

Влияние трийодтиронина *in vitro* на экспрессию регуляторов апоптоза семейства Bcl-2 в клетках гранулезы кур-несушек разного возраста и репродуктивного статуса

И. Ю. Лебедева[✉], О. С. Митяшова, Е. К. Монтвила, О. В. Алейникова, А. А. Смекалова
Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста,
п. Дубровицы, Московская область, Россия
[✉]E-mail: irledv@mail.ru

Аннотация. Цель представленной работы – охарактеризовать *in vitro* влияние трийодтиронина (ТЗ) на экспрессию проапоптотического белка Вах и антиапоптотического белка Bcl-2 в клетках гранулезы кур-несушек в связи с возрастным снижением яйценоскости. **Методы.** Исследование проводили на курах-несушках в возрасте 29–32 недель с длинным циклом яйцекладки ($n = 6$) и в возрасте 69–84 недель с коротким циклом яйцекладки ($n = 6$). В экспериментах использовали два самых больших преовуляторных фолликула F1 и F2. Выделенные из фолликулов клетки культивировали в среде, содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки. После образования монослойной культуры эту среду заменяли средой без сыворотки и клетки культивировали в течение 48 ч в присутствии ТЗ в концентрации 0,5–8,0 нг/мл или без ТЗ (контроль). Экспрессию целевых белков в фолликулярных клетках оценивали методом иммуноцитохимии при использовании первичных антител к Вах и Bcl-2. **Результаты.** При культивировании клеток гранулезы из фолликулов F1 у молодых кур внесение ТЗ (1,0–8,0 нг/мл) в среду приводило к возрастанию в 1,1 раза ($p < 0,01 \dots 0,05$) доли клеток с позитивной реакцией на Вах и Bcl-2, по сравнению с контролем, но не влияло на эту долю в случае фолликулов F2. У кур с возрастным снижением яйценоскости ТЗ повышал в 1,1–1,2 раза ($p < 0,01 \dots 0,05$) экспрессию Вах в культуре клеток гранулезы из фолликулов обеих категорий, но только в концентрации 8,0 нг/мл. Кроме того, при воздействии ТЗ (8,0 нг/мл) обнаружено увеличение в 1,1 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем доли Bcl-2-позитивных клеток из фолликулов F1. **Научная новизна.** Впервые показано снижение чувствительности клеток гранулезы самого большого преовуляторного фолликула к регуляторному влиянию ТЗ на экспрессию маркеров апоптоза семейства Bcl-2 у постаревших кур в конце первого продуктивного периода.

Ключевые слова: куры-несушки, трийодтиронин, преовуляторные фолликулы, клетки гранулезы, апоптоз, белки семейства Bcl-2

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-16-00149).

Для цитирования: Лебедева И. Ю., Митяшова О. С., Монтвила Е. К., Алейникова О. В., Смекалова А. А. Влияние трийодтиронина *in vitro* на экспрессию регуляторов апоптоза семейства Bcl-2 в клетках гранулезы кур-несушек // Аграрный вестник Урала. 2025. Т. 25, № 03. С 459–472. <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2025-25-03-459-472>.

Дата поступления статьи: 13.12.2024, **дата рецензирования:** 03.02.2025, **дата принятия:** 18.02.2025.

The effect of triiodothyronine *in vitro* on the expression of apoptosis regulators of the Bcl-2 family in granulosa cells of laying hens of different ages and reproductive statuses

I. Yu. Lebedeva[✉], O. S. Mityashova, E. K. Montvila, O. V. Aleynikova, A. A. Smekalova

L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Dubrovitsy settlement, Moscow region, Russia

[✉]E-mail: irladv@mail.ru

Abstract. The purpose of the presented work is to characterize *in vitro* the effect of triiodothyronine (T3) on the expression of proapoptotic protein Bax and antiapoptotic protein Bcl-2 in granulosa cells of laying hens in connection with the age-related decline in egg production. **Research methods.** The study was performed on laying hens aged 29–32 weeks with a long egg-laying cycle ($n = 6$) and 69–84 weeks with a short egg-laying cycle ($n = 6$). The two largest preovulatory follicles F1 and F2 were used in the experiments. The cells isolated from the follicles were cultured in the medium containing 10 % fetal bovine serum. After the formation of the monolayer, this medium was replaced with the serum-free medium and the cells were cultured for 48 h in the presence of T3 at a concentration of 0.5–8.0 ng/ml or without T3 (control). The expression of target proteins in follicular cells was assessed by immunocytochemistry using primary antibodies to Bax and Bcl-2. **Results.** When culturing granulosa cells from F1 follicles of young hens, the addition of T3 (1.0–8.0 ng/ml) to the medium led to a 1.1-fold ($p < 0.01...0.05$) increase in the proportion of cells with the positive reaction to Bax and Bcl-2, compared to control, but did not affect this proportion in the case of F2 follicles. In hens with the age-related decline in egg production, T3 increased 1.1–1.2 times ($p < 0.01...0.05$) the Bax expression in the granulosa cell culture from follicles of both categories, but only at a concentration of 8.0 ng/ml. In addition, when exposed to T3 (8.0 ng/ml), a 1.1-fold ($p < 0.05$) increase was found in the proportion of Bcl-2-positive cells from F1 follicles compared to control. **Scientific novelty.** For the first time, a decrease in the sensitivity of granulosa cells of the largest preovulatory follicle to the regulatory effect of T3 on the expression of Bcl-2 family apoptosis markers in middle-aged hens at the end of the first productive period was shown.

Keywords: laying hens, triiodothyronine, preovulatory follicles, granulosa cells, apoptosis, Bcl-2 family proteins

Acknowledgments. The study was supported by the Russian Science Foundation (No. 22-16-00149).

For citation: Lebedeva I. Yu., Mityashova O. S., Montvila E. K., Aleynikova O. V., Smekalova A. A. The effect of triiodothyronine *in vitro* on the expression of apoptosis regulators of the Bcl-2 family in granulosa cells of laying hens of different ages and reproductive statuses. *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2025; 25 (03): 459–472. <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2025-25-03-459-472>. (In Russ.)

Date of paper submission: 13.12.2024, **date of review:** 03.02.2025, **date of acceptance:** 18.02.2025.

Постановка проблемы (Introduction)

Яйценоскость домашних кур постепенно снижается в течение первого продуктивного периода, причем начальные признаки такого снижения могут наблюдаться с 68-й недели жизни, а в коммерческих линиях несушек – после 80-й недели [1; 2]. Первый период яйцекладки, который у современных кроссов может длиться до 100-недельного возраста, завершается периодом линьки – естественной или принудительной (индуцированной) [3]. В этот период происходит трансформация репродуктивных органов, связанная с их регрессией и последующим восстановлением, причем оба процесса обусловлены кардинальными изменениями активности эндокринной системы [4]. После обновления ре-

продуктивной системы у кур наступает следующий продуктивный период, однако их яйценоскость не достигает значений, наблюдаемых в течение первого периода яйцекладки. Возрастные изменения воспроизводительной функции, вызывающие снижение яйценоскости кур к концу первого продуктивного периода, обуславливают экономическую нецелесообразность их дальнейшего содержания в условиях промышленного птицеводства.

Снижение репродуктивного потенциала кур к концу первого продуктивного периода проявляется в ухудшении качества яиц, особенно скорлупы, и в различных нарушениях овариального цикла, которые приводят к укорочению циклов яйцекладки (периодов ежедневной кладки яиц) [1; 5]. К таким

нарушениям относят удлинение межовуляторного интервала, находящегося под контролем циркадных генов, и рост частоты встречаемости ановуляторных циклов при сохранении продолжительности интервала между овуляциями [1; 6]. При этом феномен ановуляции связан либо с атрезией преовуляторных фолликулов, которая практически не наблюдается у молодых кур, либо с внутрибрюшной овуляцией, являющейся, вероятно, следствием нарушения циркадных ритмов в яйцеводе [6; 7]. Вместе с тем снижен интенсивности яйцекладки не происходит синхронно у кур одного возраста [1], что указывает на наличие механизмов, способных тормозить ухудшение репродукции. Изучение таких механизмов, а также факторов, участвующих в их реализации, будет способствовать созданию научной базы для разработки способов продления периода хозяйственного использования птицы.

Постепенное возрастное снижение яйценоскости кур обусловлено старением яичников, которые первыми подвергаются этому деструктивному процессу [8]. Как следствие, ускоряются негативные изменения в других органах и повышается вероятность возникновения различных патологий и дисфункций [8; 9]. Механизмы старения яичников довольно разнообразны, при этом к ключевым триггерам относят окислительный стресс, митохондриальную дисфункцию, нарушение клеточного метаболизма, повреждение ДНК, укорочение теломер и эпигенетические изменения [10–13]. Возрастное ухудшение функции яичника у птиц, как и у млекопитающих, связано прежде всего с истощением запаса примордиальных фолликулов и снижением качества ооцитов и соматических фолликулярных клеток [14]. Вследствие этих процессов происходит изменение продукции репродуктивных гормонов, а также экспрессии соответствующих рецепторов [15; 16].

Яйценоскость кур зависит от комбинации трех типов факторов: эндокринных, генетических и факторов окружающей среды. Среди эндокринных регуляторов яйценоскости выделяют гонадотропин-рилизинг-гормон, пролактин, фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ), а также овариальные стероидные гормоны [17]. К настоящему времени установлено, что гормоны гипофизарно-овариальной оси могут быть вовлечены в регуляцию старения яичников млекопитающих [18], однако их роль в возрастном уменьшении репродуктивного потенциала птиц до сих пор неясна. Так, с возрастом у кур выявлено снижение содержания в гипофизе мРНК α -субъединицы, общей для гонадотропных гормонов, однако оно было ассоциировано только с уровнем ЛГ в крови, но не ФСГ [19]. Недавно была продемонстрирована способность ФСГ ослаблять овариальное старение у домашних кур путем регуляции энергетического метаболизма и защиты ДНК фолликулярных клеток

от повреждающего действия окислительного стресса [20; 21]. Также обнаружено, что возрастному снижению продукции стероидных гормонов в яичнике кур сопутствуют дегенеративные изменения митохондрий и усиление апоптоза в овариальных тканях [22].

Наряду с гормонами гипофизарно-овариальной оси в контроль репродуктивной функции у кур, как и у млекопитающих, вовлечены и другие компоненты эндокринной системы, включая гормоны щитовидной железы, являющиеся ключевыми регуляторами клеточного метаболизма [6; 23]. В яичнике птиц выявлена экспрессия ядерных и мембранных тиреоидных рецепторов, а также дейодиназ, контролирующих локальный метаболизм тиреоидных гормонов, и мембранных транспортеров, необходимых для поступления этих гормонов в клетки [24–26]. Установлено, что содержание трийодтиронина (Т3) в крови птиц влияет на сезонную секрецию гонадотропин-стимулирующего гормона [27]. Во время преовуляторной волны репродуктивных гормонов показано изменение экспрессии компонентов гипофизарно-тиреоидной оси в яичнике индеек, а также баланса гормонов этой оси у индеек и кур-несушек [26; 28]. Это свидетельствует об изменении степени воздействия тиреоидных гормонов на яичник птиц непосредственно перед овуляцией. Кроме того, на модели *in vitro* культивирования продемонстрировано модулирующее действие Т3 на стероидогенную и пролиферативную активность фолликулярных клеток кур [25; 29]. С помощью транскриптомного анализа также выявлена зависимость яичной продуктивности индеек и уток от экспрессии генов, отвечающих за синтез эффекторных белков, опосредующих воздействие тиреоидных гормонов [30; 31].

Ряд имеющихся данных свидетельствует об участии тиреоидных гормонов у млекопитающих в регуляции преждевременного старения яичников и сохранении пула примордиальных фолликулов путем модуляции сигнальных путей, связанных с процессами старения [32]. В то же время с возрастом происходит ухудшение работы щитовидной железы, изменяется ее регуляция [33; 34]. Кроме того, старение влияет на степень воздействия тиреоидных гормонов на клетки-мишени путем модуляции активности дейодиназ, отвечающих за преобразование менее активного тироксина в более активный Т3, а также изменения экспрессии тиреоидных рецепторов [35].

Ранее нами было показано, что содержание тиреоидных гормонов в крови кур-несушек различается в начале и в конце первого продуктивного периода [36]. При этом у птиц с разной интенсивностью репродуктивного старения выявлены различия взаимосвязей между тиреоидными и половыми стероидными гормонами [37]. Следует также отметить, что нарушение функции щитовидной железы

может приводить к изменению экспрессии циркадных генов, контролирующих овуляторный цикл, регуляция которого изменяется в процессе старения кур [6; 38]. Следовательно, необходимы дальнейшие исследования, направленные на выяснение роли тиреоидных гормонов в возрастном снижении яйценоскости кур-несушек.

Как известно, нарушение регуляции программируемой клеточной смерти, включая апоптоз, связано со старением и возрастными заболеваниями [39]. Белки семейства Bcl-2 служат ключевыми регуляторами апоптоза в клетках различного типа, в том числе в клетках гранулезы кур [40; 41]. Они влияют на пермеабиллизацию (проницаемость) внешней мембраны митохондрий и освобождение в цитозоль цитохрома С и других белков, активирующих митохондриальный путь клеточной смерти. При этом антиапоптотические члены этого семейства, в первую очередь белок Bcl-2, контролируют активность проапоптотического белка Вах путем образования с ним гетеродимеров и/или блокирования его взаимодействия с активаторными белками [42].

На основании вышеизложенного цель представленной работы заключалась в изучении *in vitro* влияния трийодтиронина (Т3) на экспрессию белков Вах и Bcl-2, а также на соотношение Вах/Bcl-2 в клетках гранулезы кур-несушек в связи с возрастным снижением яйценоскости.

Методология и методы исследования (Methods)

В экспериментах использовали кур породы Хайсекс Уайт, содержащихся на физиологическом дворе ФИЦ ВИЖ им. Л. К. Эрнста в отдельном помещении с центральным отоплением и принудительной вентиляцией в условиях 12-часового освещения в сутки. Птицам были предоставлены неограниченный доступ к воде и одноразовое кормление комбикормом Purina Special (Nestlé Purina PetCare, США) в соответствии с зоотехническими нормами. Кур содержали в отдельных клетках с целью индивидуального мониторинга яйценоскости и времени снесения яиц, который проводили с помощью видеосистемы. Все исследования на птице выполняли согласно принципам ветеринарной медицинской этики¹ и Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях)².

¹ The veterinarian-client-patient relationship (VCPR) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.avma.org/resources-tools/pet-owners/petcare/veterinarian-client-patient-relationship-vcpr> (дата обращения: 12.12.2024).

² European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123). Strasbourg, 18.03.1986 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.coe.int/en/web/conventions/full-list?module=treaty-detail&treaty-num=123> (дата обращения: 12.12.2024).

Для экспериментов были отобраны две группы птиц, находящихся в первом продуктивном периоде: в возрасте 29–32 недель с длинным циклом яйцекладки (с периодами ежедневной кладки яиц не менее 7 дней, $n = 6$) и в возрасте 69–84 недель с коротким циклом яйцекладки (несущихся ежедневно в течение 3–6 дней, $n = 6$). Овариэктомию кур проводили через 7 ч после снесения яйца, чтобы минимизировать влияние преовуляторного пика репродуктивных гормонов на фолликулярные клетки.

В исследовании использовали два преовуляторных фолликула F1 и F2, где F1 – самый большой фолликул, предназначенный к овуляции в текущем цикле, а F2 – второй по размеру фолликул, предназначенный к овуляции в следующем цикле. Слой гранулезы выделяли в соответствии с методом А. В. Gilbert с соавт. [43] и многократно отмывали от желтка в стерильном фосфатно-солевом растворе Дюльбекко, содержащем 50 мкг/мл гентамицина. После удаления части слоя, прилегающей к зародышевому диску, изолировали гранулезные клетки согласно методике, описанной ранее [1].

Клетки культивировали в чашках Петри на покровных стеклах в среде DMEM, содержащей 25 mM HEPES и 1 г/л глюкозы (Servicebio, КНР), с добавлением 1 mM глутамин (Sigma-Aldrich, США), 10 мл/л раствора антибиотика-антимикотика (Gibco, США) и 10 % сыворотки (Hyclone Laboratories, США). Концентрация клеток в исходной суспензии составляла $0,5 \times 10^6$ клеток/мл среды при жизнеспособности не менее 80 % (окрашивание трипановым синим). После образования монослойной культуры среду заменяли свежей средой без сыворотки, клетки культивировали в течение 48 ч в присутствии Т3 (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 0,5–8,0 нг/мл или без Т3 (контроль). В каждом независимом эксперименте по культивированию использовали клетки, выделенные от одной курицы, при этом все эксперименты проводили в 6 независимых повторностях для каждой группы кур.

Экспрессию целевых белков в гранулезных клетках оценивали иммуноцитохимическим методом, как описано нами ранее [44]. Все этапы обработки клеток, за исключением инкубации с первичными антителами, проводили при комнатной температуре. После культивирования клетки 3 раза промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ, pH 7,4) и фиксировали в течение 15 мин 2-процентным раствором параформальдегида в ФСБ. Затем клетки пермеабиллизировали в течение 15 минут 0,2-процентным раствором Тритона X-100 в ФСБ, промывали 2 раза ФСБ и обрабатывали в течение 1 ч 10-процентным раствором нормальной лошадиной сыворотки (Vector Laboratories, Inc., США) с целью блокирования неспецифического связывания иммуноглобулинов. Препараты инкубировали при 4 °C в течение 18 ч с первичными мышинными

антителами к проапоптотическому белку Вах или антиапоптотическому белку Bcl-2 (все антитела – Atagenix, КНР; разведение 1 : 200), а затем – со вторыми биотинилированными антителами (лошадиными антимышиными иммуноглобулинами; Vector Laboratories, Inc., США; разведение 1 : 100) в течение 30 минут. Визуализацию специфического связывания проводили путем инкубации с реагентом Vectastain ABC в течение 30 минут и коричневым хромофором DAB в течение 5 минут (оба реагента – Vector Laboratories, Inc., США). Микрофотографирование проводили под микроскопом Axio Scope.A1 (Carl Zeiss, Германия), оснащенным цифровой камерой AxioCam ICc5 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении 400х. Уровень экспрессии Вах и Bcl-2 выражали как долю специфически окрашенных в коричневый цвет клеток от общего числа клеток (рис. 1).

Статистическую обработку полученных результатов проводили методом дисперсионного анализа с повторными измерениями при помощи программы SigmaStat 4.0 (Systat Software, Inc., США). Факторами повторных измерений служили концентрация ТЗ в среде культивирования клеток и категория фолликулов (F1 или F2). Данные представлены как средние значения (M) ± стандартные ошибки (SEM). Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с использованием критерия Тьюки.

Результаты (Results)

У молодых кур внесение ТЗ (1,0–8,0 нг/мл) в среду культивирования клеток гранулезы из фолликулов F1 приводило к возрастанию в 1,1 раза ($p < 0,01...0,05$) по сравнению с контролем доли клеток с позитивной реакцией на проапоптотический маркер Вах, но не влияло на эту долю в слу-

чае фолликулов F2 (рис. 2А). При этом экспрессия белка Вах в присутствии 8 нг/мл ТЗ была в 1,1 раза выше ($p < 0,05$) в клетках из фолликулов F1, чем из фолликулов F2.

Сходное стимулирующее влияние ТЗ оказывал и на экспрессию антиапоптотического маркера Bcl-2 (рис. 2Б). Доля Bcl-2-позитивных клеток гранулезы из фолликулов F1 повышалась в 1,1 раза ($p < 0,001...0,01$) при воздействии ТЗ в концентрации 2,0–8,0 нг/мл по сравнению с контролем. В то же время клетки из фолликулов F2 были нечувствительны к модулирующему действию гормона, что приводило к более низкой (в 1,1 раза, $p < 0,05$) экспрессии белка Bcl-2 в присутствии ТЗ (2,0–8,0 нг/мл), чем в клетках из фолликулов F1.

Трийодтиронин не влиял у молодых кур на соотношение уровней экспрессии Вах и Bcl-2 в клетках гранулезы из фолликулов обеих категорий (рис. 2В). Следовательно, гормон не изменял баланс этих сопряженных белков семейства Bcl-2 в гранулезных клетках. Вместе с тем в отсутствие гормона и в присутствии ТЗ в концентрации 0,5 и 4,0 нг/мл это соотношение было в 1,1 раза выше в фолликулах F2, чем в фолликулах F1 ($p < 0,01...0,05$).

У кур с возрастным снижением яйценоскости ТЗ (8,0 нг/мл) усиливал в 1,1–1,2 раза ($p < 0,01...0,05$) экспрессию Вах в культуре клеток гранулезы из фолликулов F1 по сравнению с этими же клетками, культивируемыми в присутствии исследуемого гормона в концентрации 0–1,0 нг/мл (рис. 3А). Кроме того, в случае фолликулов F2 повышение содержания ТЗ в среде с 2,0 до 8,0 нг/мл приводило к возрастанию в 1,1–1,2 раза (по сравнению с контролем и концентрациями гормона 1,0–2,0 нг/мл, $p < 0,05$) доли клеток с позитивной реакцией на Вах.

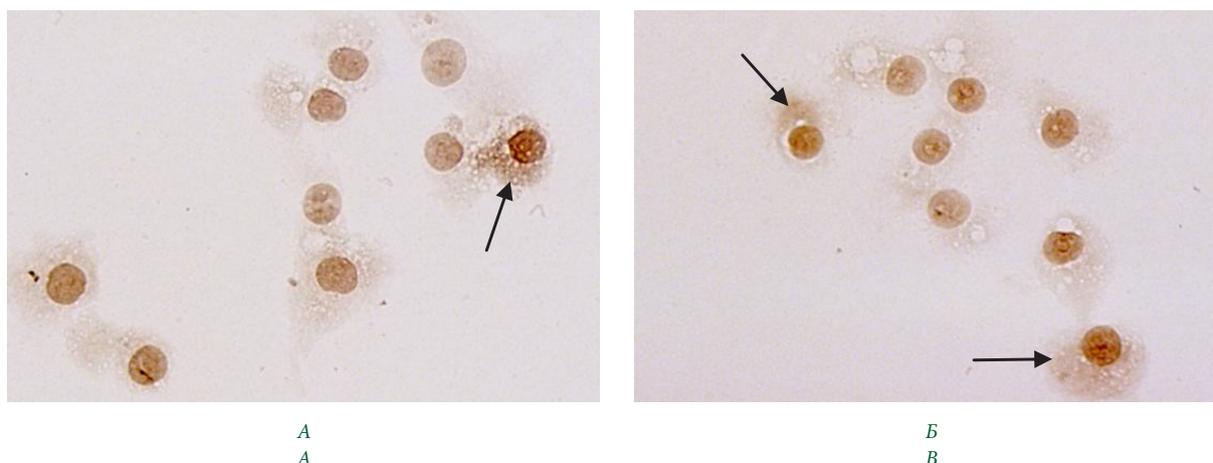


Рис. 1. Иммуноцитохимический анализ экспрессии проапоптотического белка Вах (А) и антиапоптотического белка Bcl2 (Б) в клетках гранулезы кур.

Стрелками показано позитивное окрашивание клеток на Вах и Bcl-2

Fig. 1. Immunocytochemical analysis of the expression of proapoptotic protein Bax (A) and antiapoptotic protein Bcl2 (B) in hen granulosa cells.

Arrows indicate positive staining of cells for Bax and Bcl-2

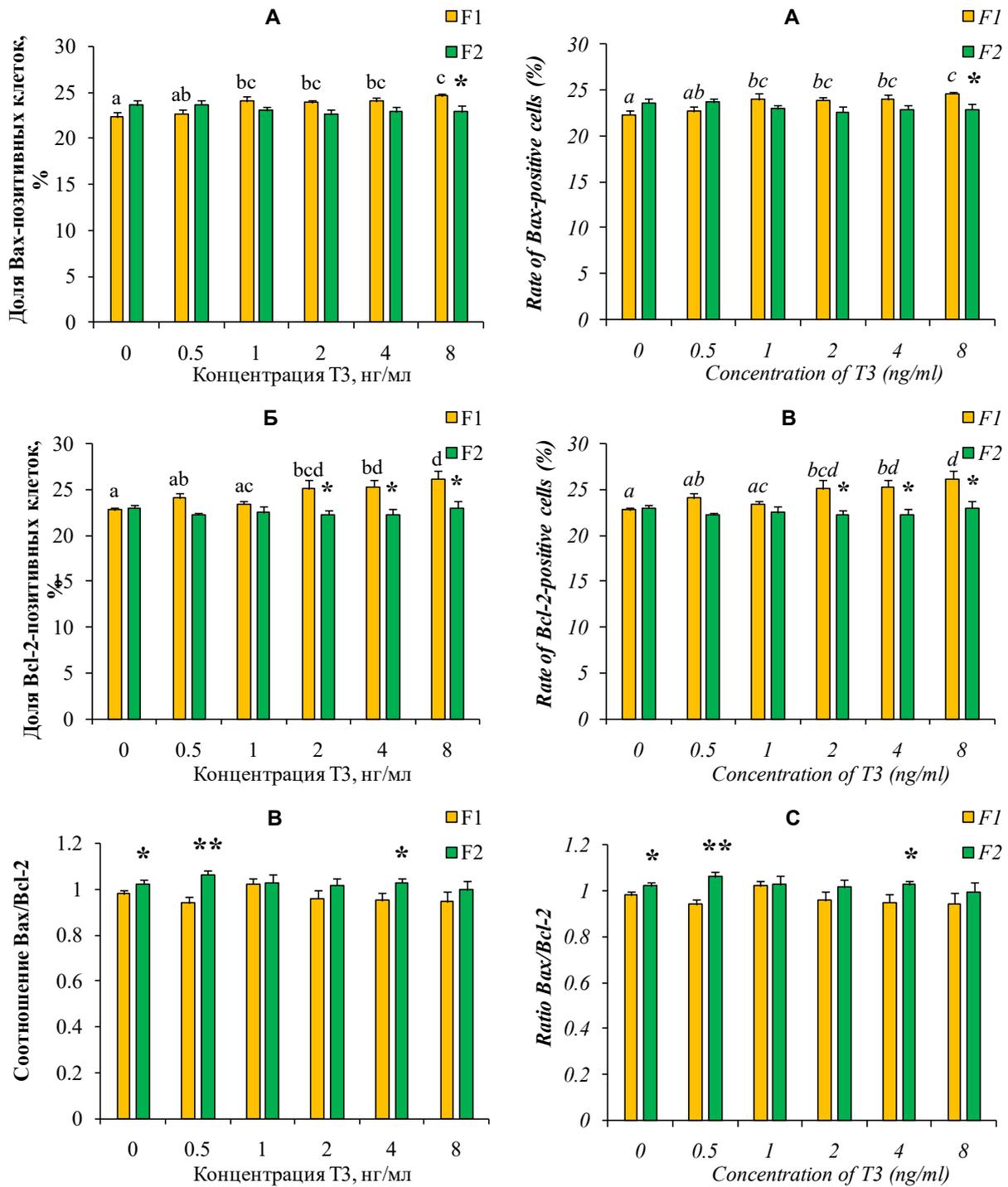


Рис. 2. Экспрессия белков Bax (A) и Bcl-2 (B) и соотношение экспрессии Bax/Bcl-2 (B) в культивируемых клетках гранулезы из преовуляторных фолликулов молодых кур в присутствии трийодтиронина (Т3) в различных концентрациях ($M \pm SEM$). Средние значения, помеченные индексами, не содержащими одинаковых букв, достоверно различаются ($p < 0,001...0,05$; $n = 6$). Звездочки показывают достоверные различия между фолликулами F1 и F2: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Fig. 2. Expression of Bax (A) and Bcl-2 (B) proteins and the Bax/Bcl-2 ratio (C) in cultured granulosa cells from preovulatory follicles of young hens in the presence of triiodothyronine (T3) at different concentrations ($M \pm SEM$). Means marked with indices that do not contain the same letters differ significantly ($p < 0,001...0,05$; $n = 6$). Asterisks indicate significant differences between F1 and F2 follicles: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

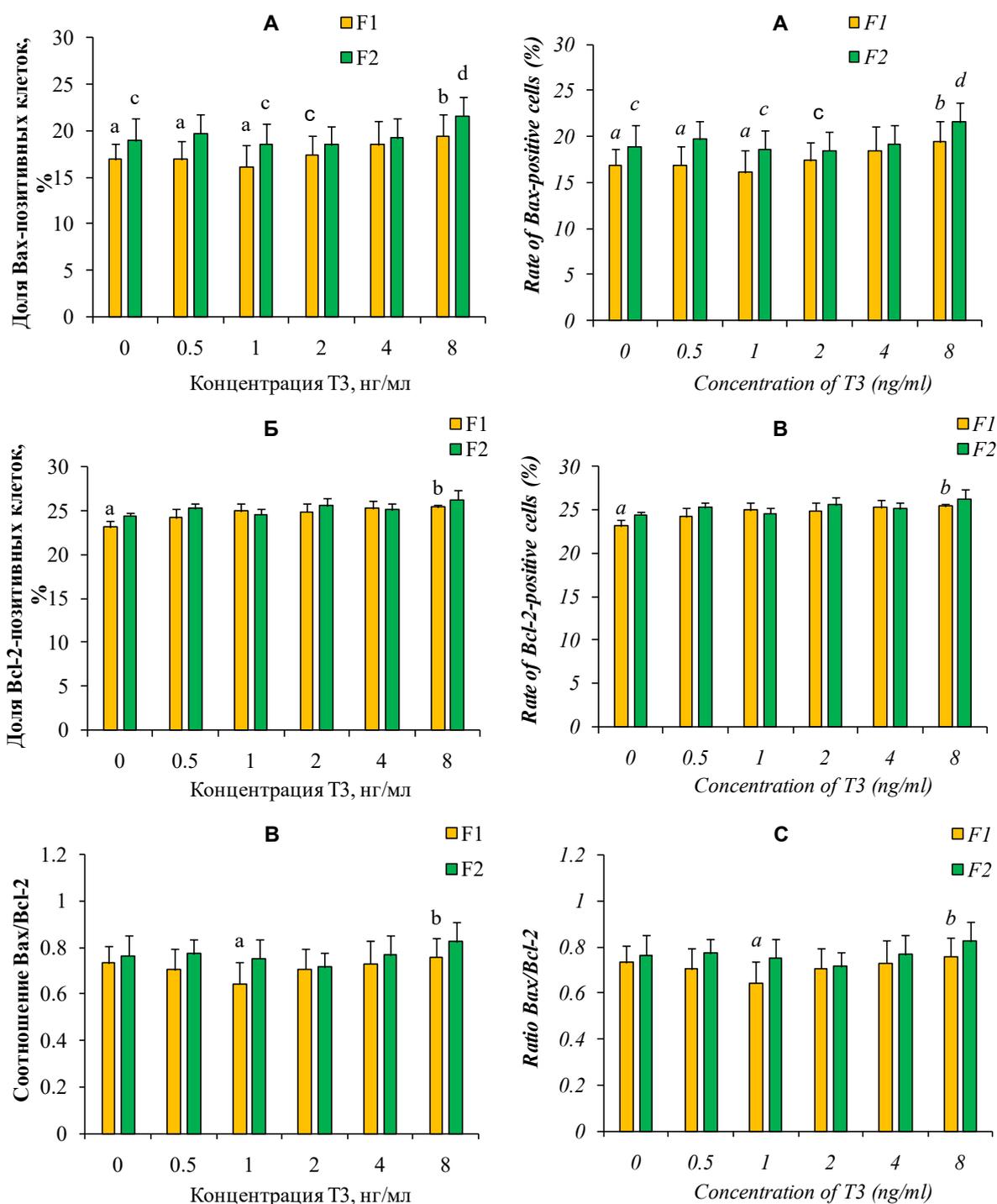


Рис. 3. Экспрессия белков Bax (A) и Bcl-2 (B) и соотношение экспрессии Bax/Bcl-2 (B) в культивируемых клетках гранулезы из преовуляторных фолликулов продуктивно постаревших кур в присутствии трийодтиронина (Т3) в различных концентрациях ($M \pm SEM$). Средние значения, помеченные индексами, не содержащими одинаковых букв, достоверно различаются ($p < 0,01...0,05$; $n = 6$)

Fig. 3. Expression of Bax (A) and Bcl-2 (B) proteins and the Bax/Bcl-2 ratio (C) in cultured granulosa cells from preovulatory follicles of productively-aged hens in the presence of triiodothyronine (T3) at different concentrations ($M \pm SEM$). Means marked with indices that do not contain the same letters differ significantly ($p < 0.01...0.05$; $n = 6$)

Трийодтиронин увеличивал в 1,1 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем экспрессию Bcl-2 в клетках гранулезы из фолликулов F1 при концентрации 8,0 нг/мл (рис. 3Б). В то же время эта экспрессия не зависела от содержания Т3 в культуральной среде в случае фолликулов F2. Соотношение уровней экспрессии Вах и Bcl-2 в клетках из фолликулов F1 было минимальным в присутствии Т3 в концентрации 1,0 нг/мл (рис. 3В). Повышение этой концентрации до 8,0 нг/мл обуславливало возрастание в 1,2 раза ($p < 0,05$) соотношения Вах/Bcl-2, т. е. сдвиг баланса белков семейства Bcl-2 в гранулезных клетках в сторону проапоптотического белка.

Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

Данные, полученные на млекопитающих, свидетельствуют о том, что и гипертиреозное, и гипотиреозное состояние может обуславливать повышение уровня апоптотических изменений в репродуктивных органах [45]. При этом исследования *in vitro* выявили тканевую специфичность характера действия Т3 на апоптоз в клетках-мишенях [46; 47]. В то же время имеется очень мало информации о влиянии гормонов щитовидной железы на резистентность клеток кур к апоптозу. Показано, что введение Т3 курам-несушкам вызывает связанную с апоптозом атрезию преовуляторных фолликулов, а индуцированное понижение уровня Т3 в крови петушков приводит к усилению апоптоза, повышению экспрессии проапоптотического маркера Вах и уменьшению экспрессии антиапоптотического маркера Bcl-2 в семенниках [25; 48]. Кроме того, инъекции Т3 в куриные эмбрионы обуславливали повышение апоптоза в зрительной доле, сопряженное с ростом уровня мРНК, кодирующей Вах [49]. Однако все перечисленные эффекты могут быть опосредованными, что не позволяет охарактеризовать прямое влияние тиреоидных гормонов на апоптоз у кур.

Овариальные фолликулы кур-несушек служат мишенью для воздействия тиреоидных гормонов, что подтверждается экспрессией ядерных и мембранных тиреоидных рецепторов, а также модулирующим действием Т3 *in vitro* на стероидогенез и пролиферацию фолликулярных клеток [25; 29]. В представленной работе впервые выявлена способность Т3 модулировать функционирование митохондриального сигнального пути апоптоза, связанного с белками Вах и Bcl-2, в клетках гранулезы из преовуляторных фолликулов домашней курицы. Эта способность Т3 наблюдалась у молодых кур-несушек уже в диапазоне физиологических концентраций (1–2 нг/мл) [28; 50] и сохранялась вплоть до 8 нг/мл. Однако у репродуктивно постаревших птиц Т3 стимулировал экспрессию белков семейства Bcl-2 только при концентрации 8 нг/мл, которая значительно превышает физиологический диапазон в этом возрасте [36; 37], что свидетель-

ствует об уменьшении чувствительности клеток к гормону.

Необходимо подчеркнуть, что у молодых кур способность клеток гранулезы отвечать на Т3 зависела от степени созревания преовуляторных фолликулов, поскольку стимулирующее влияние гормона на экспрессию Вах и Bcl-2 было обнаружено только в случае наиболее созревших фолликулов F1, предназначенных для овуляции в текущем цикле. Полученные данные в целом согласуются с общепризнанной концепцией о высокой резистентности клеток преовуляторных фолликулов к апоптозу у молодых кур-несушек благодаря повышенной экспрессии антиапоптотических генов, в том числе генов семейства Bcl-2 [51]. В этой связи можно предположить, что устойчивость митохондриального пути апоптоза к воздействию внешних факторов в фолликулах F1 ослабляется вследствие подготовки к перепрограммированию соматических клеток, остающихся в брюшной полости после овуляции яйцеклетки и подвергающихся быстрой регрессии [52]. Вместе с тем следует отметить, что Т3 не влиял на баланс Вах и Bcl-2 и, следовательно, не усиливал связанные с ним апоптотические изменения в гранулезных клетках фолликулов F1 у молодых птиц.

В то же время у постаревших кур с пониженной интенсивностью яйцекладки не было выявлено существенного отличия фолликулов F2 от F1 по чувствительности к Вах-модулирующему действию Т3, что может свидетельствовать об ослаблении резистентности к апоптозу клеток гранулезы из фолликулов обеих категорий. Этот вывод соответствует современным представлениям о повышении атретических (апоптотических) изменений в преовуляторных фолликулах с возрастом кур [51]. При этом в конце первого периода яйцекладки соотношение Вах/Bcl-2 в клетках гранулезы из фолликулов F1 было самым низким *in vitro* при физиологической концентрации 1 нг/мл и повышалось в присутствии 8 нг/мл. Следовательно, у репродуктивно постаревших птиц Т3 в высокой концентрации способен сместить баланс между антиапоптотическими и проапоптотическими белками в сторону последних, уменьшая резистентность гранулезных клеток к апоптозу в фолликулах F1.

В целом результаты нашего исследования показывают снижение чувствительности клеток гранулезы самого большого преовуляторного фолликула к регуляторному влиянию Т3 на экспрессию маркеров апоптоза семейства Bcl-2 у постаревших кур в конце первого продуктивного периода. Кроме того, они свидетельствуют о различной резистентности к апоптозу клеток из фолликулов F1 и F2 у молодых кур и о способности Т3 в высокой концентрации активировать митохондриальный путь апоптоза у репродуктивно постаревших птиц. Для более глу-

бокого понимания роли тиреоидной системы в механизмах возрастного снижения яйценоскости кур необходимы дальнейшие исследования, в том числе

связанные с мониторингом экспрессии тиреоидных рецепторов и дейодиназ в фолликулярных клетках в течение первого периода яйцекладки.

Библиографический список

1. 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 // *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2010. Vol. 8, No. 1. Article number 15. DOI: 10.1186/1477-7827-8-15.
2. Liu X., Lin X., Mi Y., Li J., Zhang C. Grape seed proanthocyanidin extract prevents ovarian aging by inhibiting oxidative stress in the hens // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018. Vol. 2018. Article number 9390810. DOI: 10.1155/2018/9390810.
3. Korver D. R. Review: Current challenges in poultry nutrition, health, and welfare // *Animal*. 2023. Vol. 17, Suppl. 2. Article number 100755. DOI: 10.1016/j.animal.2023.100755.
4. Фисинин В. И., Коноплева А. П. О физиологических и морфологических процессах в организме птицы при естественной и принудительной линьке // *Сельскохозяйственная биология*. 2015. Т. 50, № 6. С. 719–728. DOI: 10.15389/agrobiology.2015.6.719rus.
5. Eltahan H. M., Cho S., Rana M. M., Saleh A. A., Elkomy A. E., Wadaan M. A. M., Alagawany M., Kim I. H., Eltahan H. M. Dietary exogenous phytase improve egg quality, reproductive hormones, and prolongs the lifetime of the aging Hy-Line brown laying hens fed nonphytate phosphorus // *Poultry Science*. 2023. Vol. 102, No. 9. Article number 102895. DOI: 10.1016/j.psj.2023.102895.
6. Scanes C. G. Discontinuities in understanding follicular development, the ovulatory cycle and the oviposition cycles in the hen: advances, opportunities, slow downs and complete stops // *Frontiers in Physiology*. 2022. Vol. 13. Article number 1023528. DOI: 10.3389/fphys.2022.1023528.
7. Navara K. J., Pinson S. E., Chary P., Taube P. C. Higher rates of internal ovulations occur in broiler breeder hens treated with testosterone // *Poultry Science*. 2015. Vol. 94, No. 6. Pp. 1346–1352. DOI: 10.3382/ps/pev103.
8. Tesarik J., Galán-Lázaro M., Mendoza-Tesarik R. Ovarian aging: molecular mechanisms and medical management // *International Journal of Molecular Sciences* 2021. Vol. 22, No. 3. Article number 1371. DOI: 10.3390/ijms22031371.
9. López-Otín C., Blasco M. A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. Hallmarks of aging: an expanding universe // *Cell*. 2023. Vol. 186. No. 2. Pp. 243–278. DOI: 10.1016/j.cell.2022.11.001.
10. Yan F., Zhao Q., Li Y., Zheng Z., Kong X., Shu C., Liu Y., Shi Y. The role of oxidative stress in ovarian aging: a review // *Journal of Ovarian Research*. 2022. Vol. 15, No. 1. Article number: 100. DOI: 10.1186/s13048-022-01032-x.
11. Chiang J. L., Shukla P., Pagidas K., Ahmed N. S., Karri S., Gunn D. D., Hurd W. W., Singh K. K. Mitochondria in ovarian aging and reproductive longevity // *Ageing Research Reviews*. 2020. Vol. 63. Article number 101168. DOI: 10.1016/j.arr.2020.101168.
12. Bao S., Yin T., Liu S. Ovarian aging: energy metabolism of oocytes // *Journal of Ovarian Research*. 2024. Vol. 17, No. 1. Article number 118. DOI: 10.1186/s13048-024-01427-y.
13. Zhu Z., Xu W., Liu L. Ovarian aging: mechanisms and intervention strategies // *Medical Review*. 2022. Vol. 2, No. 6. Pp. 590–610. DOI: 10.1515/mr-2022-0031.
14. Hao E. Y., Chen H., Wang D. H., Huang C. X., Tong Y. G., Chen Y. F., Zhou R. Y., Huang R. L. Melatonin regulates the ovarian function and enhances follicle growth in aging laying hens via activating the mammalian target of rapamycin pathway // *Poultry Science*. 2020. Vol. 99, No. 4. Pp. 2185–2195. DOI: 10.1016/j.psj.2019.11.040.
15. Tatone C., Amicarelli F., Carbone M. C., Monteleone P., Caserta D., Marci R., Artini P. G., Piomboni P., Focarelli R. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing // *Human Reproduction Update*. 2008. Vol. 14, No. 2. Pp. 131–142. DOI: 10.1093/humupd/dmm048.
16. Camaioni A., Ucci M. A., Campagnolo L., De Felici M., Klinger F. G. The process of ovarian aging: it is not just about oocytes and granulosa cells // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2022. Vol. 39, No. 4. Pp. 783–792. DOI: 10.1007/s10815-022-02478-0.
17. Du Y., Liu L., He Y., Dou T., Jia J., Ge C. Endocrine and genetic factors affecting egg laying performance in chickens: a review // *British Poultry Science*. 2020. Vol. 61, No. 5. Pp. 538–549. DOI: 10.1080/00071668.2020.1758299.
18. Colella M., Cuomo D., Peluso T., Falanga I., Mallardo M., De Felice M., Ambrosino C. Ovarian aging: role of pituitary-ovarian axis hormones and ncRNAs in regulating ovarian mitochondrial activity // *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. 2021. Vol. 12. Article number 791071. DOI: 10.3389/fendo.2021.791071.

19. Ciccone N. A., Sharp P. J., Wilson P. W., Dunn I. C. Changes in reproductive neuroendocrine mRNAs with decreasing ovarian function in ageing hens // *General and Comparative Endocrinology*. 2005. Vol. 144, No. 1. Pp. 20–27. DOI: 10.1016/j.ygcen.2005.04.009.
20. Zhou S., Zhao A., Wu Y., Bao T., Mi Y., Zhang C. Protective effect of follicle-stimulating hormone on DNA damage of chicken follicular granulosa cells by inhibiting CHK2/p53 // *Cells*. 2022. Vol. 11, No. 8. Article number 1291. DOI: 10.3390/cells11081291.
21. Dong J., Guo C., Yang Z., Wu Y., Zhang C. Follicle-stimulating hormone alleviates ovarian aging by modulating mitophagy- and glycolysis-based energy metabolism in hens // *Cells*. 2022. Vol. 11, No. 20. Article number 3270. DOI: 10.3390/cells11203270.
22. Zhan X. Z., Luo P., Zhang C., Zhang L. J., Shen X., Jiang D. L., Liu W. J. Age-related changes in the mitochondrial, synthesis of steroids, and cellular homeostasis of the chicken ovary // *Animal Reproduction Science*. 2024. Vol. 267. Article number 107540. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2024.107540.
23. Brown E. D. L., Obeng-Gyasi B., Hall J. E., Shekhar S. The thyroid hormone axis and female reproduction // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, No. 12. Article number 9815. DOI: 10.3390/ijms24129815.
24. McNabb F. M. The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in birds and its role in bird development and reproduction // *Critical Reviews in Toxicology*. 2007. Vol. 37, No. 1-2. Pp. 163–193. DOI: 10.1080/10408440601123552.
25. Sechman A. The role of thyroid hormones in regulation of chicken ovarian steroidogenesis // *General and Comparative Endocrinology*. 2013. Vol. 190. Pp. 68–75. DOI: 10.1016/j.ygcen.2013.04.012.
26. Brady K., Long J. A., Liu H. C., Porter T. E. Characterization of hypothalamo-pituitary-thyroid axis gene expression in the hypothalamus, pituitary gland, and ovarian follicles of turkey hens during the preovulatory surge and in hens with low and high egg production // *Poultry Science*. 2021. Vol. 100. No. 4. Article number 100928. DOI: 10.1016/j.psj.2020.12.026.
27. Guh Y. J., Tamai T. K., Yoshimura T. The underlying mechanisms of vertebrate seasonal reproduction // *Proceedings of the Japan Academy. Series B: Physical and Biological Sciences*. 2019. Vol. 95, No. 7. Pp. 343–357. DOI: 10.2183/pjab.95.025.
28. Лебедева И. Ю., Митяшова О. С., Алейникова О. В., Монтвила Е. К. Уровни гормонов гипофизарно-тиреоидной оси и их связь с овариальными гормонами во время овуляторного цикла у молодых кур-несушек (*Gallus Domesticus* L.) // *Сельскохозяйственная биология*. 2024. Т. 59, № 6. С. 1169–1178. DOI: 10.15389/agrobiology.2024.6.1169rus.
29. Лебедева И. Ю., Митяшова О. С., Смекалова А. А., Алейникова О. В., Монтвила Е. К. Функциональная активность клеток из преовуляторных фолликулов кур (*Gallus domesticus* L.) при воздействии трийодтиронина *in vitro* // *Сельскохозяйственная биология*. 2024. Т. 59, № 4. С. 749–758. DOI: 10.15389/agrobiology.2024.4.749rus.
30. Bao X., Song Y., Li T., Zhang S., Huang L., Zhang S., Cao J., Liu X., Zhang J. Comparative transcriptome profiling of ovary tissue between black muscovy duck and white muscovy duck with high- and low-egg production // *Genes (Basel)*. 2020. Vol. 12, No. 1. Article number 57. DOI: 10.3390/genes12010057.
31. Brady K., Liu H. C., Hicks J. A., Long J. A., Porter T. E. Transcriptome analysis during follicle development in turkey hens with low and high egg production // *Frontiers in Genetics*. 2021. Vol. 12. Article number 619196. DOI: 10.3389/fgene.2021.619196.
32. Colella M., Cuomo D., Giacco A., Mallardo M., De Felice M., Ambrosino C. Thyroid hormones and functional ovarian reserve: systemic vs. peripheral dysfunctions // *Journal of Clinical Medicine*. 2020. Vol. 9, No. 6. Article number 1679. DOI: 10.3390/jcm9061679.
33. Da Costa V. M., Moreira D. G., Rosenthal D. Thyroid function and aging: gender-related differences // *Journal of Endocrinology*. 2001. Vol. 171, No. 1. Pp. 193–198. DOI: 10.1677/joe.0.1710193.
34. Jasim S., Gharib H. Thyroid and aging // *Endocrine Practice*. 2018. Vol. 24, No. 4. Pp. 369–374. DOI: 10.4158/EP171796.RA.
35. Silvestri E., Lombardi A., de Lange P., Schiavo L., Lanni A., Goglia F., Visser T. J., Moreno M. Age-related changes in renal and hepatic cellular mechanisms associated with variations in rat serum thyroid hormone levels // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2008. Vol. 294, No. 6. Pp. 1160–1168. DOI: 10.1152/ajpendo.00044.2008.
36. Лебедева И. Ю., Митяшова О. С., Алейникова О. В., Монтвила Е. К., Лахонин П. Д., Колесник Н. С. Возрастные изменения содержания в крови микроэлементов, связанных с активностью тиреоидной системы у кур-несушек // *Зоотехния*. 2024. № 11. С. 27–30. DOI: 10.25708/ZT.2024.66.29.007.

37. Лебедева И. Ю., Митяшова О. С., Алейникова О. В., Монтвила Е. К., Смекалова А. А. Возрастная вариабельность уровней половых и тиреоидных гормонов в крови кур-несушек в связи с интенсивностью репродуктивного старения // Зоотехния. 2024. № 12. С. 37–40. DOI: 10.25708/ZT.2024.63.68.010.
38. Fu J., Fan Z., He L., Liu Q., Liu H., Li Y., Guan H. Circadian clock disruption in autoimmune thyroiditis // European Thyroid Journal. 2023. Vol. 12, No. 5. Article number e230035. DOI: 10.1530/ETJ-23-0035.
39. Tower J. Programmed cell death in aging // Ageing Research Reviews. 2015. Vol. 23, Pt A. Pp. 90–100. DOI: 10.1016/j.arr.2015.04.002.
40. King L. E., Hohorst L., García-Sáez A. J. Expanding roles of BCL-2 proteins in apoptosis execution and beyond // Journal of Cell Science. 2023. Vol. 136, No. 22. Article number jcs260790. DOI: 10.1242/jcs.260790.
41. Cheng B., Shi Y., Wu Q., Wang Y., Ma Y. Selenium protects follicular granulosa cells from apoptosis induced by mercury through inhibition of ATF6/CHOP pathway in laying hens // Biological Trace Element Research. 2023. Vol. 201, No. 11. Pp. 5368–5378. DOI: 10.1007/s12011-023-03589-0.
42. Spitz A. Z., Gavathiotis E. Physiological and pharmacological modulation of BAX // Trends in Pharmaceutical Sciences. 2022. Vol. 43, No. 3. Pp. 206–220. DOI: 10.1016/j.tips.2021.11.001.
43. Gilbert A. B., Evans A. J., Perry M. M., Davidson M. H. A method for separating the granulosa cells, the basal lamina and the theca of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*) // Journal of Reproduction and Fertility. 1977. Vol. 50, No. 1. Pp. 179–181. DOI: 10.1530/jrf.0.0500179.
44. 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.
45. Silva J. F., Ocarino N. M., Serakides R. Thyroid hormones and female reproduction // Biology of Reproduction. 2018. Vol. 99, No. 5. Pp. 907–921. DOI: 10.1093/biolre/iou115.
46. Upadhyay G., Singh R., Kumar A., Kumar S., Kapoor A., Godbole M. M. Severe hyperthyroidism induces mitochondria-mediated apoptosis in rat liver // Hepatology. 2004. Vol. 39, No. 4. Pp. 1120–1130. DOI: 10.1002/hep.20085.
47. Canipari R., Mangialardo C., Di Paolo V., Alfei F., Ucci S., Russi V., Santaguida M. G., Virili C., Segni M., Misiti S., Centanni M., Verga Falzacappa C. Thyroid hormones act as mitogenic and pro survival factors in rat ovarian follicles // Journal of Endocrinological Investigation. 2019. Vol. 42, No. 3. Pp. 271–282. DOI: 10.1007/s40618-018-0912-2.
48. Huang Y., Li W., Xu D., Li B., Tian Y., Zan L. Effect of dietary selenium deficiency on the cell apoptosis and the level of thyroid hormones in chicken // Biological Trace Element Research. 2016. Vol. 171, No. 2. Pp. 445–452. DOI: 10.1007/s12011-015-0534-x.
49. Ghorbel M., Seugnet I., Ableitner A.M., Hassan A., Demeneix B. A. T3 treatment increases mitosis, then bax expression and apoptosis in the optic lobe of the chick embryo // Neuroscience Letters. 1997. Vol. 231, No. 3. Pp. 127–130. DOI: 10.1016/s0304-3940(97)00541-7.
50. Sahin K., Küçük O. A simple way to reduce heat stress in laying hens as judged by egg laying, body weight gain and biochemical parameters // Acta Veterinaria Hungarica. 2001. Vol. 49, No. 4. Pp. 421–430. DOI: 10.1556/004.49.2001.4.6.
51. Johnson A. L. Ovarian follicle selection and granulosa cell differentiation // Poultry Science. 2015. Vol. 94, No. 4. Pp. 781–785. DOI: 10.3382/ps/peu008.
52. Sundaresan N. R., Saxena V. K., Sastry K. V., Anish D., Saxena M., Nagarajan K., Ahmed K. A. Nitric oxide: a possible mediator of ovulation and postovulatory follicle regression in chicken // Animal Reproduction Science. 2007. Vol. 101, No. 3–4. Pp. 351–357. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2007.01.011.

Об авторах:

Ирина Юрьевна Лебедева, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией биологических проблем репродукции животных, Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста, п. Дубровицы, Московская область, Россия; ORCID 0000-0002-7815-7900, AuthorID 92926. E-mail: irldev@mail.ru

Ольга Сергеевна Митяшова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических проблем репродукции животных, Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста, п. Дубровицы, Московская область, Россия; ORCID 0000-0002-0401-5088, AuthorID 697834. E-mail: mityashova_o@mail.ru

Елена Кястучо Монтвила, младший научный сотрудник лаборатории биологических проблем репродукции животных, Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста, п. Дубровицы, Московская область, Россия; ORCID 0000-0002-4341-2019, AuthorID 1046614. E-mail: montvila94@bk.ru

Ольга Викторовна Алейникова, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биологических проблем репродукции животных, Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста, п. Дубровицы, Московская область, Россия; ORCID 0000-0003-2583-0492, AuthorID 1046552. E-mail: 68ovk@mail.ru

Араксия Ашотовна Смекалова, младший научный сотрудник лаборатории биологических проблем репродукции животных, Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста, п. Дубровицы, Московская область, Россия; ORCID 0009-0005-4243-1719, AuthorID 859659. E-mail: araksia86@mail.ru

References

1. 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. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2010; 8 (1): 15. DOI: 10.1186/1477-7827-8-15.
2. Liu X., Lin X., Mi Y., Li J., Zhang C. Grape seed proanthocyanidin extract prevents ovarian aging by inhibiting oxidative stress in the hens. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018; 2018: 9390810. DOI: 10.1155/2018/9390810.
3. Korver D. R. Review: Current challenges in poultry nutrition, health, and welfare. *Animal*. 2023; 17 (2): 100755. DOI: 10.1016/j.animal.2023.100755.
4. Fisinin V. I., Konopleva A. P. About physiological and morphological processes in poultry at natural and induced molting. *Agricultural Biology*. 2015; 50 (6): 719–728. DOI: 10.15389/agrobiology.2015.6.719rus. (In Russ.)
5. Eltahan H. M., Cho S., Rana M. M., Saleh A. A., Elkomy A. E., Wadaan M. A. M., Alagawany M., Kim I. H., Eltahan H. M. Dietary exogenous phytase improve egg quality, reproductive hormones, and prolongs the lifetime of the aging Hy-Line brown laying hens fed nonphytate phosphorus. *Poultry Science*. 2023; 102 (9): 102895. DOI: 10.1016/j.psj.2023.102895.
6. Scanes C. G. Discontinuities in understanding follicular development, the ovulatory cycle and the oviposition cycles in the hen: advances, opportunities, slow downs and complete stops. *Frontiers in Physiology*. 2022; 13: 1023528. DOI: 10.3389/fphys.2022.1023528.
7. Navara K. J., Pinson S. E., Chary P., Taube P. C. Higher rates of internal ovulations occur in broiler breeder hens treated with testosterone. *Poultry Science*. 2015; 94 (6): 1346–1352. DOI: 10.3382/ps/pev103.
8. Tesarik J., Galán-Lázaro M., Mendoza-Tesarik R. Ovarian aging: molecular mechanisms and medical management. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22 (3): 1371. DOI: 10.3390/ijms22031371.
9. López-Otín C., Blasco M. A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. Hallmarks of aging: an expanding universe. *Cell*. 2023; 186 (2): 243–278. DOI: 10.1016/j.cell.2022.11.001.
10. Yan F., Zhao Q., Li Y., Zheng Z., Kong X., Shu C., Liu Y., Shi Y. The role of oxidative stress in ovarian aging: a review. *Journal of Ovarian Research*. 2022; 15 (1): 100. DOI: 10.1186/s13048-022-01032-x.
11. Chiang J. L., Shukla P., Pagidas K., Ahmed N. S., Karri S., Gunn D. D., Hurd W. W., Singh K. K. Mitochondria in ovarian aging and reproductive longevity. *Ageing Research Reviews*. 2020; 63: 101168. DOI: 10.1016/j.arr.2020.101168.
12. Bao S., Yin T., Liu S. Ovarian aging: energy metabolism of oocytes. *Journal of Ovarian Research*. 2024; 17 (1): 118. DOI: 10.1186/s13048-024-01427-y.
13. Zhu Z., Xu W., Liu L. Ovarian aging: mechanisms and intervention strategies. *Medical Review (2021)*. 2022; 2 (6): 590–610. DOI: 10.1515/mr-2022-0031.
14. Hao E. Y., Chen H., Wang D. H., Huang C. X., Tong Y. G., Chen Y. F., Zhou R. Y., Huang R. L. Melatonin regulates the ovarian function and enhances follicle growth in aging laying hens via activating the mammalian target of rapamycin pathway. *Poultry Science*. 2020; 99 (4): 2185–2195. DOI: 10.1016/j.psj.2019.11.040
15. Tatone C., Amicarelli F., Carbone M.C., Monteleone P., Caserta D., Marci R., Artini P. G., Piomboni P., Focarelli R. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Human Reproduction Update*. 2008; 14 (2): 131–142. DOI: 10.1093/humupd/dmm048.
16. Camaioni A., Ucci M. A., Campagnolo L., De Felici M., Klinger F. G. The process of ovarian aging: it is not just about oocytes and granulosa cells. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2022; 39 (4): 783–792. DOI: 10.1007/s10815-022-02478-0.
17. Du Y., Liu L., He Y., Dou T., Jia J., Ge C. Endocrine and genetic factors affecting egg laying performance in chickens: a review. *British Poultry Science*. 2020; 61 (5): 538–549. DOI: 10.1080/00071668.2020.1758299.
18. Colella M., Cuomo D., Peluso T., Falanga I., Mallardo M., De Felice M., Ambrosino C. Ovarian aging: role of pituitary-ovarian axis hormones and ncRNAs in regulating ovarian mitochondrial activity. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. 2021; 12: 791071. DOI: 10.3389/fendo.2021.791071.

19. Ciccone N. A., Sharp P. J., Wilson P. W., Dunn I. C. Changes in reproductive neuroendocrine mRNAs with decreasing ovarian function in ageing hens. *General and Comparative Endocrinology*. 2005; 144 (1): 20–27. DOI: 10.1016/j.ygcen.2005.04.009.
20. Zhou S., Zhao A., Wu Y., Bao T., Mi Y., Zhang C. Protective effect of follicle-stimulating hormone on DNA damage of chicken follicular granulosa cells by inhibiting CHK2/p53. *Cells*. 2022; 11 (8): 1291. DOI: 10.3390/cells11081291.
21. Dong J., Guo C., Yang Z., Wu Y., Zhang C. Follicle-stimulating hormone alleviates ovarian aging by modulating mitophagy- and glycolysis-based energy metabolism in hens. *Cells*. 2022; 11 (20): 3270. DOI: 10.3390/cells11203270.
22. Zhan X. Z., Luo P., Zhang C., Zhang L. J., Shen X., Jiang D. L., Liu W. J. Age-related changes in the mitochondrial, synthesis of steroids, and cellular homeostasis of the chicken ovary. *Animal Reproduction Science*. 2024; 267: 107540. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2024.107540.
23. Brown E. D. L., Obeng-Gyasi B., Hall J. E., Shekhar S. The thyroid hormone axis and female reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24 (12): 9815. DOI: 10.3390/ijms24129815.
24. McNabb F. M. The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in birds and its role in bird development and reproduction. *Critical Reviews in Toxicology*. 2007; 37 (1-2): 163–193. DOI: 10.1080/10408440601123552.
25. Sechman A. The role of thyroid hormones in regulation of chicken ovarian steroidogenesis. *General and Comparative Endocrinology*. 2013; 190: 68–75. DOI: 10.1016/j.ygcen.2013.04.012.
26. Brady K., Long J. A., Liu H. C., Porter T. E. Characterization of hypothalamo-pituitary-thyroid axis gene expression in the hypothalamus, pituitary gland, and ovarian follicles of turkey hens during the preovulatory surge and in hens with low and high egg production. *Poultry Science*. 2021; 100 (4): 100928. DOI: 10.1016/j.psj.2020.12.026.
27. Guh Y. J., Tamai T. K., Yoshimura T. The underlying mechanisms of vertebrate seasonal reproduction. *Proceedings of the Japan Academy. Series B: Physical and Biological Sciences*. 2019; 95 (7): 343–357. DOI: 10.2183/pjab.95.025.
28. Lebedeva I. Yu., Mityashova O. S., Smekalova A. A., Aleynikova O. V., Montvila E. K. The levels of pituitary-thyroid axis hormones and their relationship with ovarian hormones during the ovulatory cycle of young laying hens (*Gallus domesticus L.*). *Agricultural Biology*. 2024; 59 (6): 1169–1178. DOI: 10.15389/agrobiol.2024.6.1169eng.
29. Lebedeva I. Yu., Mityashova O. S., Smekalova A. A., Aleynikova O. V., Montvila E. K. The functional activity of cells from preovulatory follicles of hens (*Gallus domesticus L.*) under influence of triiodothyronine *in vitro*. *Agricultural Biology*. 2024; 59 (4): 749–758. DOI: 10.15389/agrobiol.2024.4.749eng.
30. Bao X., Song Y., Li T., Zhang S., Huang L., Zhang S., Cao J., Liu X., Zhang J. Comparative transcriptome profiling of ovary tissue between black muscovy duck and white muscovy duck with high- and low-egg production. *Genes (Basel)*. 2020; 12(1): 57. DOI: 10.3390/genes12010057.
31. Brady K., Liu H. C., Hicks J. A., Long J. A., Porter T. E. Transcriptome analysis during follicle development in turkey hens with low and high egg production. *Frontiers in Genetics*. 2021; 12: 619196. DOI: 10.3389/fgene.2021.619196.
32. Colella M., Cuomo D., Giacco A., Mallardo M., De Felice M., Ambrosino C. Thyroid hormones and functional ovarian reserve: systemic vs. peripheral dysfunctions. *Journal of Clinical Medicine*. 2020; 9 (6): 1679. DOI: 10.3390/jcm9061679.
33. Da Costa V. M., Moreira D. G., Rosenthal D. Thyroid function and aging: gender-related differences. *Journal of Endocrinology*. 2001; 171 (1): 193–198. DOI: 10.1677/joe.0.1710193.
34. Jasim S., Gharib H. Thyroid and aging. *Endocrine Practice*. 2018; 24 (4): 369–374. DOI: 10.4158/EP171796.RA.
35. Silvestri E., Lombardi A., de Lange P., Schiavo L., Lanni A., Goglia F., Visser T. J., Moreno M. Age-related changes in renal and hepatic cellular mechanisms associated with variations in rat serum thyroid hormone levels. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2008; 294 (6): 1160–1168. DOI: 10.1152/ajpendo.00044.2008.
36. Lebedeva I. Yu., Mityashova O. S., Aleynikova O. V., Montvila E. K., Lakhonin P. D., Kolesnik N. S. Age-related changes in the blood levels of trace elements associated with the activity of the thyroid system in laying hens. *Zootechny*. 2024; 11: 27–30. DOI: 10.25708/ZT.2024.66.29.007. (In Russ.)
37. Lebedeva I. Yu., Mityashova O. S., Aleynikova O. V., Montvila E. K., Smekalova A. A. Age-related variability of sex and thyroid hormone levels in the blood of laying hens in connection with the intensity of reproductive aging. *Zootechny*. 2024; 12: 37–40. DOI: 10.25708/ZT.2024.63.68.010. (In Russ.)
38. Fu J., Fan Z., He L., Liu Q., Liu H., Li Y., Guan H. Circadian clock disruption in autoimmune thyroiditis. *European Thyroid Journal*. 2023; 12 (5): 230035. DOI: 10.1530/ETJ-23-0035.

39. Tower J. Programmed cell death in aging. *Ageing Research Reviews*. 2015; 23 (A): 90–100. DOI: 10.1016/j.arr.2015.04.002.
40. King L. E., Hohorst L., García-Sáez A. J. Expanding roles of BCL-2 proteins in apoptosis execution and beyond. *Journal of Cell Science*. 2023; 136 (22): jcs260790. DOI: 10.1242/jcs.260790.
41. Cheng B., Shi Y., Wu Q., Wang Y., Ma Y. Selenium protects follicular granulosa cells from apoptosis induced by mercury through inhibition of ATF6/CHOP pathway in laying hens. *Biological Trace Element Research*. 2023; 201 (11): 5368–5378. DOI: 10.1007/s12011-023-03589-0.
42. Spitz A. Z., Gavathiotis E. Physiological and pharmacological modulation of BAX. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2022; 43 (3): 206–220. DOI: 10.1016/j.tips.2021.11.001.
43. Gilbert A. B., Evans A. J., Perry M. M., Davidson M. H. A method for separating the granulosa cells, the basal lamina and the theca of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Journal of Reproduction and Fertility*. 1977; 50 (1): 179–181. DOI: 10.1530/jrf.0.0500179.
44. Smekalova A. A., Mityashova O. S., Aleynikova O. V., Montvila E. K., Lebedeva I. Yu. Modulating effect of growth hormone on the functional state of cultured cells from hen preovulatory follicles. *Animal Genetics and Breeding*. 2021; 4: 108–113. DOI: 10.31043/2410-2733-2021-4-108-113. (In Russ.)
45. Silva J. F., Ocarino N. M., Serakides R. Thyroid hormones and female reproduction. *Biology of Reproduction*. 2018; 99 (5): 907–921. DOI: 10.1093/biolre/iroy115.
46. Upadhyay G., Singh R., Kumar A., Kumar S., Kapoor A., Godbole M. M. Severe hyperthyroidism induces mitochondria-mediated apoptosis in rat liver. *Hepatology*. 2004; 39 (4): 1120–1130. DOI: 10.1002/hep.20085.
47. Canipari R., Mangialardo C., Di Paolo V., Alfei F., Ucci S., Russi V., Santaguida M. G., Virili C., Segni M., Misiti S., Centanni M., Verga Falzacappa C. Thyroid hormones act as mitogenic and pro survival factors in rat ovarian follicles. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2019; 42 (3): 271–282. DOI: 10.1007/s40618-018-0912-2.
48. Huang Y., Li W., Xu D., Li B., Tian Y., Zan L. Effect of dietary selenium deficiency on the cell apoptosis and the level of thyroid hormones in chicken. *Biological Trace Element Research*. 2016; 171 (2): 445–452. DOI: 10.1007/s12011-015-0534-x.
49. Ghorbel M., Seugnet I., Ableitner A.M., Hassan A., Demeneix B. A. T3 treatment increases mitosis, then bax expression and apoptosis in the optic lobe of the chick embryo. *Neuroscience Letters*. 1997; 231 (3): 127–130. DOI: 10.1016/s0304-3940(97)00541-7.
50. Sahin K., Küçük O. A simple way to reduce heat stress in laying hens as judged by egg laying, body weight gain and biochemical parameters. *Acta Veterinaria Hungarica*. 2001; 49 (4): 421–430. DOI: 10.1556/004.49.2001.4.6.
51. Johnson A. L. Ovarian follicle selection and granulosa cell differentiation. *Poultry Science*. 2015; 94 (4): 781–785. DOI: 10.3382/ps/peu008.
52. Sundaresan N. R., Saxena V. K., Sastry K. V., Anish D., Saxena M., Nagarajan K., Ahmed K. A. Nitric oxide: a possible mediator of ovulation and postovulatory follicle regression in chicken. *Animal Reproduction Science*. 2007; 101 (3-4): 351–357. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2007.01.011.

Authors' information:

Irina Yu. Lebedeva, doctor of biological sciences, chief researcher, head of laboratory of biological problems of animal reproduction, L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Dubrovitsy settlement, Moscow region, Russia; ORCID 0000-0002-7815-7900, AuthorID 92926. *E-mail: irledv@mail.ru*

Olga S. Mityashova, candidate of biological sciences, senior researcher of laboratory of biological problems of animal reproduction, L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Dubrovitsy settlement, Moscow region, Russia; ORCID 0000-0002-0401-5088, AuthorID 697834. *E-mail: mityashova_o@mail.ru*

Elena K. Montvila, junior researcher of laboratory of biological problems of animal reproduction, L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Dubrovitsy settlement, Moscow region, Russia; ORCID 0000-0002-4341-2019, AuthorID 1046614. *E-mail: montvila94@bk.ru*

Olga V. Aleynikova, candidate of biological sciences, researcher of laboratory of biological problems of animal reproduction, L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Dubrovitsy settlement, Moscow region, Russia; ORCID 0000-0003-2583-0492, AuthorID 1046552. *E-mail: 68ovk@mail.ru*

Araksiya A. Smekalova, junior researcher of laboratory of biological problems of animal reproduction, L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Dubrovitsy settlement, Moscow region, Russia; ORCID 0009-0005-4243-1719, AuthorID 859659. *E-mail: araksia86@mail.ru*