

Е. К. Монтвила, О. С. Митяшова, И. Ю. Лебедева

Влияние тиреоидных гормонов *in vitro* на функциональное состояние клеток гранулезы коров

Аннотация.

Любые дисфункции щитовидной железы обуславливают аномальные изменения в работе репродуктивной системы, в первую очередь яичников. Поэтому представляется актуальным вопрос о возможном непосредственном влиянии тиреоидных гормонов на овариальную функцию коров путем модуляции функционального состояния или функциональной активности гранулезных клеток.

Цель: изучить *in vitro* влияние тироксина и трийодтиронина на пролиферативную и стероидогенную активность, а также апоптотические изменения клеток гранулезы коров.

Материалы и методы. Клетки гранулезы выделяли из фолликулов диаметром 1-5 мм и предварительно культивировали в течение двух суток в среде, содержащей 10 % сыворотки. Затем клетки помещали в среду без сыворотки, содержащую тироксин (25-200 нг/мл) или трийодтиронин (0,5-4,0 нг/мл), и инкубировали в течение следующих 48 ч. После культивирования определяли содержание эстрадиола-17 β и прогестерона в средах методом ИФА. Пролиферативную активность и апоптотические изменения в клетках оценивали методом иммуноцитохимического анализа по уровню экспрессии ядерного антигена пролиферирующих клеток PCNA и проапоптотического белка Вах, соответственно.

Результаты. Обнаружено, что доля клеток с позитивной реакцией на PCNA возрастает в 1,1 раза ($P < 0,01$) по сравнению с таковой в контроле при концентрации трийодтиронина 1 нг/мл и не изменяется при ее дальнейшем повышении до 4 нг/мл. Кроме того, внесение в среду трийодтиронина в концентрации 1 нг/мл приводило к снижению относительного числа Вах-позитивных клеток с $25,6 \pm 0,3$ % до $23,3 \pm 0,6$ % ($P < 0,01$). Дальнейшее увеличение этой концентрации до 4 нг/мл усиливало наблюдаемый антиапоптотический эффект в 1,1 раза ($P < 0,05$). Характер влияния тироксина на пролиферативную активность и апоптотические изменения клеток гранулезы в культуре был аналогичен таковому для трийодтиронина. При этом ростостимулирующий и антиапоптотический эффекты тироксина достигались при концентрации 50-200 нг/мл. В то же время оба тиреоидных гормона не влияли на секрецию клетками эстрадиола-17 β или прогестерона.

Заключение. Таким образом, тироксин и трийодтиронин могут стимулировать *in vitro* пролиферацию клеток гранулезы коров, а также ингибировать экспрессию проапоптотического белка Вах в этих клетках, что не связано с регуляцией продукции овариальных стероидных гормонов. В целом полученные данные предполагают, что тиреоидные гормоны в физиологических концентрациях способны оказывать регуляторное действие на рост и атрезию малых антральных фолликулов коров и, следовательно, непосредственно модулировать активность яичников.

Ключевые слова: клетки гранулезы коров; тироксин; трийодтиронин; пролиферация; апоптоз; стероидогенез.

Авторы:

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

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

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

Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста; 142132, Московская область, городской округ Подольск, поселок Дубровицы, д. 60.

Введение. Любые дисфункции щитовидной железы обуславливают аномальные изменения в работе репродуктивной системы у самок млекопитающих [1], что достигается при использовании различных регуляторных путей. Тиреоидные гормоны могут участвовать в регуляции функции воспроизведения посредством модифи-

кации обменных процессов [2]. Они также способны влиять на женскую репродукцию на уровне гипоталамо-гипофизарной оси путем модуляции секреции гонадотропных гормонов [3]. Кроме того, эти гормоны, по-видимому, вовлекаются в регуляторные процессы непосредственно на уровне яичника.

Прямое воздействие гормонов щитовидной железы подтверждается экспрессией соответствующих рецепторов в овариальных клетках некоторых видов, включая крупный рогатый скот [4-6]. В фолликулярной жидкости человека и коров присутствуют свободные фракции тироксина и трийодтиронина, способные связываться со специфическими рецепторами [7, 8]. Показано, что трийодтиронин может усиливать антиапоптотическое действие фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) на клетки гранулызы крыс и свиней в культуре [9, 10]. У крупного рогатого скота обнаружено *in vitro* стимулирующее влияние тиреоидных гормонов в присутствии инсулина и ФСГ на продукцию гранулезными клетками половых стероидных гормонов [11]. При этом характер взаимодействия тиреоидной и репродуктивной систем может иметь видовые особенности и зависеть от физиологических условий [12].

У коров молочного типа нами выявлена связь между активностью тиреоидной системы и уровнем послеродовой депрессии овариальной функции [13, 14]. Как известно, циклическая активность яичников зависит от фолликулярного роста, развития и атрезии. В свою очередь, интенсивность этих процессов определяется пролиферативной и стероидогенной активностью, а также устойчивостью к апоптозу овариальных клеток, в первую очередь клеток гранулызы. Таким образом, представляется актуальным вопрос о возможном влиянии тиреоидных гормонов на овариальную функцию коров путем модуляции функционального состояния или функциональной активности гранулезных клеток.

Цель исследований — изучить *in vitro* влияние тироксина и трийодтиронина на пролиферативную и стероидогенную активность, а также апоптотические изменения клеток гранулызы коров.

Материалы и методы. В экспериментах использовали яичники коров и половозрелых те-

лок, полученные на мясокомбинате. Яичники многократно отмывали в стерильном физиологическом растворе с антибиотиками (100 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина).

Клетки гранулызы выделяли посредством аспирации из фолликулов диаметром 1-5 мм и промывали 3 раза путем центрифугирования в среде ТС-199, содержащей 5% сыворотки, при 250 g 10 мин. Для получения монослойной культуры клетки предварительно культивировали в течение двух суток на покровных стеклах в среде ТС-199, содержащей 10% сыворотки (Nyclone Laboratories, США). Затем стекла с клетками помещали в среду без сыворотки, содержащую тироксин (Т4; Sigma, США) в концентрации 0 (контроль), 25, 50, 100 и 200 нг/мл или трийодтиронин (Т3; Sigma, США) в концентрации 0 (контроль), 0,5, 1, 2 и 4 нг/мл, и инкубировали в течение следующих 48 ч.

После культивирования отбирали образцы сред для определения концентрации половых стероидных гормонов. Клетки промывали 3 раза фосфатным буферным раствором, фиксировали 2%-ным раствором параформальдегида и пермеабилизировали 0,2 %-ным раствором Тритона X-100. Для блокирования неспецифического связывания проводили обработку клеток 10%-ным раствором нормальной лошадиной сыворотки (Abscam, Великобритания). Препараты клеток инкубировали при 4 °C в течение 17 ч с первичными мышиными антителами к ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA, Clone PC10, Dako, USA) или к проапоптотическому белку Bax (Clone 2D2, Bio-Rad, USA).

Затем проводили инкубацию клеточных препаратов со вторыми биотинилированными антителами, лошадиными антимышиными иммуноглобулинами (Vector Labs, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Для визуализации специфического связывания препараты обрабатывали в течение 30 минут реагентом Vectastain

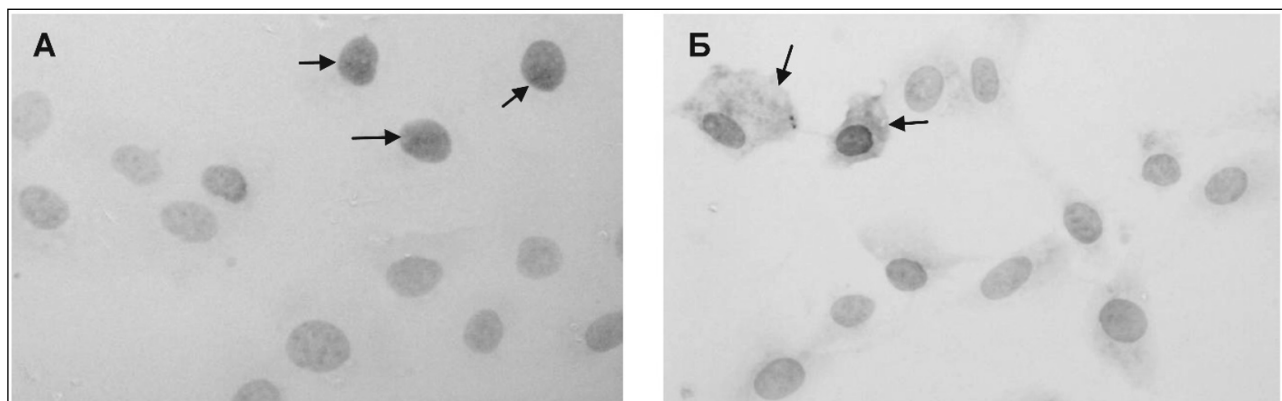


Рис. 1. Иммуноцитохимический анализ экспрессии маркера пролиферации PCNA (А) и маркера апоптоза Bax (Б) в культуре клеток гранулызы коров. Стрелками показано позитивное окрашивание ядер на PCNA и цитоплазмы на Bax.

ABC (Vector Labs, США) и окрашивали коричневым хромофором DAB (Vector Labs, США). Препараты анализировали под световым микроскопом Axio Scope.A1 (Carl Zeiss, Германия). Долю PCNA-позитивных и Вах-позитивных клеток определяли по отношению числа клеток, окрашенных в коричневый цвет, к общему числу клеток (рис. 1).

Содержание эстрадиола-17 β и прогестерона в средах определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием планшетного спектрофотометра Униплан («Пикон», Россия) и наборов реагентов ООО «Хема» (Россия). Чувствительность метода составляла 0,025 нмоль/л (эстрадиол-17 β) и 0,25 нмоль/л (прогестерон). Все образцы анализировали в двух повторностях, коэффициент вариации не превышал 17 %.

Эксперименты по культивированию клеток проводили в 4-5 независимых повторностях. В каждом независимом эксперименте была исполь-

зована смешанная популяция клеток, выделенных из 3-4 яичников. Полученные результаты обрабатывали при помощи программы SigmaStat 4.0 (Systat Software, Inc.) методом однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями, в котором в качестве внутригруппового фактора служила концентрация гормонов. Данные выражали как средние значения $\pm$ стандартные ошибки. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с использованием критерия Тьюки.

Результаты и обсуждение. Долю пролиферирующих и апоптотических клеток определяли методом иммуноцитохимического анализа по уровню экспрессии ядерного антигена пролиферирующих клеток PCNA и проапоптотического белка Вах, соответственно.

Было обнаружено, что ТЗ оказывает ростостимулирующее влияние на культивируемые клетки гранулезы коров (рис. 2 А). Доля клеток с позитивной реакцией на PCNA возрастала в 1,1 раза ($P < 0,01$) по сравнению с таковой в контроле уже при концентрации гормона 1 нг/мл. Этот эффект не изменялся при повышении содержания ТЗ в среде до 4 нг/мл. Кроме того, внесение в среду ТЗ в концентрации 1 нг/мл приводило к снижению относительного числа Вах-позитивных клеток с $25,6 \pm 0,3$ % до $23,3 \pm 0,6$ % ($P < 0,01$). Дальнейшее увеличение этой концентрации до 4 нг/мл усиливало наблюдаемый антиапоптотический эффект в 1,1 раза ($P < 0,05$).

Характер влияния Т4 на пролиферативную активность и апоптотические изменения клеток гранулезы в культуре был аналогичен таковому для ТЗ (рис. 2 Б). При этом ростостимулирующий и антиапоптотический эффекты Т4 достигались при концентрации 50-200 нг/мл. Следовательно, чувствительность клеток гранулезы к воздействию Т4 была в 25 раз ниже, чем к воздействию ТЗ.

При воздействии тироксина и трийодтиронина на клетки гранулезы в культуре не наблюдалось существенного изменения содержания в среде эстрадиола-17 β (рис. 3), который стимулирует пролиферацию и подавляет апоптоз этих клеток [15]. Кроме того, не было выявлено никакого

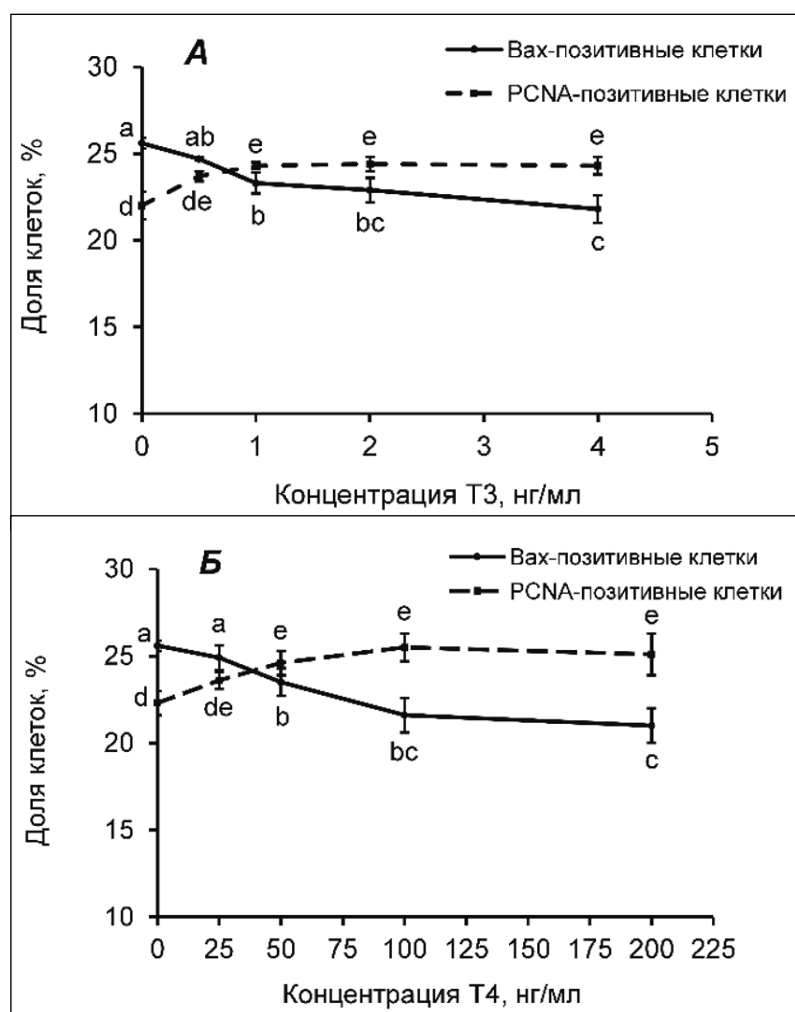


Рис. 2. Экспрессия маркера пролиферации PCNA и маркера апоптоза Вах в клетках гранулезы коров, культивируемых в присутствии трийодтиронина (А) и тироксина (Б) в различных концентрациях. Буквенные индексы, не содержащие одинаковых букв, показывают достоверные различия между средними значениями ($P < 0,001 - P < 0,05$).

влияния обоих тиреоидных гормонов на секрецию клетками прогестерона, важного ингибитора апоптотических процессов [15]. Эти данные согласуются с результатами других исследователей об отсутствии такого влияния тироксина и трийодтиронина при культивировании клеток гранулезы коров в среде без инсулина и ФСГ [11]. В нашем исследовании впервые выявлено непосредственное ростостимулирующее влияние тиреоидных гормонов на пролиферативную активность клеток гранулезы у крупного рогатого скота. Такое влияние на клетки было умеренным, но статистически достоверным. Ранее было показано сходное действие тиреоидных гормонов на линию COV434 клеток гранулезы человека и на культивируемые клетки гранулезы крыс [16, 17]. Кроме того, антиапоптотический эффект этих гормонов к культуре гранулезных клеток крыс и лютеинизированных гранулезных клеток человека был связан с ингибированием экспрессии Вах [17,

18]. Эти данные согласуются с результатами, полученными нами у коров. Следует отметить, что тироксин и трийодтиронин оказывали свое ростостимулирующее и антиапоптотическое влияние на клетки гранулезы коров при физиологических концентрациях [14], что указывает на биологическую значимость такого влияния.

Заключение. Таким образом, тироксин и трийодтиронин могут стимулировать *in vitro* пролиферацию клеток гранулезы коров, а также ингибировать экспрессию проапоптотического белка Вах в таких клетках. При этом выявленное влияние тиреоидных гормонов не связано с регуляцией продукции овариальных стероидных гормонов. В целом полученные данные предполагают, что тиреоидные гормоны в физиологических концентрациях способны оказывать регуляторное действие на рост и атрезию малых антральных фолликулов коров и, следовательно, непосредственно модулировать активность яичников.

*Работа выполнена по государственному заданию
(тема 0445-2021-0004)*

Литература

1. Krassas G. E. Thyroid function and human reproductive health / G. E. Krassas, K. Poppe, D. Glinier // *Endocr. Rev.* — 2010. — V. 31. — P. 702-755. doi: 10.1210/er.2009-0041.
2. Mullur R. Thyroid hormone regulation of metabolism / R. Mullur, Y. Y. Liu, G.A. Brent // *Physiol. Rev.* — 2014. — V. 94. — P. 355-382. doi: 10.1152/physrev.00030.2013.
3. Webster J. R. Role of the thyroid gland in seasonal reproduction. II. Thyroxine allows a season-specific suppression of gonadotropin secretion in sheep / J. R. Webster, S. M. Moenter et. al // *Endocrinology.* — 1991. — V. 129. — P. 176-183. doi: 10.1210/endo-129-1-176.
4. Aghajanova L. Receptors for thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones in human ovarian tissue / L. Aghajanova, M. Lindeberg, I. B. Carlsson et al. // *Reprod. Biomed. Online.* — 2009. — V. 18. — P. 337-347. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60091-0.

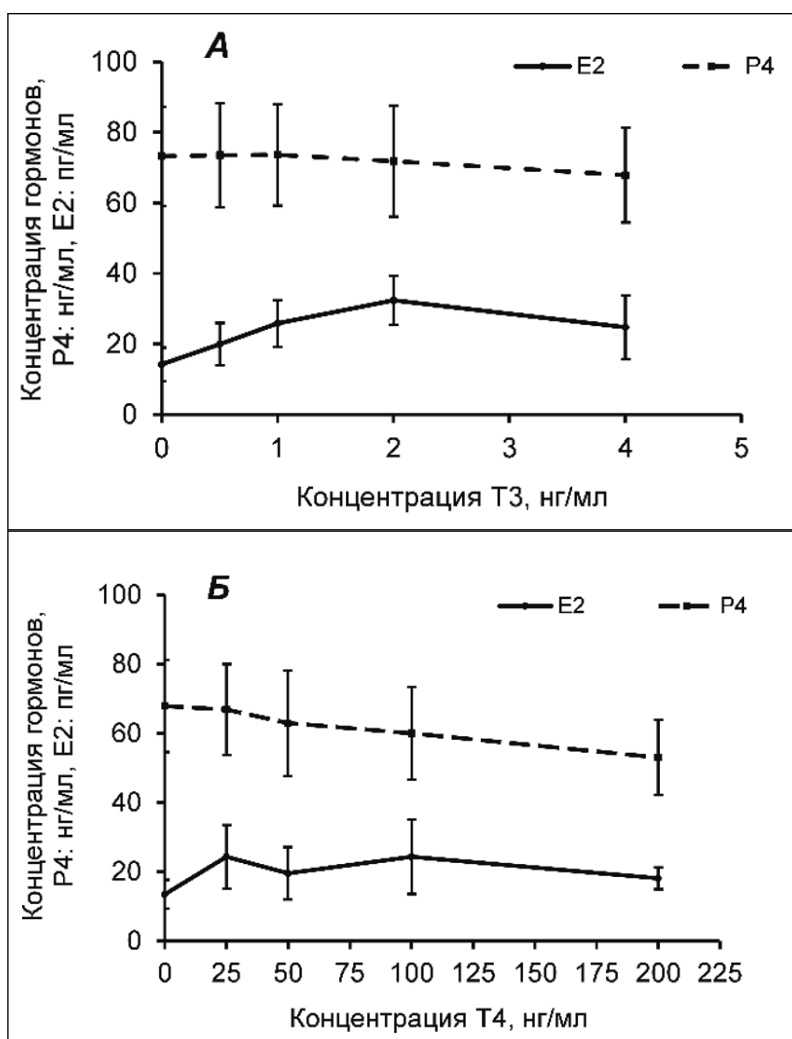


Рис. 3. Секреция эстрадиола-17β (E2) и прогестерона (P4) клетками гранулезы коров, культивируемыми в присутствии трийодтиронина (А) и тироксина (Б) в различных концентрациях.

5. Wakim N. G. Triiodothyronine receptors in porcine granulosa cells / N.G. Wakim, N. Ramani, C. V. Rao // *Am. J. Obstet. Gynecol.* — 1987. — V. 156. — P. 237-240. doi: 10.1016/0002-9378(87)90244-4.
6. Costa N. N. Effect of triiodothyronine on developmental competence of bovine oocytes / N. N. Costa, M. S. Cordeiro, T. V. Silva et al. // *Theriogenology*. — 2013. — V. 80. — P. 295-301. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.04.011.
7. Cai Y. Y. Serum and follicular fluid thyroid hormone levels and assisted reproductive technology outcomes / Y. Y. Cai, N. Lin, L.P. Zhong et al. // *Reprod. Biol. Endocrinol.* — 2019. — V. 17. — P. 90. doi: 10.1186/s12958-019-0529-0.
8. Ashkar F. A. Thyroid hormone concentrations in systemic circulation and ovarian follicular fluid of cows / F. A. Ashkar, P. M. Bartlewski, J. Singh, et al. // *Exp. Biol. Med (Maywood)*. — 2010. — V. 235. — P. 215-221. doi: 10.1258/ebm.2009.009185.
9. Zhang C. Interactions of thyroid hormone and FSH in the regulation of rat granulosa cell apoptosis / C. Zhang, G. Xia, B.K. Tsang // *Front. Biosci. (Elite Ed)*. — 2011. — V. 3. — P. 1401-1413. doi: 10.2741/E342.
10. Asahara, S. Thyroid hormone synergizes with follicle stimulating hormone to inhibit apoptosis in porcine granulosa cells selectively from small follicles / S. Asahara, A. Sato, A. Aljonaid, T. Maruo // *Kobe J. Med. Sci.* — 2003. — V. 49. — P. 107-116.
11. Spicer L. J. Effects of thyroid hormones on bovine granulosa and thecal cell function in vitro: dependence on insulin and gonadotropins / L. J. Spicer, J. Alonso, C. S. Chamberlain // *J. Dairy. Sci.* — 2001. — V. 84. — P. 1069-1076. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74567-5.
12. Cecconi S. Thyroid hormone effects on mouse oocyte maturation and granulosa cell aromatase activity / S. Cecconi, N. Rucci, M. L. Scalfaferri et al. // *Endocrinology*. — 1999. — V. 140. — P. 1783-1788. doi: 10.1210/endo.140.4.6635.
13. Kafi M. Relationships between thyroid hormones and serum energy metabolites with different patterns of postpartum luteal activity in high-producing dairy cows / M. Kafi, A. Tamadon, M. Saeb et al. // *Animal*. — 2012. — V. 6. — P. 1253-1260. doi: 10.1017/S1751731112000043.
14. Митяшова О. С. Липидный обмен и тиреоидный статус у коров-первотелок с разным функциональным состоянием яичников / О. С. Митяшова, А. А. Соломахин, Н. В. Боголюбова и др. // *Достижения науки и техники АПК*. — 2020. — Т. 34. — № 2. — С. 69-74. doi: 10.24411/0235-2451-2020-10215.
15. Quirk S. M. Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival / S. M. Quirk, R. G. Cowan, R. M. Harman et al. // *J. Anim. Sci.* — 2004. — V. 82. — E-Suppl. — P. E40-E52. doi: 10.2527/2004.8213_supplE40x.
16. Verga Falzacappa C. Thyroid hormones induce cell proliferation and survival in ovarian granulosa cells COV434 / C. Verga Falzacappa, C. Mangialardo, V. Patriarca et al. // *J. Cell. Physiol.* — 2009. — V. 221. — P. 242-253. doi: 10.1002/jcp.21849.
17. Canipari, R. Thyroid hormones act as mitogenic and pro survival factors in rat ovarian follicles / R. Canipari, C. Mangialardo, V. Di Paolo et al. // *J. Endocrinol. Invest.* — 2019. — V. 42. — P. 271-282. doi: 10.1007/s40618-018-0912-2.
18. Di Paolo, V. Thyroid hormones T3 and T4 regulate human luteinized granulosa cells, counteracting apoptosis and promoting cell survival / V. Di Paolo, C. Mangialardo, C. Zaca et al. // *J. Endocrinol. Invest.* — 2020. — V. 43. — P. 821-831. doi: 10.1007/s40618-019-01169-5.

Mityashova O., Montvila E., Lebedeva I.

Effects of thyroid hormones on the functional state of bovine granulosa cells in vitro

Abstract.

Any dysfunction of the thyroid gland causes abnormal changes in the functioning of the reproductive system, primarily the ovaries. Therefore, the question of the possible direct effect of thyroid hormones on the bovine ovarian function by modulating the functional state or functional activity of granulosa cells seems relevant

Purpose: to study in vitro the effect of thyroxine and triiodothyronine on the proliferative and steroidogenic activity, as well as apoptotic changes of bovine granulosa cells.

Materials and methods. Granulosa cells were isolated from follicles with a diameter of 1-5 mm and pre-cultured for two days in a medium containing 10 % serum. The cells were then placed in serum-free medium containing thyroxine (25-200 ng/mL) or triiodothyronine (0.5-4.0 ng/mL) and incubated for another 48 h. After culturing, the content of estradiol-17 β and progesterone in the media was determined by ELISA. 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. It was found that the proportion of cells with a positive reaction to PCNA increased 1.1 times ($P < 0.01$) compared with that in the control at a triiodothyronine concentration of 1 ng/ml and did not change with its further increase to 4 ng/ml. In addition, the introduction of triiodothyronine at a concentration of 1 ng/ml into the medium led to a decrease in the relative number of Bax-positive cells from $25.6 \pm 0.3\%$ to $23.3 \pm 0.6\%$ ($P < 0.01$). A further increase in this concentration to 4 ng/ml enhanced the observed anti-apoptotic effect 1.1 times ($P < 0.05$). The pattern of the effect of thyroxine on the proliferative activity and apoptotic changes of granulosa cells in culture was similar to that for triiodothyronine. Concurrently, the growth-stimulating and anti-apoptotic effects of thyroxine were achieved at a concentration of 50-200 ng/ml. At the same time, both thyroid hormones did not affect the secretion of estradiol-17 β or progesterone by the cells.

Conclusions. Thus, thyroxine and triiodothyronine can stimulate in vitro the proliferation of bovine granulosa cells, as well as inhibit the expression of the proapoptotic Bax protein in these cells, which is not associated with the regulation of the production of ovarian steroid hormones. Overall, these data suggest that thyroid hormones at physiological concentrations are able to exert a regulatory effect on the growth and atresia of bovine small antral follicles and, therefore, directly modulate the ovarian activity.

Key words: bovine granulosa cells, thyroxine, triiodothyronine, proliferation, apoptosis, steroidogenesis.

Authors:

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

Mityashova O. – PhD (Biol.Sci.); e-mail: mityashova_o@mail.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. Krassas G. E. Thyroid function and human reproductive health / G. E. Krassas, K. Poppe, D. Glinioer // *Endocr. Rev.* – 2010. – V. 31. – P. 702-755. doi: 10.1210/er.2009-0041.
2. Mullur R. Thyroid hormone regulation of metabolism / R. Mullur, Y. Y. Liu, G.A. Brent // *Physiol. Rev.* – 2014. – V. 94. – P. 355-382. doi: 10.1152/physrev.00030.2013.
3. Webster J. R. Role of the thyroid gland in seasonal reproduction. II. Thyroxine allows a season-specific suppression of gonadotropin secretion in sheep / J. R. Webster, S. M. Moenter, C. J. Woodfill, F. J. Karsch // *Endocrinology.* – 1991. – V. 129. – P. 176-183. doi: 10.1210/endo-129-1-176.
4. Aghajanova L. Receptors for thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones in human ovarian tissue / L. Aghajanova, M. Lindeberg, I. B. Carlsson et al. // *Reprod. Biomed. Online.* – 2009. – V. 18. – P. 337-347. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60091-0.

5. Wakim N. G. Triiodothyronine receptors in porcine granulosa cells / N.G. Wakim, N. Ramani, C. V. Rao // *Am. J. Obstet. Gynecol.* — 1987. — V. 156. — P. 237-240. doi: 10.1016/0002-9378(87)90244-4.
6. Costa N. N. Effect of triiodothyronine on developmental competence of bovine oocytes / N. N. Costa, M. S. Cordeiro, T. V. Silva et al. // *Theriogenology*. — 2013. — V. 80. — P. 295-301. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.04.011.
7. Cai Y. Y. Serum and follicular fluid thyroid hormone levels and assisted reproductive technology outcomes / Y. Y. Cai, N. Lin, L.P. Zhong et al. // *Reprod. Biol. Endocrinol.* — 2019. — V. 17. — P. 90. doi: 10.1186/s12958-019-0529-0.
8. Ashkar F. A. Thyroid hormone concentrations in systemic circulation and ovarian follicular fluid of cows / F. A. Ashkar, P. M. Bartlewski, J. Singh, et al. // *Exp. Biol. Med (Maywood)*. — 2010. — V. 235. — P. 215-221. doi: 10.1258/ebm.2009.009185.
9. Zhang C. Interactions of thyroid hormone and FSH in the regulation of rat granulosa cell apoptosis / C. Zhang, G. Xia, B.K. Tsang // *Front. Biosci. (Elite Ed)*. — 2011. — V. 3. — P. 1401-1413. doi: 10.2741/E342.
10. Asahara, S. Thyroid hormone synergizes with follicle stimulating hormone to inhibit apoptosis in porcine granulosa cells selectively from small follicles / S. Asahara, A. Sato, A. Aljonaid, T. Maruo // *Kobe J. Med. Sci.* — 2003. — V. 49. — P. 107-116.
11. Spicer L. J. Effects of thyroid hormones on bovine granulosa and thecal cell function in vitro: dependence on insulin and gonadotropins / L. J. Spicer, J. Alonso, C. S. Chamberlain // *J. Dairy. Sci.* — 2001. — V. 84. — P. 1069-1076. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74567-5.
12. Cecconi S. Thyroid hormone effects on mouse oocyte maturation and granulosa cell aromatase activity / S. Cecconi, N. Rucci, M. L. Scalfaferri et al. // *Endocrinology*. — 1999. — V. 140. — P. 1783-1788. doi: 10.1210/endo.140.4.6635.
13. Kafi M. Relationships between thyroid hormones and serum energy metabolites with different patterns of postpartum luteal activity in high-producing dairy cows / M. Kafi, A. Tamadon, M. Saeb et al. // *Animal*. — 2012. — V. 6. — P. 1253-1260. doi: 10.1017/S1751731112000043
14. Mityashova O. S. Lipid exchange and thyroid status in pimony cows with a different functional state of the ovaries / O. S. Mityashova, A. A. Solomakhin, N. V. Bogolyubov and others // *Achievements of the science and technology of the agro-industrial complex*. — 2020. — Vol. 34. — № 2. — P. 69-74. doi: 10.24411/0235-2451-2020-10215.
15. Quirk S. M. Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival / S. M. Quirk, R. G. Cowan, R. M. Harman et al. // *J. Anim. Sci.* — 2004. — V. 82. — E-Suppl. — P. E40-E52. doi: 10.2527/2004.8213_supplE40x.
16. Verga Falzacappa C. Thyroid hormones induce cell proliferation and survival in ovarian granulosa cells COV434 / C. Verga Falzacappa, C. Mangialardo, V. Patriarca et al. // *J. Cell. Physiol.* — 2009. — V. 221. — P. 242-253. doi: 10.1002/jcp.21849.
17. Canipari, R. Thyroid hormones act as mitogenic and pro survival factors in rat ovarian follicles / R. Canipari, C. Mangialardo, V. Di Paolo et al. // *J. Endocrinol. Invest.* — 2019. — V. 42. — P. 271-282. doi: 10.1007/s40618-018-0912-2.
18. Di Paolo, V. Thyroid hormones T3 and T4 regulate human luteinized granulosa cells, counteracting apoptosis and promoting cell survival / V. Di Paolo, C. Mangialardo, C. Zaca et al. // *J. Endocrinol. Invest.* — 2020. — V. 43. — P. 821-831. doi: 10.1007/s40618-019-01169-5.