



АКУШЕРСТВО, ГИНЕКОЛОГИЯ

УДК: 576.08:636.4

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.4.424

ГОРМОНАЛЬНЫЙ ПРОФИЛЬ ЖИДКОСТИ ФОЛЛИКУЛОВ РАЗНОГО ДИАМЕТРА В СВЯЗИ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И СОДЕРЖАНИЕМ ЛИПИДОВ В КЛЕТКАХ ГРАНУЛЕЗЫ *SUS SCROFA DOMESTICUS*

Кузьмина Т.И.* – д-р биол. наук, проф., глав. науч. сотрудник, зав. лабораторией биологии развития (ORCID 0000-0002-4218-6080); Притужалова А.О. – мл. науч. сотр. лаборатории биологии развития, (ORCID 0000-0002-2865-9582); Курочкин А.А. – мл. науч. сотр. лаборатории биологии развития (ORCID 0000-0003-4430-4770); Баранова Е.И. – лаборант-исследователь лаборатории биологии развития (ORCID 0009-0004-1980-9333).

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»

* prof.kouzmina@mail.ru

Ключевые слова: фолликулогенез, гормоны, клетки гранулезы, *Sus scrofa domestica*, липидные капли.

Keywords: *hormones, folliculogenesis, granulosa cells, Sus scrofa domestica, lipid droplets.*

Финансирование: Работа поддержана Российским научным фондом проект №22-16-00084.

Поступила: 21.10.2024

Принята к публикации: 02.12.2024

Опубликована онлайн: 16.12.2024



РЕФЕРАТ

Моделирование систем дозревания ооцитов сельскохозяйственных животных основывается на имеющихся сведениях о составе фолликулярной жидкости (ФЖ), однако, данные гормонального статуса жидкости фолликулов свиней в связи с жизнеспособностью и функциональным состоянием липидома клеток гранулезы (КГ) в динамике фолликулогенеза отсутствуют. Нами был проанализирован гормональный профиль (ЛГ, ФСГ, ТЗ, Т4, кортизол) жидкости антральных фолликулов свиней и получены данные о влиянии этих гормонов на жизнеспособность и содержание липидов (липидных капель-ЛК) КГ свиней

в фолликулах разного диаметра ($\varnothing < 3$ мм, $\varnothing 3-5$ мм и $\varnothing > 5$ мм). Обнаружена обратная корреляция между долей КГ с высокой интенсивностью флуоресценции комплекса липидная капля – NileRed (ИФNileRed/ЛК - маркер содержания липидных капель) и концентрацией кортизола в динамике фолликулогенеза (-0.830 , $p < 0.05$), а также обратная корреляция между содержанием кортизола и долей жизнеспособных клеток (-0.995 , $p < 0.05$). Прямая корреляция выявлена между уровнем содержания, как Т3, так и Т4 с ИФNileRed/ЛК (0.901 , 0.946 , $p < 0.05$) в КГ, что, вероятно, предполагает накопление энергетического субстрата в цитозоле. Отсутствовали достоверные корреляционные значения в содержании ЛГ в ФЖ и долей КГ, имеющих высокую интенсивность ИФNileRed/ЛК. Высокий уровень корреляции в концентрации Т3, Т4 в ФЖ и кортизола с показателями липидного содержания в КГ, свидетельствует о значительном влиянии этих гормонов на энергетический запас и жизнеспособность КГ в процессе фолликулогенеза и позволяет рассматривать их в качестве потенциальных кандидатов для углубленного изучения механизмов нарушения метаболизма, провоцирующих аномалии в развитии потомства, полученного при экстракорпоральном созревании и оплодотворении женских гамет, а также для моделирования состава сред для формирования зрелой яйцеклетки *Sus scrofa domestica in vitro*.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Совершенствование клеточных репродуктивных технологий, таких как получение нативных (ЭКО) и реконструированных эмбрионов (клонирование, трансгенез), решение проблем бесплодия у человека и животных, создание высокопродуктивных особей в животноводстве основывается на познании интрафолликулярных механизмов формирования женской гаметы. Моделирование систем дозревания ооцитов свиней основывается на имеющихся сведениях о составе ФЖ. Однако, в настоящее время отсутствуют данные о гормональном статусе ФЖ растущего ооцита в связи с показателями жизнеспособности и функциональным состоянием липидома структурных компонентов антральных овариальных фолликулов в динамике фолликулогенеза. Отягощающий LOS-синдром у потомства, в том числе у вида *Sus scrofa domestica*, полученного с использованием вспомогательных репродуктивных технологий, исследователи связывают с нарушением условий созревания ооцитов *in vitro*, прежде всего, с неадекватностью состава культуральных сред, используемых в технологии ЭКО. Синдром повышенного веса сопровождается нарушением липидного метаболизма, гормонального статуса особей. Многие исследования в области репродуктивных технологий сельскохозяйственных животных направлены на поиск

биомаркеров, детерминирующих компетентность к созреванию и оплодотворению донорских ооцитов. В качестве биомаркеров рассматриваются клетки гранулы (КГ), клетки кумулюса (КК), ФЖ, содержащая продукты секреции КК, КГ и частично экссудат плазмы крови [1, 2, 3, 4]. Гормоны ФЖ выступают как ингибиторы или стимуляторы пролиферативной активности в КГ, их жизнеспособности, метаболизма, синтеза стероидов, а также играют коммуникативную роль в передаче сигналов [5, 6]. Итогом коммуникации продуктов секреции и компонентов ФЖ являются блок реинициации мейотического созревания ооцита или активация этапов фолликулогенеза с последующим рекрутированием популяции фолликулов. Исследования влияния гормонов на функциональный статус и жизнеспособность КГ свиней в основном акцентированы на содержании гормонов в сыворотке крови или суммарного аспирата жидкости пула фолликулов, а полученные результаты носят противоречивый характер [7, 8, 9]. При этом не стандартизируются фазы эстрального цикла и размер фолликулов [10, 3, 9]. Основное внимание уделяется таким ключевым гормонам, как фолликулостимулирующий (ФСГ) и лютеинизирующий гормоны (ЛГ) [11, 12, 13, 14]. Исследования влияния таких гормонов, как кортизол, трийодтиронин (Т3) и тироксин (Т4) на показатели жизнеспособ-

ности и функциональной активности КГ в зависимости от диаметра фолликулов немногочисленны, и, в основном, выполнены на женщинах, в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [15, 16]. Информация о содержании вышеуказанных гормонов в жидкости из свиных фолликулов разного диаметра и их влиянии на функциональную активность КГ отсутствуют.

Глюкокортикоиды (к которым относится кортизол) входят в группу гормонов, продуцирующихся в организме как реакция на стресс. У стрессированных мышей выработка кортизола негативно влияет на качество ооцитов [17]. Культивирование клеток гранулезы с кортизолом вызывает их гибель, что, априори, указывает на его негативное воздействие на фолликулогенез, вызывая атретические процессы, тогда как ФСГ, напротив, предотвращает вызванную кортизолом регрессию фолликулов у свиней [18]. Stimson et al. показали, что кортизол взаимодействует с гормоночувствительной липазой в клетках кумулюса и ооцитах, способствуя расщеплению триглицеридов для образования холестерина с последующим синтезом стероидных гормонов [19]. Гормоны щитовидной железы (Т4) и его производные (Т3) также оказывают влияние на фолликулогенез. Показано, что Т3 снижает апоптотические процессы в КГ человека [20]. Чувствительность КГ к Т3 в десятки раз превышает эффект его предшественника (эффект наблюдался при 10 нМ и 100 нМ, тогда как у Т4 значительный эффект достигался только при 100 нМ) [20]. В связи с вышеизложенным возникает необходимость углубления знаний об участии этих гормонов в механизмах фолликулогенеза, о содержании их в растущих фолликулах и об особенностях воздействия на функциональный статус, метаболизм и жизнеспособность КГ.

Цель настоящего исследования – проанализировать гормональный профиль (ЛГ, ФСГ, Т3, Т4, кортизол) жидкости антральных овариальных фолликулов свиней в связи с показателем жизнеспособности и энергетическим потенциалом

(интенсивность флуоресценции липидных капель) КГ в зависимости от диаметра растущих фолликулов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

В эксперименте использовали ФЖ свиней, отобранную из *post mortem* яичников половозрелых свинок породы ландрас (6 мес.) в фолликулярной фазе эстрального цикла, полученных на Тосненском мясокомбинате (Ленинградская область). ФЖ аспирировали из «здоровых» фолликулов, с высоким тургором и обширной васкуляризацией, ранжированных в соответствии с диаметром: менее 3 мм; 3–5 мм и более 5 мм. Аспирированную ФЖ центрифугировали при 1200 об/мин., осадок отбирали в центрифужные пробирки и хранили при - 70°C. Полученный осадок (КГ), ресуспендировали в стерильном фосфатно-солевом буфере (PBS) и подвергали анализу на жизнеспособность с помощью флуорохрома пропидия йодид (PI). КГ дважды отмывали в PBS буфере, с осаждением клеток при 1200 об. / мин. в течение 7 мин. Клетки анализировали сразу после добавления красителя PI к исследуемым образцам до конечной концентрации 5 мкг/мл. Для определения интенсивности флуоресценции комплекса Nile Red/липидная капля (ИФNileRed/ЛК) в КГ применяли краситель Nile Red, который визуализирует нейтральные липиды (триглицериды, диапазон флуоресценции 580 нм–596 нм) и полярные липиды (фосфолипидные бислои, диапазон флуоресценции 597 нм – 620 нм) [21]. После отмывки в PBS КГ ресуспендировали и фиксировали в 1% параформальдегиде при комнатной температуре в течение 10 мин. Фиксированные клетки дважды промывали PBS и добавляли Nile Red (Sigma-Aldrich) до рабочей концентрации 10 мкМ, инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин в темноте. Окрашенные клетки дважды промывали и ресуспендировали в PBS буфере. Nile Red является липофильным красителем и специфично связывается с внутриклеточными липид-

ными каплями, образуя с ними комплекс Nile Red/липидная капля. В результате наблюдаются клетки с высокой и низкой интенсивностью флуоресценции Nile Red, в зависимости от степени содержания липидов в цитоплазме. В связи с этим популяцию исследуемых клеток ранжировали на группы с высокой и низкой интенсивностью комплекса Nile Red/липидная капля. Образцы анализировали на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter Life Sciences, USA). Иммуноферментный анализ проводили с применением наборов для определения ЛГ, ФСГ, ТЗ, Т4 свиней (Cloud-Cloune Corp., Hubei, China) и кортизола СтероидИФА-кортизол (ООО «Компания Алкор Био», Россия).

Результаты обрабатывали с помощью программы Sigma Stat. Все использован-

ные в исследовании реагенты, за исключением обозначенных, производства фирмы Sigma-Aldrich. Пластиковая лабораторная посуда фирмы BD Falcon™. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с помощью критерия χ^2 при двух уровнях значимости: $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

В процессе роста фолликулов происходит углубление апоптотических процессов в КГ (4% клеток на стадии апоптоза в фолликулах <3 мм против 11% в фолликулах 5-8 мм соответственно, $p < 0.05$, Рис.1). На начальной стадии фолликулогенеза в КГ наблюдается тенденция к накоплению запаса ЛК, (увеличение доли клеток с высокой интенсивностью ИФNileRed/ЛК на 10 %, $p < 0.05$).

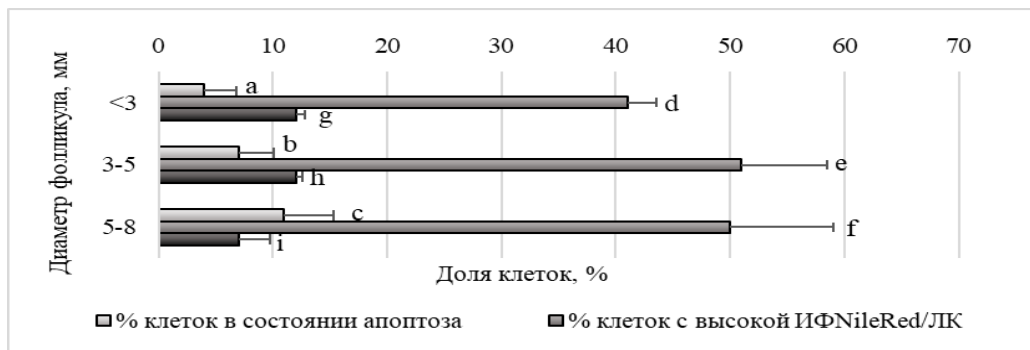


Рисунок 1 – Апоптотические процессы и показатели функционирования липидома (Интенсивность флуоресценции комплекса Nile Red/липидная капля- ИФNileRed/ЛК) в клетках гранулезы *Sus scrofa domestica* в фолликулах разного диаметра. ^{a,c,d,e; d,f} - $p < 0.05$.

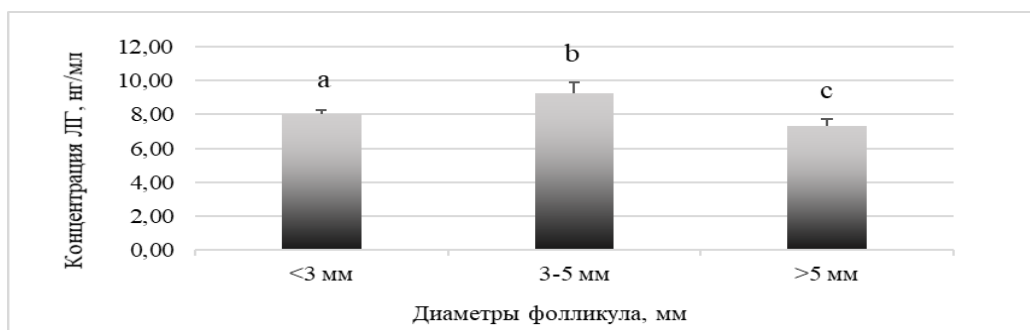


Рисунок 2 – Концентрация лютеинизирующего гормона (ЛГ) в фолликулярной жидкости свиней, аспирированной из фолликулов разного диаметра. ^{b,c} - $p < 0.05$.

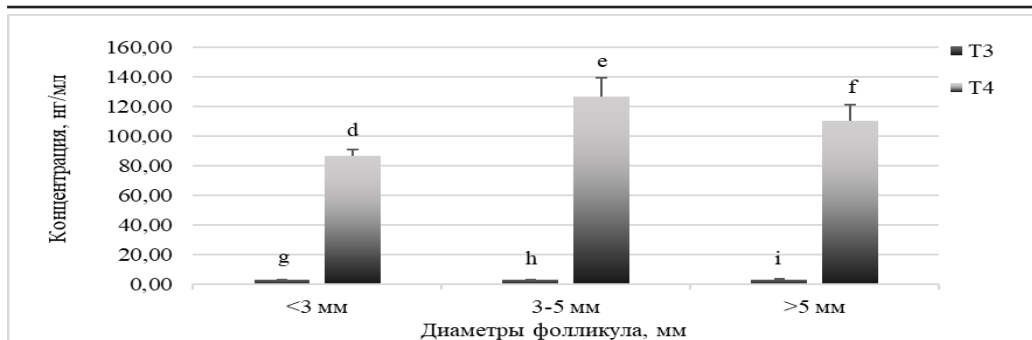


Рисунок 3 – Концентрация трийодтиронина (Т3) и тироксина (Т4) в ФЖ свиней, аспирированной из фолликулов разного диаметра. ^{d,e} - $p < 0.01$; ^{g,d; h,e; i,f} - $p < 0.001$.

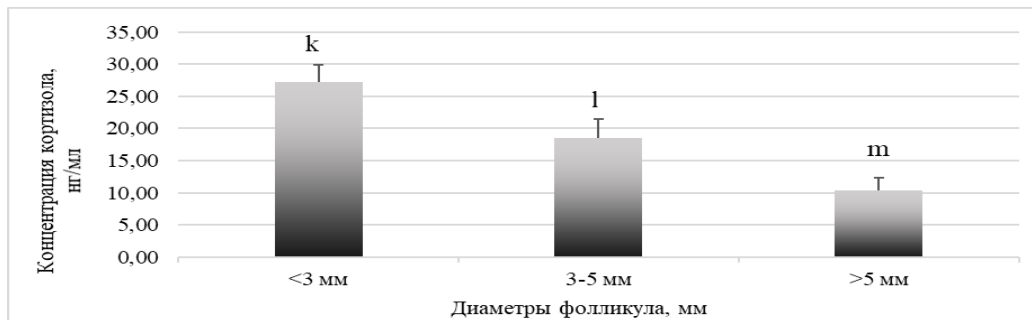


Рисунок 4 – Концентрация кортизола в ФЖ свиней, аспирированной из фолликулов разного диаметра. ^{k,l; l,m} - $p < 0.05$; ^{k,m} - $p < 0.001$.

Концентрация ЛГ – один из определяющих факторов формирования фолликулов самок, результаты о его концентрации в фолликулах разного диаметра свиней противоречивы и немногочисленны [22]. Согласно наших данных, (Рис. 2). значительное снижение уровня содержания ЛГ (на 1.93 нг/мл) обнаружено в жидкости фолликулов $\varnothing > 5$ мм (7.32 нг/мл) по сравнению с его концентрацией в жидкости из фолликулов $\varnothing 3-5$ мм ($p < 0.05$).

Анализ концентрации Т3 и Т4 выявил отличия в показателях уровня содержания в фолликулах разного диаметра (Рис. 3.). Так, содержание Т4 в фолликулах $\varnothing < 3$ мм, 3-5 мм и $\varnothing > 5$ мм составило 86.63 нг/мл, 126.48 нг/мл и 110.16 нг/мл, соответственно. Обнаружены значительные различия (на 39.85 нг/мл, $p < 0.01$) в уровне содержания Т4 между фолликулами $\varnothing < 3$ мм и $\varnothing 3-5$ мм. Достоверных различий в содержание Т3 в фолликулах вышеуказанных диаметров (3.10 нг/мл, 3.30 нг/мл и

3.41 нг/мл) не выявлено. Значимые различия обнаружены в содержании Т4 и Т3 из фолликулов одинаковых диаметров: $\varnothing < 3$ мм на 83.53 нг/мл ($p < 0.001$), $\varnothing 3-5$ мм на 123.18 нг/мл ($p < 0.001$), $\varnothing > 5$ мм на 106.75 нг/мл ($p < 0.001$).

Показатели уровня кортизола в ФЖ свиней, могут косвенно указывать на качество ооцита [23]. В нашем исследовании содержание кортизола в ФЖ снижалось по мере роста фолликулов (Рис. 4).

В ФЖ из фолликулов $\varnothing < 3$ мм, уровень кортизола составило 27.20 нг/мл, тогда как в фолликулах $\varnothing 3-5$ мм был ниже на 8.7 нг/мл ($p < 0.05$). Самая низкая концентрация данного гормона обнаружена в фолликулах $\varnothing > 5$ мм (10.4 нг/мл), и достоверно отличалась от содержания в жидкости из фолликулов $\varnothing < 3$ мм и $\varnothing 3-5$ мм (на 16.8 и 8.08 нг/мл соответственно, $p < 0.001$; $p < 0.05$).

ФСГ, как и ЛГ ингибируют апоптотические процессы в КГ [24]. В наших ис-

следованиях показатели содержания ФСГ в ФЖ (ИФА) тестировались сверх пороговых значений применяемого набора и колебались в следующих пределах: $\varnothing < 3$ мм – свыше 200 нг/мл; $\varnothing 3-5$ мм – от 175.3 до 200 нг/мл и выше; $\varnothing > 5$ мм – 135.6 до 200 нг/мл, что позволяет предполагать

тенденцию к снижению уровня ФСГ по мере роста фолликулов. В Таблице 1 приведены данные корреляционного анализа между уровнем гормонов, жизнеспособностью и функциональной активностью липидома КГ свиней.

Таблица 1 – Корреляционный анализ исследуемых значений

	ЛГ	ТЗ	Т4	Кортизол
Доля клеток в состоянии апоптоза	-0.444*	0.969*	0.519*	-0.995*
Доля клеток гранулезы с высокой интенсивностью флуоресценции комплекса NileRed/липидная капля	0.234	0.901*	0.946*	-0.830*
Доля КГ с низкой интенсивностью флуоресценции комплекса NileRed/липидная капля	0.784	-0.771*	-0.104	0.885

Достоверность * $p < 0.05$.

Формирование условий для роста и созревания ооцита во многом определяется сложной системой коммуникаций функциональной активности соматических клеток фолликула и его гормонального статуса. Известно, что использование КГ в системе кокультивирования женских гамет *in vitro* способствует повышению выхода ооцитов, компетентных к дальнейшему оплодотворению [25]. Как показывают данные ряда исследователей уровни гормонов опосредуют как липидный метаболизм, так и функциональную активность КГ (синтез стероидных гормонов) [26, 27, 28, 29, 30]. Знание реализации эффектов гормонов на КГ необходимо для создания адекватных процессам *in vivo* условий *in vitro* и моделирования состава культуральных сред. Результаты наших исследований впервые формируют представление о содержании ЛГ, ФСГ, ТЗ, Т4, кортизола в фолликулах разного диаметра у свиней и характера их влияния на апоптотические процессы и липидом КГ. Содержание липидов в КГ является источником стероидных гормонов, вовлеченных в процесс реинициации мейоза ооцитов [31]. Simerman et al. выявили обратную корреляцию содержания липидов в КГ с содержанием кортизола в ФЖ

и снижение уровня апоптоза в КГ лошадей в ответ на воздействие кортизола [33]. Наши данные, свидетельствующие об обратной корреляции между КГ, имеющими высокую интенсивность ИФNileRed/ЛК и содержанием кортизола в динамике фолликулогенеза (-0.830, $p < 0.05$), а также об обратной корреляции между содержанием кортизола и долей жизнеспособных клеток (-0.995, $p < 0.05$) согласуются с результатами исследований других авторов [32, 33]. C. Verga Falzacappa et al. обнаружили рост фолликулов у крыс под воздействием ТЗ в различных концентрациях, а также показали его прямое и значительное воздействие на стероидогенез КГ [34]. Также, по данным Liu et al. был выявлен синергический эффект ТЗ на экспрессию гена CYP51, синтезируемый фермент которого превращает ланостерин в холестерин, и, таким образом, способствует продуцированию субстрата для стероидных гормонов в клетках гранулезы мышей [35]. Эти данные частично согласуются с результатами наших исследований, показавших высокую прямую корреляцию (0.901, $p < 0.05$) между уровнем ТЗ в ФЖ и ИФNileRed/ЛК в КГ, что, как предполагается, способствует накоплению энергетического субстрата в цитозо-

ле. Тенденция к росту содержания ТЗ в фолликулах диаметром 3-5 мм, возможно, указывает на селекцию доминантных фолликулов из общего пула. L. J. Spicer et al. в экспериментах на клетках теки и гранулезы показали, что добавление в среду Т4 совместно с другими гормонами (ФСГ, ЛГ, инсулин) влияет на выработку ароматазы и прогестерона в исследуемых клетках, что предполагает стимулирующий эффект тироксина в КГ и текальных клетках [36]. В наших исследованиях показана прямая корреляция между содержанием Т4 в ФЖ и (0.946, $p < 0.05$) ИФNileRed/ЛК в КГ. По данным Paes V. M. et al. при культивировании *in vitro* преантральных фолликулов коз Т4 способствует увеличению экспрессии фактора роста и дифференцировки 9 (GDF-9), а также, в присутствии ФСГ увеличивает долю созревших ооцитов [37]. Схожие данные о влиянии ТЗ и Т4 на пролиферативную активность и жизнеспособность КГ из фолликулов $\varnothing$ 1-5 мм у коров были получены Монтвилла и др., однако, в их исследованиях не выявлено эффектов этих гормонов на секрецию эстрадиола-17 β или прогестерона [38]. В наших экспериментах отмечено значительное повышение содержание тироксина в жидкости фолликулов $\varnothing$ 3-5 мм в сравнении с фолликулами $\varnothing < 3$ мм, при этом, выявлена высокая прямая корреляция между долей клеток с высоким содержанием ИФNileRed/ЛК в фолликулах разного диаметра и уровнем ТЗ и Т4 (0.901, 0.946, $p < 0.05$), что, возможно, связано с видовыми различиями в механизмах фолликулогенеза моно- и полиплодных животных.

ФСГ и ЛГ – гормоны, определяющие функцию яичников, формирование доминантного фолликула и зрелого ооцита [21]. Noguchi et al. показали, что концентрации ФСГ в фолликулярной фазе обратно пропорциональны содержанию ингибина А, с большей выработкой этого гормона крупными фолликулами, у приближающихся к течке свиней [39]. В наших исследованиях обнаружена тенденция к снижению содержания ФСГ по мере роста фолликулов. По данным других авто-

ров, количество рецепторов к ЛГ увеличивалось в фолликулах размером $\varnothing$ 2–6 мм, а затем снижалось [40]. Наши данные показывают тенденцию к повышению содержания ЛГ в фолликулах $\varnothing$ 3-5 мм и достоверное снижение в фолликулах $\varnothing$ 5 мм. Britt et al. показано, что введение эстрогена вызывает выброс ЛГ, но, первоначально, отмечено временное снижение ЛГ, что, как считается, важно для того, чтобы гипофиз мог накапливать запасы ЛГ для всплеска концентрации через 24–48 часов [41]. В наших экспериментах, показано понижение концентрации ЛГ в фолликулах $\varnothing > 5$ мм в сравнении с фолликулами $\varnothing$ 3-5 мм. Результаты исследования Sekar N. et al. показавших отсутствие влияния ЛГ на накопление различных ферментов и слабое воздействие на стимулирование трансляции мРНК белков, отвечающих за метаболизм липопротеинов низкой плотности и холестерина, частично подтверждают наши данные об отсутствии корреляции между ИФNileRed/ЛК в КГ и уровнем ЛГ, что предполагает иные пути реализации эффектов ЛГ на КГ [42].

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Полученные данные впервые формируют представление о влиянии ТЗ, Т4, кортизол, ЛГ и ФСГ на энергетический запас и жизнеспособность клеток гранулезы свиней в фолликулах разного диаметра ($\varnothing < 3$, $\varnothing$ 3-5 и $\varnothing > 5$ мм). Концентрация ЛГ имела тенденцию к повышению по мере роста фолликулов от $\varnothing$ менее 3 мм и до $\varnothing$ 3-5 мм, достоверно снижаясь в фолликулах больше 5 мм (8.04 нг/мл, 9.25 нг/мл и 7.32 нг/мл, соответственно). Содержание Т4 в фолликулах $\varnothing < 3$ мм, $\varnothing$ 3-5 мм и $\varnothing > 5$ мм составило 86.63 нг/мл, 126.48 нг/мл и 110.16 нг/мл, что имело значительные различия в уровне содержания Т4 между фолликулами $\varnothing < 3$ мм и $\varnothing$ 3-5 мм на 39.85 нг/мл ($p < 0.01$). Концентрация ТЗ в фолликулах вышеуказанных диаметров достигала 3.10 нг/мл, 3.30 нг/мл и 3.41 нг/мл, достоверных различий в показателях не обнаружено. Разница между содержанием вышеуказанных гормонов (ТЗ и Т4) в фолликулах одинакового диа-

метра существенно отличалась: в фолликулах $\varnothing < 3$ мм на 83.53 нг/мл ($p < 0.001$), в фолликулах $\varnothing 3-5$ мм на 123.18 нг/мл ($p < 0.001$), в фолликулах $\varnothing > 5$ мм на 106.75 нг/мл ($p < 0.001$). Содержание кортизола в жидкости фолликулов $\varnothing < 3$ мм, составило: 27.20 нг/мл; $\varnothing 3-5$ мм – 18.48 нг/мл, $\varnothing > 5$ мм 10.4 нг/мл. Анализ содержания ФСГ в ФЖ выявил результаты сверх пороговых значений применяемого набора и колебался в пределах: $\varnothing < 3$ мм – свыше 200 нг/мл; $\varnothing 3-5$ мм – от 175.3 нг/мл до 200 нг/мл и выше; $\varnothing > 5$ мм – 135.6 нг/мл до 200 нг/мл, обнаружив тенденцию к снижению уровня содержания гормона по мере роста фолликулов. Выявлены высокие корреляционные значения в содержании Т3, Т4 и кортизола с функциональной активностью липидома (комплекса IFNileRed/ЛК), что свидетельствует о значительном влиянии этих гормонов на энергетический запас и жизнеспособность КГ в процессе формирования фолликулов и позволяет рассматривать их в качестве потенциальных кандидатов для углубленного изучения механизмов нарушения метаболизма, провоцирующих аномалии в развитии потомства, полученного при экстракорпоральном созревании и оплодотворении, а также для моделирования состава сред в технологии экстракорпорального созревания донорских ооцитов свиней.

HORMONAL PROFILE OF FOLLICLE FLUID OF DIFFERENT DIAMETERS IN RELATION TO VIABILITY AND LIPID CONTENT IN GRANULOSA CELLS OF SUS SCROFA DOMESTICUS

Kuzmina T.I.* – Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief Researcher, Head of the Laboratory of Developmental Biology (ORCID 0000-0002-4218-6080); **Prituzhalova A.O.** – Junior Researcher, Laboratory of Developmental Biology (ORCID 0000-0002-2865-9582); **Kurochkin A.A.** – Junior Researcher, Laboratory of Developmental Biology (ORCID0000-0003-4430-4770); **Baranova E.I.** – laboratory research assistant Laboratory of Developmental Biology (ORCID 0009-0004-1980-9333).

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – Branch of the L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry

**prof.kouzmina@mail.ru*

Funding: The work was supported by the Russian scientific foundation project No. 22-16-00084.

ABSTRACT

Modeling of oocyte maturation systems in farm animals is based on the available information on the composition of follicular fluid (FF), however, there are no data on the hormonal status of porcine follicular fluid in relation to the viability and functional state of the lipidome in granulosa cells (GCs) in the dynamics of folliculogenesis. We analyzed the hormonal profile (LH, FSH, T3, T4, cortisol) of porcine antral follicle fluid and obtained data on the effect of these hormones on the viability and lipid content (lipid droplets-LDs) of porcine GCs in follicles of different diameters ($\varnothing < 3$ mm, $\varnothing 3-5$ mm and $\varnothing > 5$ mm). An inverse correlation was found between the proportion of GCs with high fluorescence intensity of the lipid droplet complex – NileRed (IFNileRed/LD – a marker of lipid droplets content) and the concentration of cortisol in the dynamics of folliculogenesis (-0.830 , $p < 0.05$), as well as an inverse correlation between the cortisol content and the proportion of viable cells (-0.995 , $p < 0.05$). A direct correlation was found between the content of both T3 and T4 with IFNileRed/LD (0.901 , 0.946 , $p < 0.05$) in GCs, which probably suggests accumulation of the energy substrate in the cytosol. There were no reliable correlation values in the content of LH in the FF and the proportion of GCs with high IFNileRed/LD intensity. The high level of correlation in the concentration of T3, T4 in the FF and cortisol with the lipid's content in the GCs indicates a significant influence of these hormones on the energy reserve and viability of the GCs during folliculogenesis and allows us to consider them as potential candidates for an in-depth study of the mechanisms of metabolic

disorders that provoke abnormalities in the development of offspring obtained at *in vitro* maturation and fertilization of female gametes, as well as for modeling the composition of the media for the formation of a mature porcine ovum *in vitro*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Tabatabaei, S. Biochemical composition of blood plasma and follicular fluid in relation to follicular size in buffalo / Tabatabaei, S. and Mamoei, M. // Comparative clinical pathology. – 2011. – Vol. 20. – P. 441-445. DOI: 10.1007/s00580-010-1014-5.
2. Carpintero, N. L. Follicular steroid hormones as markers of oocyte quality and oocyte development potential / Carpintero, N. L., Suárez, O. A., Mangas, C. C., Varea, C. G., Rioja, R. G. // Journal of human reproductive sciences. – 2014. – Vol. 7. – P. 187-193. DOI:10.4103/0974-1208.142479.
3. Kayanja, M. Markers of oocyte quality to enhance human IVF outcomes: a bibliographic review / Kayanja, M., Tiri, M., Muyigo, M., Rujumba, D., Brian, N., Francis, K. // Open journal of internal medicine. – 2024. – Vol. 14. – P. 102-121. DOI: 10.4236/ojim.2024.141010.
4. Uyar, A. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality / Uyar, A., Torrealday, S., Seli, E. // Fertility and sterility. – 2013. – Vol. 99. – P. 979-997. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.01.129
5. Hassanein, E.M. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its agonists in bovine reproduction I: structure, biosynthesis, physiological effects, and its role in estrous synchronization / Hassanein, E.M., Szelényi, Z.; Szenci, O. // Animals. – 2024. – Vol. 14. – № 10. DOI: 10.3390/ani14101473.
6. Lamb, G.C. Reproductive Endocrinology and Hormonal Control of the Estrous Cycle / Lamb, G.C., Smith, M.F., Perry, G.A., Atkins, J.A., Risley, M.E., Busch, D.C., Patterson, D.J. // The Bovine Practitioner. – 2010. – Vol. 44. – № 1. – P. 18-26. DOI:10.21423/bovine-vol44no1p18-26.
7. Costermans, N. Follicular fluid steroid profile in sows: relationship to follicle size and oocyte quality / Costermans, N., Soede, N., Tricht, F., Blokland, M., Kemp, B., Keijer, J., Teerds K. // Biology of reproduction. – 2020. – Vol. 102. – P. 740-749. DOI: 10.1093/biolre/ioz217.
8. Gregoraszczuk, E.L. In vitro effect of triiodothyronine on the cyclic amp, progesterone and testosterone level in porcine theca, granulosa and luteal cells / Gregoraszczuk, E.L., Galas, J. // Endocrine regulations. – 1998. – Vol. 32. – P. 93-98.
9. Osteen K. G. Follicular fluid modulation of functional LH receptor induction in pig granulosa cells / Osteen K. G., Anderson L. D., Reichert L. E., Channing C. P. // Journal of reproduction and fertility. – 1985. – Vol. 74. – P. 407-418. DOI: 10.1530/jrf.0.0740407.
10. Naskar S. Steroid and metabolic hormonal profile of porcine serum vis-à-vis ovarian follicular fluid / Naskar S., Borah S., Vashi Y., Thomas R., Sarma D. K., Goswami J., Dhara S. K. // Veterinary World. – 2016. – Vol 9. – P. 1320-1323. DOI: 10.14202/vetworld.2016.1320-1323.
11. Sirotkin A. V. FSH, oxytocin and IGF-I regulate the expression of sirtuin 1 in porcine ovarian granulosa cells / Sirotkin A. V., Dekanová P., Harrath A. // Physiological research. – 2020. – Vol.69. – P. 461-466. DOI: 10.33549/physiolres.934424.
12. Guthrie, H. D. Changes in plasma estrogen, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 alpha during blockade of luteolysis in pigs after human chorionic gonadotropin treatment / Guthrie, H. D., Bolt, D. J. // Journal of animal science. – 1983. – Vol. 57. – P. 993-1000. DOI:10.2527/jas1983.574993x.
13. Breen, S. M. The impact of dose of FSH (Folltropin) containing LH (Lutropin) on follicular development, estrus and ovulation responses in prepubertal gilts / Breen, S. M., Knox, R. V. // Animal Reproduction Science. – 2012. – Vol. 132. – P. 193-200. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2012.05.013.
14. Lavoie, H. A. 123 Physiological regulation of ovarian follicle growth and maturation in the pig / Lavoie, H. A. // Journal of animal science. – 2018. – Vol. 96. – P. 342-343. DOI: 10.1093/jas/sky404.754.
15. Rosales M. Thyroid hormones in ovarian

- follicular fluid: Association with oocyte retrieval in women undergoing assisted fertilization procedures / Mónica Rosales, Myriam Nuñez, Andrea Abdala, Viviana Mesch, Gabriela Mendeluk // JBRA assisted reproduction. –2020. –Vol. 24. –P. 245-249. DOI: 10.5935/1518-0557.20200004
16. Cedíková, M. Comparison of prolactin, free T3 and free T4 levels in the follicular fluid of infertile women and healthy fertile oocyte donors / Cedíková, M., Babuška, V., Rajdl, D., Zech, N.H., Kališ, V., Králíčková, M. // Ceska Gynekologie. –2012. –Vol. 77. –P. 471-476.
17. Kala, M. Role of cortisol and superoxide dismutase in psychological stress induced anovulation / Kala, M., Nivsarkar, M. // General and comparative endocrinology. –2016. –Vol. 225. –P. 117–124. DOI: 10.1016/j.ygcen.2015.09.010.
18. Nakanishi T. Cortisol induces follicle regression, while FSH prevents cortisol-induced follicle regression in pigs / Nakanishi T., Okamoto A., Ikeda M., Tate S., Sumita M., Kawamoto R., Tonai S., Lee J.Y., Shimada M., Yamashita Y. // Molecular Human Reproduction. –2021. –Vol. 27. DOI: 10.1093/molehr/gaab038.
19. Stimson, R. H. Acute physiological effects of glucocorticoids on fuel metabolism in humans are permissive but not direct / Stimson, R. H., Anderson, A. J., Ramage, L. E., Macfarlane, D. P., de Beaux, A. C., Mole, D. J., Andrew, R., Walker, B. R. // Diabetes, obesity and metabolism. –2017. –Vol. 19. –P. 883-891. DOI: 10.1111/dom.12899.
20. Paolo V. Thyroid hormones T3 and T4 regulate human luteinized granulosa cells, counteracting apoptosis and promoting cell survival / Paolo V., Mangialardo C., Zacà C., Barberi M., Sereni E., Borini A., Centanni M., Coticchio G., Verga-Falzacappa C., Canipari R. // Journal of endocrinological investigation. –2020. –Vol. 43. –P. 821-831. DOI: 10.1007/s40618-019-01169-5.
21. Liu J. Growth and the initiation of steroidogenesis in porcine follicles are associated with unique patterns of gene expression for individual components of the ovarian insulin-like growth factor system / Liu J., Koenigsfeld A. T., Cantley T. C., Boyd C. K., Kobayashi Y., Lucy M. C. // Biology of Reproduction. –2000. –Vol. 63. –P. 942–952. DOI: 10.1095/biolreprod63.3.942
22. Filicori, M. The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction / Filicori, M. // Fertility and sterility. –1999. –Vol. 71. –P. 405-414. DOI: 10.1016/s0015-0282(98)00482-8.
23. Costermans, N. G. J., Soede, N. M., Tricht, F., Blokland, M., Kemp, B., Keijer, J., & Teerds, K. J. Follicular fluid steroid profile in sows: relationship to follicle size and oocyte quality / Costermans, N. G. J., Soede, N. M., Tricht, F., Blokland, M., Kemp, B., Keijer, J., Teerds, K. J. // Biology of Reproduction. –2019. –Vol. 102. –P. 740-749. DOI: 10.1093/biolre/iox217.
24. Lin, P. Effects of follicular size and FSH on granulosa cell apoptosis and atresia in porcine antral follicles / Lin, P., & Rui, R. // Molecular reproduction and development. –2010. –Vol. 77. –P. 670–678. DOI: 10.1002/mrd.21202.
25. Кузьмина Т. И. Роль наночастиц высокодисперсного кремнезема в реализации эффектов гранулезы на компетентность к созреванию и оплодотворению ооцитов *Sus scrofa domestica* / Кузьмина Т.И., Чистякова И.В., Притужалова А.О., Татарская Д.Н. // Вавиловский журнал генетики и селекции. –2022. –Vol. 26. –P. 234-239. DOI 10.18699/VJGB-22-30.
26. Zhang K-H. Follicle stimulating hormone controls granulosa cell glutamine synthesis to regulate ovulation / Zhang K-H., Zhang F-F., Zhang Z-L., Fang K-F., Sun W-X, Kong N., Wu M., Liu H-O, Liu Y., Li Z., Cai Q-Q., Wang Y., Wei Q-W., Lin P-C, Lin Y., Xu W., Xu C-J, Yuan Y-Y., Zhao S-M. // Protein & cell. –2024. –Vol. 15. –P. 512–529. DOI: 10.1093/procel/pwad065.
27. Liao, B. Effects of androgen excess-related metabolic disturbances on granulosa cell function and follicular development / Liao, B., Qi, X., Yun, C., Qiao, J., Pang, Y. // Frontiers in endocrinology (Lausanne). –2022. –Vol. 13. DOI: 10.3389/fendo.2022.815968.
28. Morimoto A. Granulosa cell metabolism at ovulation correlates with oocyte com-

- petence and is disrupted by obesity and aging / Morimoto A., Rose R. D., Smith K. M., Dinh D. T., Umehara T., Winstanley Y. E., Shibahara H., Russell D. L., Robker R. L. // *Human Reproduction*. –2024. –Vol. 39. –P. 2053–2066. DOI: 10.1093/humrep/deae154.
29. Arroyo A. Luteinizing Hormone Action in Human Oocyte Maturation and Quality: Signaling Pathways, Regulation, and Clinical Impact / Arroyo A., Kim B., Yeh J. // *Reproductive Sciences*. –2020. –Vol. 27. –P. 1223–1252. DOI: 10.1007/s43032-019-00137-x.
30. He, H. Effects of prolactin on the proliferation and hormone secretion of ovine granulosa cells in vitro / He, H., Su, X., Yang, H., Zhang, Y., Duan, C., Yang, R., Xie, F., Liu, Y., Liu, W. // *Animal Bioscience*. –2024. –Vol. 37. –P. 1712–1725. DOI: 10.5713/ab.23.0448.
31. Downs S. Fatty acid oxidation and meiotic resumption in mouse oocytes / Downs S., Mosey J., Klinge J. // *Molecular reproduction and development*. –2009. –Vol. 76. –P. 844–853. DOI: 10.1002/mrd.21047.
32. Simerman A. A. Intrafollicular cortisol levels inversely correlate with cumulus cell lipid content as a possible energy source during oocyte meiotic resumption in women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization / Simerman A. A., Hill D. L., Grogan T. R., Elashoff D., Clarke N. J., Goldstein E. H., Manriquez A. N., Chazembalk G. D., Dumesic D. A. // *Fertility and sterility*. –2015. –Vol. 103. –P. 249–57. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.09.034.
33. Effects of cortisol on granulosa cell function during follicle maturation in the horse / Abbasi K., Bollwein S., Kowalewski M. P., Scarlet D. // *Journal of equine veterinary science*. –2023. –Vol. 125. DOI: 10.1016/j.jevs.2023.104685.
34. Arnold A. Primary hyperparathyroidism: molecular genetic insights and clinical implications / Arnold A. // *Endocrine abstracts*. –2017. DOI: 10.1530/endoabs.50.PL1.
35. Liu, J. Role of CYP51 in the Regulation of T3 and FSH-Induced Steroidogenesis in Female Mice / Liu, J., Tian, Y., Ding, Y., Heng, D., Xu, K., Liu, W., Zhang, C. // *Endocrinology*. –2017. –Vol. 158. –P. 3974–3987. DOI: 10.1210/en.2017-00249.
36. Spicer L. J. Effects of thyroid hormones on bovine granulosa and thecal cell function in vitro: dependence on insulin and gonadotropins / Spicer L. J., Alonso J., Chamberlain C. S. // *Journal of dairy science*. –2001. –Vol. 84. –P. 1069–1076. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74567-5.
37. Paes V. M. Role of thyroid hormones (triiodothyronine and thyroxine) in the regulation of mammalian folliculogenesis / Paes V. M., Vieira L. A., Figueiredo J. R. // *Revista portuguesa de ciencias veterinarias*. –2017. –Vol. 112. –P. 23–31. DOI: 10.1159/000123900.
38. Монтвила Е.К. Влияние тиреоидных гормонов in vitro на функциональное состояние клеток гранулы коров / Монтвила Е.К., Митяшова О.С., Лебедева И.Ю. // *Генетика и разведение животных*. –2022. –№ 4. –С. 42–48. DOI:10.31043/2410-2733-2022-4-42-48.
39. Noguchi, M. 2010. Peripheral concentrations of inhibin A, ovarian steroids, and gonadotropins associated with follicular development throughout the estrous cycle of the sow / Noguchi, M., K. Yoshioka, S. Itoh, C. Suzuki, S. Arai, Y. Wada, Y. Hasegawa, and H. Kaneko. // *Reproduction*. –Vol. 139. –P. 153–161. DOI: 10.1530/REP-09-0018.
40. Liu, J. Growth and the initiation of steroidogenesis in porcine follicles are associated with unique patterns of gene expression for individual components of the ovarian insulin-like growth factor system / Liu, J., Koenigsfeld, A., Cantley, T., Boyd, C., Kobayashi, Y., Lucy, M. // *Biology of reproduction*. –2000. –Vol. 63. –P. 942–952. DOI: 10.1095/biolreprod63.3.942.
41. Britt, J. H. Roles of estradiol and gonadotropin-releasing hormone in controlling negative and positive feedback associated with the luteinizing hormone surge in ovariectomized pigs / Britt, J. H., Esbenshade, K. L., Ziecik, A. J. // *Biology of reproduction*. –1991. –Vol. 45. –P. 478–485. DOI: 10.1095/biolreprod45.3.478.
42. Sekar N. Mechanisms underlying the steroidogenic synergy of insulin and luteinizing hormone in porcine granulosa cells:

joint amplification of pivotal sterol-regulatory genes encoding the low-density lipoprotein (LDL) receptor, steroidogenic acute regulatory (stAR) protein and cytochrome P450 side-chain cleavage (P450_{scc}) enzyme / Sekar N., Garmey J. C., Veldhuis J. D. // Molecular and cellular endocrinology. –2000. –Vol. 159. –25-35. DOI: 10.1016/s0303-7207(99)00203-8

REFERENCES

1. Tabatabaei, S. Biochemical composition of blood plasma and follicular fluid in relation to follicular size in buffalo / Tabatabaei, S. and Mamoei, M. // Comparative clinical pathology. – 2011. –Vol. 20. –P. 441-445.
2. Carpintero, N. L. Follicular steroid hormones as markers of oocyte quality and oocyte development potential / Carpintero, N. L., Suárez, O. A., Mangas, C. C., Varea, C. G., Rioja, R. G. // Journal of human reproductive sciences. –2014. –Vol. 7. –P. 187-193.
3. Kayanja, M. Markers of oocyte quality to enhance human IVF outcomes: a bibliographic review / Kayanja, M., Tiri, M., Muyigo, M., Rujumba, D., Brian, N., Francis, K. // Open journal of internal medicine. –2024. –Vol. 14. –P. 102-121.
4. Uyar, A. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality / Uyar, A., Torrealday, S., Seli, E. // Fertility and sterility. –2013. –Vol. 99. –P. 979-997.
5. Hassanein, E.M. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its agonists in bovine reproduction I: structure, biosynthesis, physiological effects, and its role in estrous synchronization / Hassanein, E.M., Szelényi, Z.; Szenci, O. // Animals. –2024. –Vol. 14. –№ 10.
6. Lamb, G.C. Reproductive Endocrinology and Hormonal Control of the Estrous Cycle / Lamb, G.C., Smith, M.F., Perry, G.A., Atkins, J.A., Risley, M.E., Busch, D.C., Patterson, D.J. // The Bovine Practitioner. –2010. –Vol. 44. –№ 1. –P. 18-26.
7. Costermans, N. Follicular fluid steroid profile in sows: relationship to follicle size and oocyte quality / Costermans, N., Soede, N., Tricht, F., Blokland, M., Kemp, B., Keijer, J., Teerds K. // Biology of reproduction. –2020. –Vol. 102. –P. 740-749.
8. Gregoraszczuk, E.L. In vitro effect of triiodothyronine on the cyclic amp, progesterone and testosterone level in porcine theca, granulosa and luteal cells / Gregoraszczuk, E.L., Galas, J. // Endocrine regulations. –1998. –Vol. 32. –P. 93-98.
9. Osteen K. G. Follicular fluid modulation of functional LH receptor induction in pig granulosa cells / Osteen K. G., Anderson L. D., Reichert L. E., Channing C. P. // Journal of reproduction and fertility. –1985. –Vol. 74. –P. 407-418.
10. Naskar S. Steroid and metabolic hormonal profile of porcine serum vis-à-vis ovarian follicular fluid / Naskar S., Borah S., Vashi Y., Thomas R., Sarma D. K., Goswami J., Dhara S. K. // Veterinary World. –2016. –Vol 9. –P. 1320-1323.
11. Sirotkin A. V. FSH, oxytocin and IGF-I regulate the expression of sirtuin 1 in porcine ovarian granulosa cells / Sirotkin A. V., Dekanová P., Harrath A. // Physiological research. –2020. –Vol.69. –P. 461-466.
12. Guthrie, H. D. Changes in plasma estrogen, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 alpha during blockade of luteolysis in pigs after human chorionic gonadotropin treatment / Guthrie, H. D., Bolt, D. J. // Journal of animal science. –1983. –Vol. 57. –P. 993-1000.
13. Breen, S. M. The impact of dose of FSH (Folltropin) containing LH (Lutropin) on follicular development, estrus and ovulation responses in prepubertal gilts / Breen, S. M., Knox, R. V. // Animal Reproduction Science. –2012. –Vol. 132. –P. 193-200.
14. Lavoie, H. A. 123 Physiological regulation of ovarian follicle growth and maturation in the pig / Lavoie, H. A. // Journal of animal science. –2018. –Vol. 96. –P. 342–343.
15. Rosales M. Thyroid hormones in ovarian follicular fluid: Association with oocyte retrieval in women undergoing assisted fertilization procedures / Mónica Rosales, Myriam Nuñez, Andrea Abdala, Viviana Mesch, Gabriela Mendeluk // JBRA assisted reproduction. –2020. –Vol. 24. –P 245-249.
16. Cedíková, M. Comparison of prolactin,

- free T3 and free T4 levels in the follicular fluid of infertile women and healthy fertile oocyte donors / Cedíková, M., Babuška, V., Rajdl, D., Zech, N.H., Kališ, V., Králíčková, M. // *Ceska Gynekologie*. –2012. –Vol. 77. – P. 471-476.
- 17.Kala, M. Role of cortisol and superoxide dismutase in psychological stress induced anovulation / Kala, M., Nivsarkar, M. // *General and comparative endocrinology*. – 2016. –Vol. 225. –P. 117–124.
- 18.Nakanishi T. Cortisol induces follicle regression, while FSH prevents cortisol-induced follicle regression in pigs / Nakaniishi T., Okamoto A., Ikeda M., Tate S., Sumita M., Kawamoto R., Tonai S., Lee J.Y., Shimada M., Yamashita Y. // *Molecular Human Reproduction*. –2021. –Vol. 27.
- 19.Stimson, R. H. Acute physiological effects of glucocorticoids on fuel metabolism in humans are permissive but not direct / Stimson, R. H., Anderson, A. J., Ramage, L. E., Macfarlane, D. P., de Beaux, A. C., Mole, D. J., Andrew, R., Walker, B. R. // *Diabetes, obesity and metabolism*. –2017. – Vol. 19. –P. 883-891.
- 20.Paolo V. Thyroid hormones T3 and T4 regulate human luteinized granulosa cells, counteracting apoptosis and promoting cell survival / Paolo V., Mangialardo C., Zacà C., Barberi M., Sereni E., Borini A., Centanni M., Cotichio G., Verga-Falzacappa C., Canipari R. // *Journal of endocrinological investigation*. –2020. –Vol. 43. –P. 821-831.
- 21.Liu J. Growth and the initiation of steroidogenesis in porcine follicles are associated with unique patterns of gene expression for individual components of the ovarian insulin-like growth factor system / Liu J., Koenigsfeld A. T., Cantley T. C., Boyd C. K., Kobayashi Y., Lucy M. C. // *Biology of Reproduction*. –2000. –Vol. 63. –P. 942–952.
- 22.Marco F. The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction / Marco F. // *Fertility and sterility*. –1999. – Vol. 71. –P. 405-414.
- 23.Costermans, N. G. J., Soede, N. M., Tricht, F., Blokland, M., Kemp, B., Keijer, J., & Teerds, K. J. Follicular fluid steroid profile in sows: relationship to follicle size and oocyte quality / Costermans, N. G. J., Soede, N. M., Tricht, F., Blokland, M., Kemp, B., Keijer, J., Teerds, K. J. // *Biology of Reproduction*. –2019. –Vol. 102. –P. 740-749.
- 24.Lin, P. Effects of follicular size and FSH on granulosa cell apoptosis and atresia in porcine antral follicles / Lin, P., & Rui, R. // *Molecular reproduction and development*. – 2010. –Vol. 77. – P. 670–678.
- 25.Kuzmina, T.I. The role of highly dispersed silica nanoparticles in the realization of the effects of granulosa on the maturation and fertilization competence of *Sus scrofa domestica* oocytes / Kuzmina, T.I., Chistyakova, I.V., Prituzhalova, A.O., Tatarskaya, D.N. // *Vavilov journal of genetics and breeding*. –2022. –Vol. 26. –P. 234-239. (In Russ.)
- 26.Zhang K-H. Follicle stimulating hormone controls granulosa cell glutamine synthesis to regulate ovulation / Zhang K-H., Zhang F-F., Zhang Z-L., Fang K-F., Sun W-X, Kong N., Wu M., Liu H-O, Liu Y., Li Z., Cai Q-Q., Wang Y., Wei Q-W., Lin P-C, Lin Y., Xu W., Xu C-J, Yuan Y-Y., Zhao S-M. // *Protein & cell*. –2024. –Vol. 15. –P. 512–529.
- 27.Liao, B. Effects of androgen excess-related metabolic disturbances on granulosa cell function and follicular development / Liao, B., Qi, X., Yun, C., Qiao, J., Pang, Y. // *Frontiers in endocrinology (Lausanne)*. –2022. –Vol. 13.
- 28.Morimoto A. Granulosa cell metabolism at ovulation correlates with oocyte competence and is disrupted by obesity and aging / Morimoto A., Rose R. D., Smith K. M., Dinh D. T., Umehara T., Winstanley Y. E., Shibahara H., Russell D. L., Robker R. L. // *Human Reproduction*. –2024. –Vol. 39. –P. 2053–2066.
- 29.Arroyo A. Luteinizing Hormone Action in Human Oocyte Maturation and Quality: Signaling Pathways, Regulation, and Clinical Impact / Arroyo A., Kim B., Yeh J. // *Reproductive Sciences*. –2020. –Vol. 27. – P. 1223-1252.
- 30.He, H. Effects of prolactin on the proliferation and hormone secretion of ovine granulosa cells in vitro / He, H., Su, X., Yang,

- H., Zhang, Y., Duan, C., Yang, R., Xie, F., Liu, Y., Liu, W. // *Animal Bioscience*. – 2024. –Vol. 37. –P. 1712-1725.
31. Downs S. Fatty acid oxidation and meiotic resumption in mouse oocytes / Downs S., Mosey J., Klinge J. // *Molecular reproduction and development*. –2009. –Vol. 76. –P. 844-853.
32. Simerman A. A. Intrafollicular cortisol levels inversely correlate with cumulus cell lipid content as a possible energy source during oocyte meiotic resumption in women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization / Simerman A. A., Hill D. L., Grogan T. R., Elashoff D., Clarke N. J., Goldstein E. H., Manriquez A. N., Chazembalk G. D., Dumesic D. A. // *Fertility and sterility*. –2015. –Vol. 103. – P. 249-57.
33. Effects of cortisol on granulosa cell function during follicle maturation in the horse / Abbasi K., Bollwein S., Kowalewski M. P., Scarlet D. // *Journal of equine veterinary science*. –2023. –Vol. 125.
34. Arnold A. Primary hyperparathyroidism: molecular genetic insights and clinical implications / Arnold A. // *Endocrine abstracts*. – 2017.
35. Liu, J. Role of CYP51 in the Regulation of T3 and FSH-Induced Steroidogenesis in Female Mice / Liu, J., Tian, Y., Ding, Y., Heng, D., Xu, K., Liu, W., Zhang, C. // *Endocrinology*. –2017. –Vol. 158. –P. 3974-3987.
36. Spicer L. J. Effects of thyroid hormones on bovine granulosa and thecal cell function in vitro: dependence on insulin and gonadotropins / Spicer L. J., Alonso J., Chamberlain C. S. // *Journal of dairy science*. –2001. – Vol. 84. –P. 1069-1076.
37. Paes V. M. Role of thyroid hormones (triiodothyronine and thyroxine) in the regulation of mammalian folliculogenesis / Paes V. M., Vieira L. A., Figueiredo J. R. // *Revista portuguesa de ciencias veterinarias*. – 2017. –Vol. 112. –P. 23-31.
38. Montvila, E., Effects of thyroid hormones on the functional state of bovine granulosa cells in vitro // Montvila, E., Mityashova, O., Lebedeva, I. *Genetics and breeding of animals*. – 2022. – Vol. (4). – P. 42-48. (In Russ.)
39. Noguchi, M. 2010. Peripheral concentrations of inhibin A, ovarian steroids, and gonadotropins associated with follicular development throughout the estrous cycle of the sow / Noguchi, M., K. Yoshioka, S. Itoh, C. Suzuki, S. Arai, Y. Wada, Y. Hasegawa, and H. Kaneko. // *Reproduction*. –Vol. 139. –P. 153-161.
40. Liu, J. Growth and the initiation of steroidogenesis in porcine follicles are associated with unique patterns of gene expression for individual components of the ovarian insulin-like growth factor system / Liu, J., Koenigsfeld, A., Cantley, T., Boyd, C., Kobayashi, Y., Lucy, M. // *Biology of reproduction*. –2000. –Vol. 63. –P. 942–952.
41. Britt, J. H. Roles of estradiol and gonadotropin-releasing hormone in controlling negative and positive feedback associated with the luteinizing hormone surge in ovariectomized pigs / Britt, J. H., Esbenschade, K. L., Ziecik, A. J. // *Biology of reproduction*. – 1991. –Vol. 45. –P. 478–485.
42. Sekar N. Mechanisms underlying the steroidogenic synergy of insulin and luteinizing hormone in porcine granulosa cells: joint amplification of pivotal sterol-regulatory genes encoding the low-density lipoprotein (LDL) receptor, steroidogenic acute regulatory (stAR) protein and cytochrome P450 side-chain cleavage (P450scc) enzyme / Sekar N., Garmey J. C., Veldhuis J. D. // *Molecular and cellular endocrinology*. –2000. –Vol. 159. –25-35.