротким циклом яйцекладки (несущих 2–6 яиц на цикл). Птиц содержали в отдельных клетках в условиях 12-часового освещения в сутки. Для экспериментов отобрали 8 молодых и 9 репродуктивно постаревших кур. Время снесения яиц контролировали в течение 2–3 циклов яйцекладки с помощью видеосистемы. Время овуляции рассчитывали, исходя из того, что она происходит через 30 мин после снесения яйца [10]. Овариэктомию кур проводили через 7 ч после овуляции для синхронизации стероидогенной активности фолликулов у разных птиц. Все эксперименты с животными выполняли в соответствии с принципами, изложенными в Хельсинской декларации (World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research in-

volving human subjects, 1964–2013), и требованиях надлежащей лабораторной практики (ГОСТ 33215–2014).

После овариэктомии кур яичники промывали в стерильном физиологическом растворе, содержащем 100 мкг/мл гентамицина. Для исследований использовали два самых больших желтых фолликула, которые на основании общепринятой классификации соответствуют категориям F1 и F2 (рис. 1), где F1 — самый большой фолликул, овулирующий в текущем цикле, и F2 — второй по размеру фолликул, овулирующий в следующем цикле [11]. Слои теки и гранулезы выделяли согласно методу А.В. Gilbert и соавт. [11] и отмывали от желтка в стерильном фосфатно-солевом растворе Дюльбекко, содержащем 50 мкг/мл гентамицина.

Эксплантаты текального и гранулезного слоев инкубировали отдельно в 1 мл среды в течение 18 ч при 39°C в атмосфере с 5% CO₂ и 90%-ной влажностью. Для культивирования использовали 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 инкубации теки в среду добавляли 5 нг/мл прогестерона в качестве субстрата для синтеза тестостерона. После культивирования эксплантаты фолликулярных слоев слегка подсушивали с помощью фильтровальной бумаги и взвешивали. Среда центрифугировали при 400 g в течение 10 мин, замораживали и хранили при -30°C. Концентрации соответствующих половых стероидных гормонов в средах измеряли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием планшетного спектрофотометра Униплан («Пикон», Россия) и коммерческих наборов реагентов ООО «Хема» (Россия). Чувствительность метода составляла: 0,25 нмоль/л (прогестерон), 0,025 нмоль/л (эстрадиол-17β), 0,15 нмоль/л (тестостерон). Все образцы анализировали в двух повторностях, коэффициент вариации не превышал 16%.

Полученные результаты обрабатывали методом однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями при

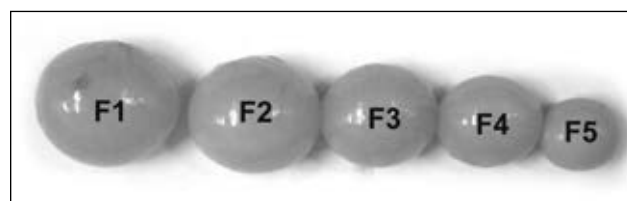


Рис. 1. Категории фолликулов в преовуляторной иерархии у кур-несушек

помощи программы SigmaStat (Systat Software, Inc.) и выражали как средние значения $\pm$ стандартные ошибки. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с использованием критерия Тьюки.

Результаты и обсуждение. При проведении исследований были учтены известные особенности стероидогенеза у кур [2, 4]. В средах, кондиционированных слоем гранулезы, определяли содержание прогестерона, а в средах, кондиционированных слоем теки — содержание тестостерона и эстрадиола-17 β .

Секреторная активность фолликулярных клеток различалась у кур разного возраста и репро-

дуктивного статуса. Продукция прогестерона гранулезным слоем фолликулов F1 была в 2,0 раза выше ($97,0 \pm 10,9$ против $49,7 \pm 8,3$ пмоль/мг ткани, $P < 0,001$) у репродуктивно постаревших несушек, чем у молодых кур (рис. 2, А). Сходная тенденция к возрастанию (в 1,5 раза, $P < 0,1$) наблюдалась и в случае фолликулов F2. При этом способность клеток гранулезы синтезировать прогестерон повышалась с развитием фолликулов от стадии F2 до стадии F1 только у возрастных птиц (с $74,0 \pm 7,5$ до $97,0 \pm 10,9$ пмоль/мг ткани, $P < 0,05$).

Продукция тестостерона текальным слоем фолликулов F1 и F2 у постаревших кур в 2,0–2,8 раза ($P < 0,05$) превышала таковую у молодых кур (рис. 2, Б). В то же время эта продукция не изменялась существенно с ростом преовуляторных фолликулов у птиц обеих групп. Напротив, способность клеток теки секретировать эстрадиол-17 β была в 1,6–2,3 раза ниже ($P < 0,001$) в фолликулах F1, чем в F2 независимо от возраста птиц (рис. 2, В).

Повышение продукции тестостерона текой преовуляторных фолликулов, обнаруженное у возрастных кур с коротким циклом яйцекладки, было, вероятно, первичным эндокринным изменением. Высокие уровни тестостерона также встречаются при старении яичника у млекопитающих [12]. Ранее было показано долговременное стимулирующее действие тестостерона на секрецию прогестерона клетками гранулезы кур [13]. Поэтому прижизненная повышенная продукция тестостерона в преовуляторных фолликулах постаревших несушек могла обуславливать возрастание способности гранулезного слоя секретировать прогестерон.

Высокая продукция тестостерона, служащего субстратом для синтеза эстрадиола-17 β [2], не вызывала возрастания секреции последнего клетками теки. Это указывает на пониженную активность ароматазы цитохрома P450 в яичнике постаревших кур, по крайней мере, в двух самых больших преовуляторных фолликулах. Следовательно, одинаковая секреция эстрадиола-17 β текой молодых и возрастных несушек при разной секреции тестостерона была, очевидно, следствием пониженной конверсии тестостерона в эстрадиол-17 β . В пользу такого предположения свидетельствуют данные корреляционного анализа, которые показали наличие позитивной связи между продукцией тестостерона и эстрадиола-17 β текальным слоем преовуляторных фолликулов только у молодых кур ($r = 0,62$, $P < 0,01$).

Заключение. Полученные данные показывают, что процессы, связанные со старением яичника, модулируют стероидогенную активность фолликулярных клеток у кур-несушек. При этом

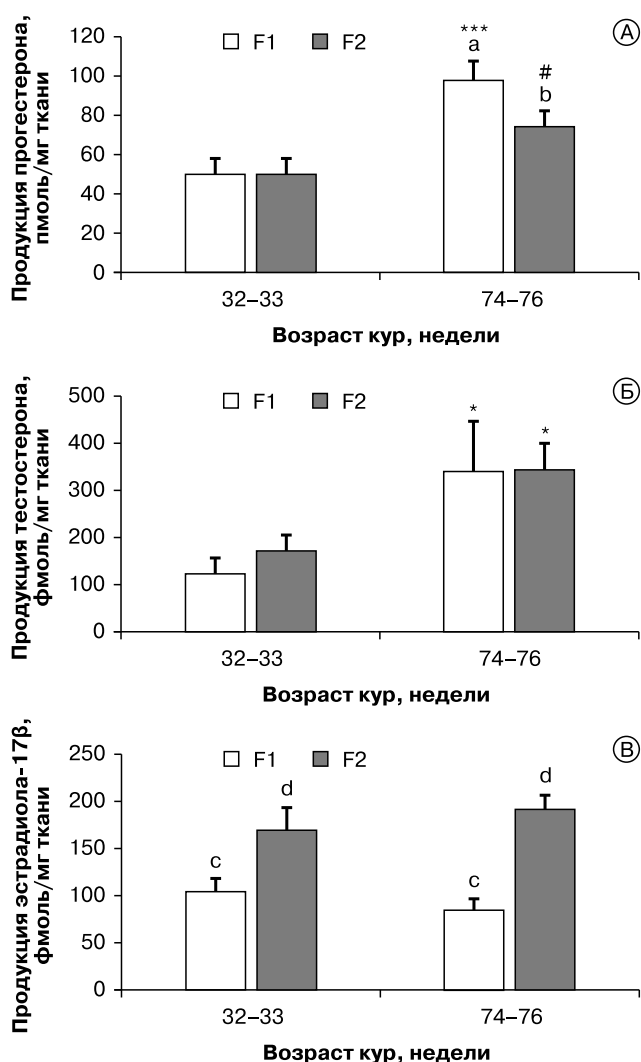


Рис. 2. Продукция половых стероидных гормонов при раздельном культивировании эксплантатов слоя гранулезы и теки из преовуляторных фолликулов F1 и F2.

А: продукция прогестерона гранулезным слоем,

Б: продукция тестостерона текальным слоем,

В: продукция эстрадиола-17 β текальным слоем.

Различия между F1 и F2 фолликулом: ^{a,b} $P < 0,05$; ^{c,d} $P < 0,001$.

Различия между молодыми и старыми курами: [#] $P < 0,1$;

* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$

возрастное сокращение цикла яйцекладки сопряжено с повышением базальной продукции прогестерона и тестостерона в двух самых больших преовуляторных фолликулах.

Работа выполнена по государственному заданию (рег. ЦИТиС № АААА-А18-118021990006-9)

Литература

1. Johnson P. A. Follicle selection in the avian ovary / J. R. Johnson // *Reprod. Domest. Anim.* — 2012. — V. 47. — Suppl. 4. — P. 283–287.
2. Sechman A. The role of thyroid hormones in regulation of chicken ovarian steroidogenesis / A. Sechman // *Gen. Comp. Endocrinol.* — 2013. — V. 190. — P. 68–75.
3. Damdimopoulou P. Retinoic acid signaling in ovarian folliculogenesis and steroidogenesis / P. Damdimopoulou, C. Chiang, J. A. Flaws // *Reprod Toxicol.* — 2019. — V. 87. — P. 32–41.
4. Rangel P. L. Reproduction in hens: is testosterone necessary for the ovulatory process? / P. L. Rangel, C. G. Gutierrez // *Gen. Comp. Endocrinol.* — 2014. — V. 203. — P. 250–261.
5. Hernandez-Vertiz A. Morphological changes in the thecal layer during the maturation of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl / A. Hernandez-Vertiz, M. Gonzalez del Pliego, P. Velazquez, E. Pedernera // *Gen. Comp. Endocrinol.* — 1993. — V. 92. — P. 80–87.
6. Etches R. J. Progesterone, androstenedione and estradiol content of theca and granulosa tissues of the four largest ovarian follicles during the ovulatory cycle of the hen (*Gallus domesticus*) / R. J. Etches, C. E. Duke // *J. Endocrinol.* — 1984. — V. 103. — P. 71–76.
7. Ottinger M. A. Mechanisms of reproductive aging: conserved mechanisms and environmental factors / M. A. Ottinger // *Ann. NY Acad. Sci.* — 2010. — V. 1204. — P. 73–81.
8. Lillpers K. Age-dependent changes in oviposition pattern and egg production traits in the domestic hen / K. Lillpers, M. Wilhelmson // *Poult. Sci.* — 1993. — V. 72. — P. 2005–2011.
9. Lebedeva I. Y. Age-dependent role of steroids in the regulation of growth of the hen follicular wall / I. Y. Lebedeva, V. A. Lebedev, R. Grossmann, N. Parvizi // *Reprod. Biol. Endocrinol.* — 2010. — V. 8. — P. 15.
10. Etches R. J. Changes in the plasma concentrations of luteinizing hormone, progesterone, oestradiol and testosterone and in the binding of follicle-stimulating hormone to the theca of follicles during the ovulatory cycle of the hen (*Gallus domesticus*) / R. J. Etches, K. W. Cheng // *J. Endocrinol.* — 1981. — V. 91. — P. 11–22.
11. Gilbert A. B. A method for separating the granulosa cells, the basal lamina and the theca of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*) / A. B. Gilbert, A. J. Evans, M. M. Perry, M. H. Davidson // *J. Reprod. Fertil.* — 1977. — V. 50. — P. 179–181.
12. Park J. H. Polycystic ovary syndrome (PCOS)-like phenotypes in the d-galactose-induced aging mouse model / J. H. Park, T. S. Choi // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2012. — V. 427. — P. 701–704.
13. Caicedo Rivas R. E. Effects of steroid hormone in avian follicles / R. E. Caicedo Rivas, M. P. Nieto, Kamiyoshi // *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* — 2016. — V. 29. — P. 487–99.

Lebedeva I., Smekalova A., Montvila E., Aleinikova O.

Effect of age on the secretory activity of different layers of preovulatory follicles in laying hens

Abstract. *Age-related deterioration in female fertility is mainly associated with a decrease in the number and quality of ovarian follicles, which, in turn, leads to various endocrine disorders. In the present work, the steroidogenic activity of theca and granulosa layers from preovulatory follicles of laying hens of different ages was studied in vitro. Young hens aged 32–33 weeks with a long egg clutch and hens aged 74–76 weeks with a short egg clutch were used in the experiments. The granulosa and theca layers were isolated from the two largest preovulatory follicles F1 and F2 and cultured separately for 18 h. After culture, the concentration of sex steroid*

hormones in the media was determined by ELISA. The production of progesterone by the granulosa layer was 1.5–2.0 times higher in reproductively aged layers than in young layers. Concurrently, the secretory activity of granulosa cells increased with the development of follicles from the F2 stage to the F1 stage only in aged birds (from 74.0±7.5 to 97.0±10.9 pmol/mg tissue, $P<0.05$). Furthermore, testosterone production by the theca layer in aged hens was 2.0–2.8 times higher than that in young hens, but did not change significantly with the growth of follicles in birds of both groups. At the same time the ability of theca cells to secrete estradiol-17 β was 1.6–2.3 times lower ($P<0.001$) in F1 than in F2 follicles, regardless of the age of the birds. The findings indicate that the processes associated with ovarian aging modulate the steroidogenic activity of follicular cells in laying hens, with the age-related reduction in the egg clutch being related to an increase in the basal production of progesterone and testosterone in the two largest preovulatory follicles.

Keywords: laying hens, egg clutch, ovarian aging, preovulatory follicles, granulosa, theca, sex steroid hormones.

Authors:

Lebedeva I. — Dr. Habil. (Biol. Sci.); e-mail: irledv@mail.ru;

Smekalova A. — Junior researcher; e-mail: araksia86@mail.ru;

Montvila E. — Junior researcher; e-mail: montvila94@bk.ru;

Aleinikova O. — Junior researcher; e-mail: 68ovk@mail.ru.

L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry; 142132, Russia, Podolsk Municipal District, Moscow Region, Dubrovitsy, 60.

References

1. Johnson P. A. Follicle selection in the avian ovary / J. R. Johnson // *Reprod. Domest. Anim.* — 2012. — V. 47. — Suppl. 4. — P. 283–287.
2. Sechman A. The role of thyroid hormones in regulation of chicken ovarian steroidogenesis / A. Sechman // *Gen. Comp. Endocrinol.* — 2013. — V. 190. — P. 68–75.
3. Damdimopoulou P. Retinoic acid signaling in ovarian folliculogenesis and steroidogenesis / P. Damdimopoulou, C. Chiang, J. A. Flaws // *Reprod. Toxicol.* — 2019. — V. 87. — P. 32–41.
4. Rangel P. L. Reproduction in hens: is testosterone necessary for the ovulatory process? / P. L. Rangel, C. G. Gutierrez // *Gen. Comp. Endocrinol.* — 2014. — V. 203. — P. 250–261.
5. Hernandez-Vertiz A. Morphological changes in the thecal layer during the maturation of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl / A. Hernandez-Vertiz, M. Gonzalez del Pliego, P. Velazquez, E. Pedernera // *Gen. Comp. Endocrinol.* — 1993. — V. 92. — P. 80–87.
6. Etches R. J. Progesterone, androstenedione and estradiol content of theca and granulosa tissues of the four largest ovarian follicles during the ovulatory cycle of the hen (*Gallus domesticus*) / R. J. Etches, C. E. Duke // *J. Endocrinol.* — 1984. — V. 103. — P. 71–76.
7. Ottinger M. A. Mechanisms of reproductive aging: conserved mechanisms and environmental factors / M. A. Ottinger // *Ann. NY Acad. Sci.* — 2010. — V. 1204. — P. 73–81.
8. Lillpers K. Age-dependent changes in oviposition pattern and egg production traits in the domestic hen / K. Lillpers, M. Wilhelmson // *Poult. Sci.* — 1993. — V. 72. — P. 2005–2011.
9. Lebedeva I. Y. Age-dependent role of steroids in the regulation of growth of the hen follicular wall / I. Y. Lebedeva, V. A. Lebedev, R. Grossmann, N. Parvizi // *Reprod. Biol. Endocrinol.* — 2010. — V. 8. — P. 15.
10. Etches R. J. Changes in the plasma concentrations of luteinizing hormone, progesterone, oestradiol and testosterone and in the binding of follicle-stimulating hormone to the theca of follicles during the ovulatory cycle of the hen (*Gallus domesticus*) / R. J. Etches, K. W. Cheng // *J. Endocrinol.* — 1981. — V. 91. — P. 11–22.
11. Gilbert A. B. A method for separating the granulosa cells, the basal lamina and the theca of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*) / A. B. Gilbert, A. J. Evans, M. M. Perry, M. H. Davidson // *J. Reprod. Fertil.* — 1977. — V. 50. — P. 179–181.
12. Park J. H. Polycystic ovary syndrome (PCOS)-like phenotypes in the d-galactose-induced aging mouse model / J. H. Park, T. S. Choi // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2012. — V. 427. — P. 701–704.
13. Caicedo Rivas R. E. Effects of steroid hormone in avian follicles / R. E. Caicedo Rivas, M. P. Nieto, Kamiyoshi // *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* — 2016. — V. 29. — P. 487–99.