

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

Модулирующее действие соматотропного гормона на функциональное состояние культивируемых клеток из преовуляторных фолликулов кур

Аннотация.

Соматотропный гормон (СТГ) является важным позитивным модулятором функции яичников у млекопитающих. Локальная продукция СТГ и экспрессия соответствующих специфических рецепторов были выявлены и в овариальных фолликулах кур, что указывает на участие этого гормона в эндокринном/паракринном контроле фолликулогенеза у птиц. Тем не менее роль СТГ в регуляции роста фолликулов птиц на завершающей стадии созревания до сих пор не ясна.

Цель: изучить *in vitro* влияние СТГ на пролиферативную активность и апоптотические изменения клеток гранулезы и теки из преовуляторных фолликулов домашних кур.

Материалы и методы. В экспериментах использовали молодых кур-несушек в возрасте 34–35 недель с длинным циклом яйцекладки. Клетки гранулезы и теки выделяли из самого большого желтого фолликула в иерархии (F1). Культивирование клеток проводили в среде, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, до образования монослоя, а затем в течение 24 ч — в среде без сыворотки в отсутствие (контроль) или в присутствии СТГ в различных концентрациях (1–100 нг/мл). Пролиферативную активность и апоптотические изменения в клетках оценивали методом иммуноцитохимического анализа на основании уровня экспрессии ядерного антигена пролиферирующих клеток PCNA и проапоптотического белка Вах, соответственно.

Результаты. Доля PCNA-позитивных клеток гранулезы возрастала по сравнению с контролем в 1,3–1,8 раза ($P < 0,01–0,05$) при повышении содержания СТГ в среде до 10–100 нг/мл. Кроме того, в этом диапазоне концентраций исследуемый гормон снижал в 1,2–1,6 раза ($P < 0,05$) относительное число гранулезных клеток с положительной реакцией на Вах. Чувствительность клеток теки к ростостимулирующему влиянию СТГ была ниже, чем у клеток гранулезы. Такое действие СТГ приводило к увеличению доли PCNA-позитивных текальных клеток в 1,2–1,3 раза ($P < 0,05$) и было выявлено только при концентрациях 25 и 100 нг/мл. При этом СТГ (25–100 нг/мл) повышал в 1,3 раза ($P < 0,05$) уровень экспрессии Вах в клетках теки.

Заключение. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о стимулирующем влиянии СТГ *in vitro* на пролиферативную активность клеток гранулезы и теки из самого зрелого преовуляторного фолликула кур. Кроме того, СТГ способен снижать экспрессию проапоптотического белка Вах в гранулезных клетках и повышать эту экспрессию в текальных клетках. Таким образом, полученные данные указывают на возможное участие СТГ в регуляции роста и развития фолликулов на завершающей стадии созревания в период максимальной интенсивности яйцекладки у кур-несушек.

Ключевые слова: куры-несушки, соматотропный гормон, преовуляторные фолликулы, клетки гранулезы, клетки теки, пролиферация, апоптоз.

Авторы:

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

Митяшова Ольга Сергеевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник; e-mail: mityashova_o@mail.ru;

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

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

Лебедева Ирина Юрьевна — доктор биологических наук, главный научный сотрудник, зав. лабораторией; e-mail: irledv@mail.ru.

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

Введение. Соматотропный гормон (СТГ) является важным позитивным модулятором функции яичников у млекопитающих [1]. Соматотропные рецепторы и их мРНК обнаружены не только в овариальных фолликулах млекопитающих [2, 3], но и птиц [4, 5], что свидетельствует о влиянии этого гормона на фолликулогенез у данного класса позвоночных. При этом СТГ рассматривается не только как эндокринный, но и как паракринный/аутокринный регуляторный фактор [6] вследствие его локальной продукции в яичнике домашней курицы [5, 7].

Имеющаяся в литературе информация указывает на участие СТГ в контроле роста и развития фолликулов у птиц [8]. Сообщалось, что многократная обработка кур соматотропином перед половым созреванием приводит к преждевременному появлению в яичнике больших желтых фолликулов благодаря стимуляции процесса селекции малых фолликулов в иерархию преовуляторных фолликулов [8, 9]. Такое действие СТГ, вероятно, достигается путем модуляции пролиферативной и стероидогенной активности, а также апоптоза овариальных клеток в белых и желтоватых фолликулах. Кроме того, повышение содержания прогестерона и эстрадиола в яичнике кур в ответ на инъекции СТГ [9] предполагает наличие чувствительности к воздействию гормона и у гранулезного, и у текального слоя.

Исследования *in vitro* также показали стимулирующее влияние как экзогенного, так и локально продуцируемого СТГ на пролиферацию и выживание клеток гранулезы кур из малых овариальных фолликулов диаметром 3–10 мм [10]. Это влияние гормона было связано с активацией митоген-активируемой протеинкиназы ERK 1/2 и могло опосредоваться путем индукции синтеза и секреции инсулиноподобного фактора роста 1 в гранулезных клетках.

Присутствие рецепторов СТГ и его локальная продукция в преовуляторных фолликулах кур [4, 5] свидетельствуют о гормональном участии в регуляции не только ранних, но и терминальных стадий фолликулогенеза. С этим предположением согласуются данные о стимулирующем влиянии СТГ на продукцию прогестерона и экспрессию стероидогенного фермента P450_{ssc} в культуре клеток гранулезы из преовуляторных фолликулов [5]. Тем не менее роль СТГ в регуляции роста овариальных фолликулов на завершающей стадии созревания до сих пор не ясна.

Целью исследования было изучить *in vitro* влияние СТГ на пролиферативную активность и апоптотические изменения клеток гранулезы и теки из преовуляторных фолликулов домашних кур.

Материалы и методы. В экспериментах использовали кур-несушек породы Хайсекс Уайт с длинным циклом яйцекладки в возрасте 34–35 недель (период максимальной интенсивности яйцекладки). Птицы находились в условиях раздельного содержания в клетках и 12-часового освещения в сутки. Время яйцекладки контролировали с помощью видеосистемы. С целью синхронизации стероидогенной активности фолликулов у разных птиц овариэктомии последних проводили через 7 ч после снесения яйца. Все эксперименты с животными выполняли в соответствии с принципами, изложенными в Хельсинской декларации (World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects, 1964–2013), и требованиями надлежащей лабораторной практики (ГОСТ 33215–2014).

Клетки гранулезы и теки выделяли из соответствующих слоев самого большого желтого фолликула в иерархии (F1) согласно методике, описанной ранее [11]. Предварительно, из гранулезного слоя удаляли часть, прилегающую к зародышевому диску. Культивирование клеток проводили в чашках Петри на покровных стеклах в среде DMEM, содержащей 25 мМ HEPES, 1 г/л глюкозы, 1 мМ глутамина, 10 мл/л раствора антибиотика-антимикотика (все — Sigma-Aldrich, США) и 10% фетальной бычьей сыворотки (Hyclone, США). После образования монослоя среду заменяли на свежую среду без сыворотки и культивировали клетки в течение 24 ч в отсутствие (контроль) или в присутствии рекомбинантного СТГ кур (ProSpec, Израиль) в различных концентрациях (1–100 нг/мл).

После культивирования клетки фиксировали 2%-ным раствором параформальдегида и пермеабилizировали 0,2%-ным раствором Тритона X-100. Неспецифическое связывание иммуноглобулинов блокировали путем обработки клеток 10%-ным раствором нормальной лошадиной сыворотки (Abscam, Великобритания). Образцы инкубировали с первичными мышиными антителами к ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA, Dako, США) или к проапоптотическому белку Bax (Bio-Rad, США) при 4°C в течение 18 ч и затем — со вторыми биотинилированными антителами (лошадиными антимышинными иммуноглобулинами; Vector Laboratories, Inc., США) при комнатной температуре в течение 30 мин. Для визуализации специфического связывания применяли Vectastain ABC reagent и коричневый хромофор DAB (Vector Laboratories, Inc., США). Долю PCNA- и Bax-позитивных клеток оценивали по числу клеток, окрашенных в коричневый цвет (рис. 1).

Эксперименты по культивированию клеток проводили в 4 независимых повторностях. В каждом независимом эксперименте были использованы клетки, выделенные у одной курицы. Полученные результаты обрабатывали методом однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями при помощи программы SigmaStat 4.0 (Systat Software, Inc.) и выражали как средние значения $\pm$ стандартные ошибки. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с использованием критерия Тьюки.

Результаты и обсуждение. Пролиферативную активность и апоптотические изменения в фолликулярных клетках оценивали методом иммуноцитохимического анализа на основании уровня экспрессии ядерного антигена пролиферирующих клеток PCNA и проапоптотического белка Вах, соответственно.

Не обнаружено существенного влияния СТГ в низких концентрациях на пролиферацию и апоптоз клеток гранулезы в культуре (рис. 2). Доля PCNA-позитивных клеток возрастала по сравнению с контролем в 1,3–1,8 раза ($P < 0,01-0,05$) при повышении содержания этого гормона в среде до 10–100 нг/мл (рис. 2, А). Кроме того, в этом

диапазоне концентраций СТГ снижал в 1,2–1,6 раза ($P < 0,05$) относительное число гранулезных клеток с положительной реакцией на Вах (рис. 2, Б).

Чувствительность клеток теки к ростостимулирующему влиянию СТГ была ниже, чем у клеток гранулезы (рис. 3, А). Такое действие гормона приводило к увеличению доли PCNA-позитивных клеток в 1,2–1,3 раза ($P < 0,05$) и было выявлено только при концентрациях 25 и 100 нг/мл. В то же время СТГ в высокой концентрации оказывал позитивное влияние на экспрессию маркера апоптоза Вах в текальных клетках. При этом СТГ (25–100 нг/мл) повышал в 1,3 раза ($P < 0,05$) долю клеток теки с положительной реакцией на Вах (рис. 3, Б).

В работе Hrabia и соавт. [9] не было обнаружено изменения пролиферативной активности и интенсивности апоптотических процессов в стенке преовуляторных фолликулов при введении экзогенного СТГ курам за 1–3 недели до и во время полового созревания, несмотря на экспрессию специфических гормональных рецепторов в соответствующих овариальных компартментах [7]. Однако в нашем исследовании, в период максимальной интенсивности яйцекладки у кур-несушек, СТГ

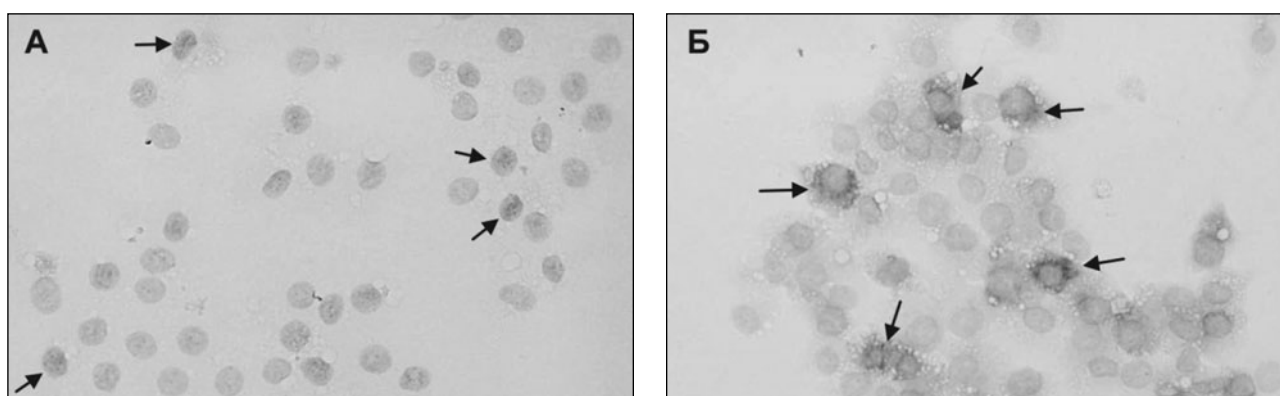


Рис. 1. Иммуноцитохимический анализ экспрессии маркера пролиферации PCNA (А) и маркера апоптоза Вах (Б) в культуре клеток гранулезы кур. Стрелками показано позитивное окрашивание ядер на PCNA и цитоплазмы на Вах

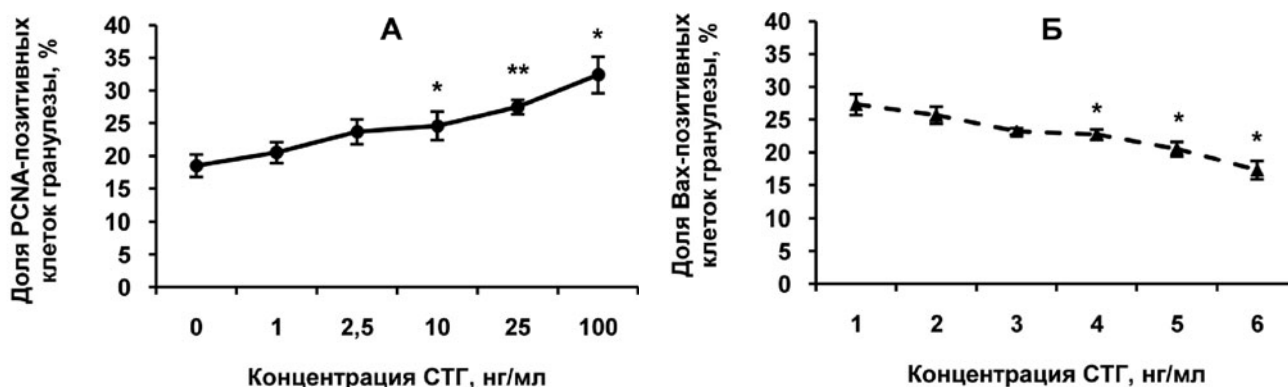


Рис. 2. Экспрессия маркера пролиферации PCNA (А) и маркера апоптоза Вах (Б) в культивируемых клетках гранулезы кур из преовуляторного фолликула F1 в присутствии соматотропного гормона (СТГ) в различных концентрациях. Достоверные различия по сравнению с контролем (0 нг/мл СТГ): * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

был способен стимулировать *in vitro* пролиферацию не только клеток гранулезы, но и клеток теки, аналогично его влиянию на фолликулярные клетки у млекопитающих [12]. Это свидетельствует о том, что внутриклеточная сигнальная система, отвечающая за ростостимулирующее действие данного гормона, и/или ее сопряжение с соматотропными рецепторами адекватно формируются в преовуляторных фолликулах уже после полового созревания кур. Также нами был продемонстрирован более выраженный пролиферативный ответ на воздействие СТГ у клеток гранулезы, чем у клеток теки, что согласуется с более интенсивной экспрессией соматотропных рецепторов в гранулезном слое кур [8].

В нашем исследовании СТГ оказывал разнонаправленное влияние на экспрессию маркера апоптоза Вах в клетках теки и гранулезы. Антиапоптотическое действие гормона на клетки гранулезы кур из фолликулов F1 было сходно с его

действием на гранулезные клетки из преовуляторных фолликулов млекопитающих [13]. В то же время стимулирующее влияние СТГ на экспрессию Вах в клетках теки указывает на разный механизм действия гормона на апоптотические изменения в фолликулярных клетках разного типа.

Заключение. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о стимулирующем влиянии СТГ *in vitro* на пролиферативную активность клеток гранулезы и теки из самого зрелого преовуляторного фолликула кур. При этом чувствительность к ростостимулирующему влиянию СТГ у клеток гранулезы выше, чем у клеток теки. Кроме того, СТГ способен снижать экспрессию проапоптотического белка Вах в гранулезных клетках и повышать эту экспрессию в текальных клетках. Таким образом, полученные данные указывают на возможное участие СТГ в регуляции роста и развития фолликулов на завершающей стадии созревания в период максимальной интенсивности яйцекладки у кур-несушек.

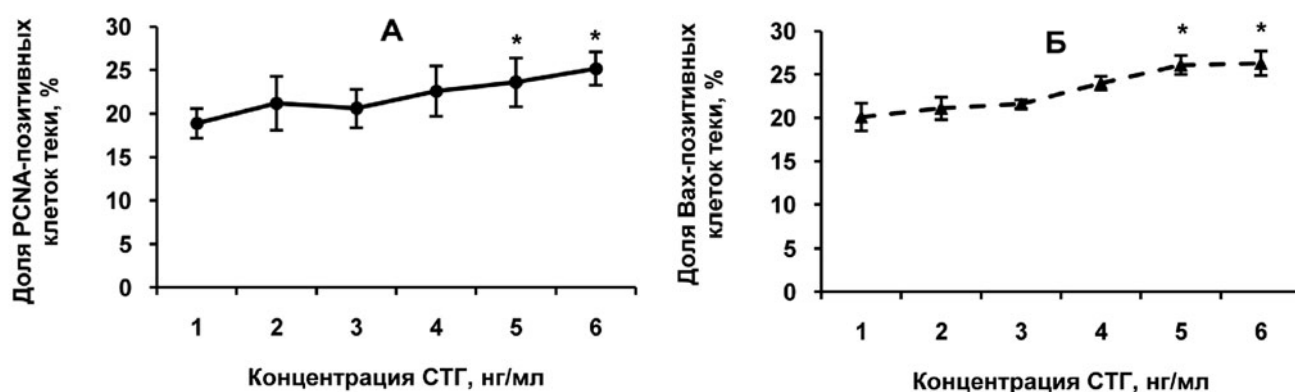


Рис. 3. Экспрессия маркера пролиферации PCNA (А) и маркера апоптоза Вах (Б) в культивируемых клетках теки кур из преовуляторного фолликула F1 в присутствии соматотропного гормона (СТГ) в различных концентрациях. Достоверные различия по сравнению с контролем (0 нг/мл СТГ): * $P < 0,05$

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 19-016-00216)

Литература

1. Hull K. L. Growth hormone: roles in female reproduction / K. L. Hull, S. Harvey // J. Endocrinol. — 2001. — V. 168. — P. 1–23. doi: 10.1677/joe.0.1680001.
2. Quesnel H. Localization of binding sites for IGF-I, insulin and GH in the sow ovary / H. Quesnel // J. Endocrinol. — 1999. — V. 163. — P. 363–372. doi: 10.1677/joe.0.1630363.
3. Lebedeva I. Y. Characterization of somatotropin- and prolactin-binding sites on bovine granulosa cells using homologous hormones / I. Y. Lebedeva, V. A. Lebedev, T.I. Kuzmina // Biochemistry (Mosc). — 2001. — V. 66. — P. 967–972. doi: 10.1023/a:1012309307153.
4. Lebedeva I.Y. Characterization of growth hormone binding sites in granulosa and theca layers at different stages of follicular maturation and ovulatory cycle in the domestic hen / I. Y. Lebedeva, V. A. Lebedev, R. Grossmann, et al. // Biol. Reprod. — 2004. — V. 71. — P. 1174–1181. doi: 10.1095/biolreprod.104.030056.
5. Ahumada-Solrzan S. M. 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 / S. M. Ahumada-Solrzan, M.E. Carranza, E. Pedernera, et al. // Gen. Comp. Endocrinol. — 2012. — V. 175. — P. 297–310. doi: 10.1016/j.ygcen.2011.11.027.

6. Luna M. Extrapituitary growth hormone in the chicken reproductive system / M. Luna, C. G. Martнnez-Moreno, M. S. Ahumada-Solrzano, et al. // Gen. Comp. Endocrinol. — 2014. — V. 203. — P. 60–68. doi: 10.1016/j.ygcen.2014.02.021.
7. Hrabia A. Expression and localization of growth hormone and its receptors in the chicken ovary during sexual maturation / A. Hrabia, H. E. Paczoska-Eliasiewicz, L. R. Berghman // Cell. Tissue Res. — 2008. — V. 332. — P. 317–328. doi: 10.1007/s00441-008-0595-7.
8. Hrabia A. Growth hormone production and role in the reproductive system of female chicken / A. Hrabia // Gen. Comp. Endocrinol. — 2015. — V. 220. — P. 112–118. doi: 10.1016/j.ygcen.2014.12.022.
9. Hrabia A. Effect of growth hormone on steroid content, proliferation and apoptosis in the chicken ovary during sexual maturation / A. Hrabia, A. Sechman, A. Gertler, J. Rzaа // Cell. Tissue Res. — 2011. — V. 345. — P. 191–202. doi: 10.1007/s00441-011-1187-5.
10. Ahumada-Solrzano S. M. Autocrine/paracrine proliferative effect of ovarian GH and IGF-I in chicken granulosa cell cultures / S. M. Ahumada-Solrzano, C. G. Martнnez-Moreno, M. Carranza, et al. // Gen. Comp. Endocrinol. — 2016. — V. 234. — P. 47–56. doi: 10.1016/j.ygcen.2016.05.008.
11. 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. doi: 10.1186/1477-7827-8-15.
12. Ipsa E. Growth hormone and insulin-like growth factor action in reproductive tissues / E. Ipsa, V. F. Cruzat, J. N. Kagize, et al. // Front. Endocrinol. (Lausanne). — 2019. — V. 10. — P. 777. doi: 10.3389/fendo.2019.00777.
13. Markstrm E. Survival factors regulating ovarian apoptosis — dependence on follicle differentiation / E. Markstrm, E. Ch. Svensson, R. Shao, et al. // Reproduction. — 2002. — V. 123. — P. 23–30. doi: 10.1530/rep.0.1230023.

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

Modulating effect of growth hormone on the functional state of cultured cells from hen preovulatory follicles

Abstract.

Somatotropic hormone (STH) is an important positive modulator of ovarian function in mammals. Local production of STH and the expression of the corresponding specific receptors were also detected in hen ovarian follicles, which indicates the participation of this hormone in the endocrine/paracrine control of folliculogenesis in birds. Nevertheless, the role of STH in the regulation of growth of avian follicles at the final stage of maturation is still not clear.

Objective: *To study in vitro the effect of STH on the proliferative activity and apoptotic changes of granulosa and theca cells from preovulatory follicles of domestic hens.*

Materials and methods. *Young laying hens aged 34–35 weeks with a long clutch were used in the experiments. Granulosa and theca cells were isolated from the largest yellow follicle in the hierarchy (F1). The cells were cultured in a medium containing 10% fetal bovine serum until a monolayer was formed, and then for 24 h in the medium without serum in the absence (control) or in the presence of STH at various concentrations (1–100 ng/ml). The proliferative activity and apoptotic changes in the cells were assessed by immunocytochemical assay, based on the expression level of proliferating cell nuclear antigen PCNA and pro-apoptotic protein Bax, respectively.*

Results. *The proportion of PCNA-positive granulosa cells increased 1.3–1.8 times ($P < 0.01–0.05$) as compared to control with increasing the content of STH in the medium to 10–100 ng/ml. Furthermore, within this concentration range, the studied hormone reduced 1.2–1.6 times ($P < 0.05$) the relative number of granulosa cells with the positive reaction to Bax. The sensitivity of theca cells to the growth-stimulating effect of STH was lower than that of granulosa cells. Such the effect of STH led to an increase in the proportion of PCNA-positive thecal cells by 1.2–1.3 times ($P < 0.05$) and was detected only at concentrations of 25 and 100 ng/ml. Meanwhile, STH (25–100 ng/ml) increased 1.3 times ($P < 0.05$) the level of Bax expression in theca cells.*

Conclusions. *The results of the present study indicate the stimulating effect of STH in vitro on the proliferative activity of granulosa and theca cells from the most mature hen preovulatory follicle. In addition, STH is*

able to reduce the expression of the pro-apoptotic protein Bax in granulosa cells and increase this expression in thecal cells. Thus, the data obtained indicate the possible participation of STH in the regulation of growth and development of follicles at the final stage of maturation during the period of maximum egg-laying intensity in laying hens.

Keywords: laying hens, somatotrophic hormone, preovulatory follicles, granulosa cells, theca cells, proliferation, apoptosis.

Authors:

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

Mityashova O. — PhD (Biol. Sci.); e-mail: mityashova_o@mail.ru;

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

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

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

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

References

1. Hull K. L. Growth hormone: roles in female reproduction / K. L. Hull, S. Harvey // J. Endocrinol. — 2001. — V. 168. — P. 1–23. doi: 10.1677/joe.0.1680001.
2. Quesnel H. Localization of binding sites for IGF-I, insulin and GH in the sow ovary / H. Quesnel // J. Endocrinol. — 1999. — V. 163. — P. 363–372. doi: 10.1677/joe.0.1630363.
3. Lebedeva I. Y. Characterization of somatotropin- and prolactin-binding sites on bovine granulosa cells using homologous hormones / I. Y. Lebedeva, V. A. Lebedev, T. I. Kuzmina // Biochemistry (Mosc). — 2001. — V. 66. — P. 967–972. doi: 10.1023/a:1012309307153.
4. Lebedeva I. Y. Characterization of growth hormone binding sites in granulosa and theca layers at different stages of follicular maturation and ovulatory cycle in the domestic hen / I. Y. Lebedeva, V. A. Lebedev, R. Grossmann, et al. // Biol. Reprod. — 2004. — V. 71. — P. 1174–1181. doi: 10.1095/biolreprod.104.030056.
5. Ahumada-Solrzano S. M. 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 / S. M. Ahumada-Solrzano, M.E. Carranza, E. Pedernera, et al. // Gen. Comp. Endocrinol. — 2012. — V. 175. — P. 297–310. doi: 10.1016/j.ygcen.2011.11.027.
6. Luna M. Extrapituitary growth hormone in the chicken reproductive system / M. Luna, C. G. Martınez-Moreno, M. S. Ahumada-Solrzano, et al. // Gen. Comp. Endocrinol. — 2014. — V. 203. — P. 60–68. doi: 10.1016/j.ygcen.2014.02.021.
7. Hrabia A. Expression and localization of growth hormone and its receptors in the chicken ovary during sexual maturation / A. Hrabia, H. E. Paczoska-Eliasiewicz, L. R. Berghman // Cell. Tissue Res. — 2008. — V. 332. — P. 317–328. doi: 10.1007/s00441-008-0595-7.
8. Hrabia A. Growth hormone production and role in the reproductive system of female chicken / A. Hrabia // Gen. Comp. Endocrinol. — 2015. — V. 220. — P. 112–118. doi: 10.1016/j.ygcen.2014.12.022.
9. Hrabia A. Effect of growth hormone on steroid content, proliferation and apoptosis in the chicken ovary during sexual maturation / A. Hrabia, A. Sechman, A. Gertler, J. Rzaśa // Cell. Tissue Res. — 2011. — V. 345. — P. 191–202. doi: 10.1007/s00441-011-1187-5.
10. Ahumada-Solrzano S. M. Autocrine/paracrine proliferative effect of ovarian GH and IGF-I in chicken granulosa cell cultures / S. M. Ahumada-Solrzano, C. G. Martınez-Moreno, M. Carranza, et al. // Gen. Comp. Endocrinol. — 2016. — V. 234. — P. 47–56. doi: 10.1016/j.ygcen.2016.05.008.
11. 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. doi: 10.1186/1477-7827-8-15.
12. Ipsa E. Growth hormone and insulin-like growth factor action in reproductive tissues / E. Ipsa, V. F. Cruzat, J. N. Kagize, et al. // Front. Endocrinol. (Lausanne). — 2019. — V. 10. — P. 777. doi: 10.3389/fendo.2019.00777.
13. Markström E. Survival factors regulating ovarian apoptosis — dependence on follicle differentiation / E. Markström, E. Ch. Svensson, R. Shao, et al. // Reproduction. — 2002. — V. 123. — P. 23–30. doi: 10.1530/rep.0.1230023.