

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ГИПЕРТЕРМИЯ. ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РЕГУЛИРОВАНИИ АПОПТОЗА ЖЁЛТЫХ ТЕЛ ЯИЧНИКОВ В ОСТРОМ И ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ ПЕРИОДАХ

Мичурина С.В.¹,
Колесников С.И.^{2,3},
Ищенко И.Ю.¹,
Архипов С.А.¹

¹ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2, Россия)

² ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16, Россия)

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (119991, г. Москва, Ленинские горы, 1, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Мичурина Светлана Викторовна,
e-mail: michurinasv3000@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Воздействие теплового шока может инициировать в яичниках млекопитающих апоптоз клеток жёлтых тел. Во время фолликулогенеза апоптоз зернистых клеток регулируется ключевыми белками гибели клеток – Bcl-2 и Bax. В то же время роль этих белков в нарушениях развития жёлтых тел яичников при тепловом стрессе во многом остаётся неясной.

Цель исследования: выявить особенности экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 и проапоптотического белка Bax в лютеоцитах яичников крыс в острый (3-и сутки) и восстановительный (7-е и 14-е сутки) периоды после однократного воздействия экспериментальной гипертермии (ЭГ) (ректальная температура – 43,5 °C).

Материалы и методы. Иммуногистохимически с помощью непрямого двухэтапного стрептавидин-биотинового метода определяли экспрессию Bcl-2 и Bax.

Результаты. На 3-и сутки после ЭГ в лютеоцитах площади экспрессии как Bcl-2, так и Bax возросли в 2 раза, но отношение площадей Bcl-2/Bax не изменилось, что свидетельствует о поддержании в физиологических пределах интенсивности апоптоза по митохондриальному пути. На 7-е сутки площади экспрессии Bcl-2 и Bax оставались на уровне 3-х суток, но индекс Bcl-2/Bax снизился, что свидетельствует об активации внутреннего пути апоптоза клеток жёлтых тел яичников. К 14-м суткам площади экспрессии протеинов сократились (Bax – в 1,7 раза, Bcl-2 – в 3,2 раза) по сравнению с острым периодом, а индекс Bcl-2/Bax уменьшился в 2 раза по сравнению с контролем и группой острого периода.

Заключение. Выявленное преобладание проапоптотического Bax над антиапоптотическим Bcl-2 в лютеоцитах на 14-е сутки после ЭГ свидетельствует о нарушении антиапоптотической защиты, что приводит к активации митохондриального пути апоптоза последних. Снижение экспрессии Bcl-2 может расцениваться как проявление механизма удаления дефектных лютеоцитов и стремление организма нормализовать нарушенный воздействием высокой температуры овариально-маточный цикл.

Ключевые слова: апоптоз, экспериментальная гипертермия, яичники крыс, жёлтые тела, Bcl-2, Bcl-2/Bax

Для цитирования: Мичурина С.В., Колесников С.И., Ищенко И.Ю., Архипов С.А. Экспериментальная гипертермия. Экспрессия белков, участвующих в регулировании апоптоза жёлтых тел яичников в остром и восстановительном периодах. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(1): 232-239. doi: 10.29413/ABS.2022-7.1.26

Статья получена: 04.12.2021

Статья принята: 24.01.2022

Статья опубликована: 21.03.2022

EXPERIMENTAL HYPERTHERMIA: EXPRESSION OF PROTEINS INVOLVED IN THE REGULATION OF OVARIAN CORPUS LUTEUM APOPTOSIS IN THE ACUTE AND RECOVERY PERIODS

Michurina S.V.¹,
Kolesnikov S.I.^{2,3},
Ishchenko I.Yu.¹,
Arhipov S.A.¹

¹ Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (Timakova str. 2, Novosibirsk 630060, Russian Federation)

² Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (Timiryazeva str. 16, Irkutsk 664003, Russian Federation)

³ Lomonosov Moscow State University (Leninskie Gory 1, Moscow 119991, Russian Federation)

Corresponding author:
Svetlana V. Michurina,
e-mail: michurinasv3000@gmail.com

ABSTRACT

Background. Heat shock effects can initiate apoptosis of oocytes and corpus luteum cells in mammalian ovaries. During folliculogenesis, follicular apoptosis is regulated by Bcl-2 and BAX proteins which are key effectors of granular cell death. Mechanisms of disruption of the ovarian corpus luteum development under heat stress remain largely unclear.

Aim of the research: to identify the expression features of anti-apoptotic Bad and proapoptotic Bcl-2 proteins in the rat ovarian luteocytes in the acute (by day 3) and recovery (by days 7 and 14) periods after a single exposure of experimental hyperthermia (EH) (rectal temperature 43.5 °C).

Materials and methods. The expression of Bad and Bcl-2 was determined immunohistochemically using an indirect two-stage streptavidin-biotin method.

Results. On day 3 after EH, the expression areas of both Bad and Bcl-2 increased 2-fold, but the ratio of Bcl-2/Bad areas did not change, indicating that the intensity of apoptosis along the mitochondrial pathway in luteocytes in the acute period was maintained within physiological values. On day 7, the Bad and Bcl-2 expression areas remained at the level of day 3, but the Bcl-2/Bad index decreased, indicating the activation of the apoptosis internal pathway in the ovarian corpus luteum cells. By day 14, the protein expression areas decreased (Bad – by 1.7 times, Bcl-2 – by 3.2 times) compared to the acute period, and the Bcl-2/Bad index decreased by 2 times compared to the control and the acute period group.

Conclusion. The observed predominance of proapoptotic Bad protein over anti-apoptotic Bcl-2 in luteocytes on day 14 after EH indicates the anti-apoptotic protection violation, which leads to the apoptosis mitochondrial pathway activation of the latter. A decrease in Bcl-2 expression can be regarded as a manifestation of the defective luteocytes removal mechanism and the body's desire to normalize the ovarian-uterine cycle disrupted by high temperature exposure.

Key words: apoptosis, experimental hyperthermia, rat ovaries, corpus luteum, Bad, Bcl-2, Bcl-2/Bad

Received: 04.12.2021
Accepted: 24.01.2022
Published: 21.03.2022

For citation: Michurina S.V., Kolesnikov S.I., Ishchenko I.Yu., Arhipov S.A. Experimental hyperthermia: expression of proteins involved in the regulation of ovarian corpus luteum apoptosis in the acute and recovery periods. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(1): 232-239. doi: 10.29413/ABS.2022-7.1.26

ОБОСНОВАНИЕ

Жёлтое тело – временно функционирующий эндокринный орган, который периодически развивается из овулированного фолликула во время каждого репродуктивного цикла и отвечает преимущественно за выработку прогестерона, необходимого для имплантации и развития эмбриона [1], а в случае отсутствия имплантации – регрессирует. В яичнике механизмы, лежащие в основе решений о жизни и смерти входящих в него клеток, включают перекрёстный «диалог» между проапоптотическими молекулами (Bax и Bad) и молекулами, способствующими выживанию (Bcl-2). Морфологически проявления программируемой клеточной гибели обнаруживаются в фолликулах яичников уже у плода и на протяжении всей жизни женщины [2, 3, 4].

Лютеолиз также связан с изменённой экспрессией Bcl-2, Bax и TNF [3, 5]. Выявлено участие апоптоза во время естественной и индуцированной лютеиновой регрессии жёлтого тела млекопитающих: лошади [6], домашней кошки, рыси [7]. У женщин нарушение апоптоза связано с развитием многих патологических состояний, включая ановуляцию, синдром поликистозных яичников, преждевременную недостаточность яичников, а также опухолевые процессы в гонадах [4]. Доказано, что индуцировать в яичниках млекопитающих апоптоз жёлтых тел и ооцитов может гипертермия [8–12]. Однако механизмы влияния теплового стресса на апоптоз лютеоцитов во многом остаются неясными.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выявить особенности экспрессии белков-регуляторов апоптоза (проапоптотического белка Bad и антиапоптотического белка Bcl-2) в клетках жёлтых тел яичников крыс в острый (на 3-и сутки) и восстановительный (на 7-е и 14-е сутки) периоды после однократного воздействия экспериментальной гипертермии (ЭГ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводили на самках крыс Вистар (возраст – 3 месяца, масса тела – 180–200 г). Животные содержались в сертифицированном виварии ЦНИЛ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России при температуре воздуха 20–22 °С на стандартном пищевом рационе и при свободном доступе к воде. Эксперименты выполняли с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.). Определение фаз полового цикла проводили методом вагинальных мазков [13, 14]. Крыс опытной группы (группа «ЭГ», $n = 30$), находившихся в фазе диэструс полового цикла, подвергали воздействию ЭГ в соответствии со «Способом экспериментального моделирования общей гипертермии

у мелких лабораторных животных» [15]. Температурный режим нагрева горячей воды-теплоносителя подбирался экспериментально и составил 45 °С. Время разогревания каждой особи до уровня ректальной температуры 43,5 °С было индивидуальным, не зависело от исходной температуры тела, массы животного и составляло не более 17 минут. Уровень ЭГ, при котором прекращали разогревание, определялся ректальной температурой 43,5 °С (начальная стадия теплового удара). Гибели крыс от гипертермии не зарегистрировано.

Группу сравнения составили интактные животные в аналогичной фазе цикла (группа «Контроль», $n = 10$). На 3-и (острый период), 7-е и 14-е сутки (восстановительный период) после ЭГ животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом. Объектом гистологического исследования были яичники, которые фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, с последующим обезвоживанием в серии спиртов возрастающей концентрации и заключением в парафин.

Иммуногистохимическое исследование экспрессии белков Bcl-2 и Bad проводили на срезах яичников толщиной 3 мкм с помощью непрямого двухэтапного стрептавидин-биотинового метода, используя набор Novostain 500 (NCL-RTU-D, Novocastra, Великобритания), мышинные моноклональные антитела к антиапоптотическому белку Bcl-2 (IgG, № 610538; BD Biosciences, США) и к проапоптотическому белку Bad (IgG, № 610392; BD Biosciences, США). На последнем этапе использовали хромогенный субстрат с диаминобензидином. Исследование срезов и получение микрофотографий выполняли при помощи моторизованного микроскопа M200 (Carl Zeiss, Германия) с камерой AxioCam HRc (Carl Zeiss, Германия). О связывании антител с исследуемыми антигенами свидетельствовало окрашивание цитоплазмы клеток от бледно-жёлтого до тёмно-коричневого цвета. Проводили количественную оценку площадей экспрессии Bad и Bcl-2, рассчитываемых как относительные площади, окрашенные на исследуемые белки клеток жёлтых тел (лютеиноцитов), с помощью компьютерной программы Axio Vision 4.7.1 (Carl Zeiss, Германия) и блока автоматических измерений (Auto measure). Для каждой группы оценивали по 50 случайно выбранных изображений. Вычисляли индекс соотношения Bcl-2/Bad в жёлтых телах яичников крыс. Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи пакета программ Statistica 6.1 (Серийный № AXXR101E832903FA, StatSoft Inc., США), с вычислением средних арифметических величин (M) и стандартных ошибок средних (m). Статистическую значимость различий сравниваемых величин определяли с помощью параметрического критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0,050$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфометрический анализ показал, что в клетках жёлтых тел на 3-и сутки после ЭГ площадь экспрессии белка Bad увеличивается в 2,1 раза по сравнению

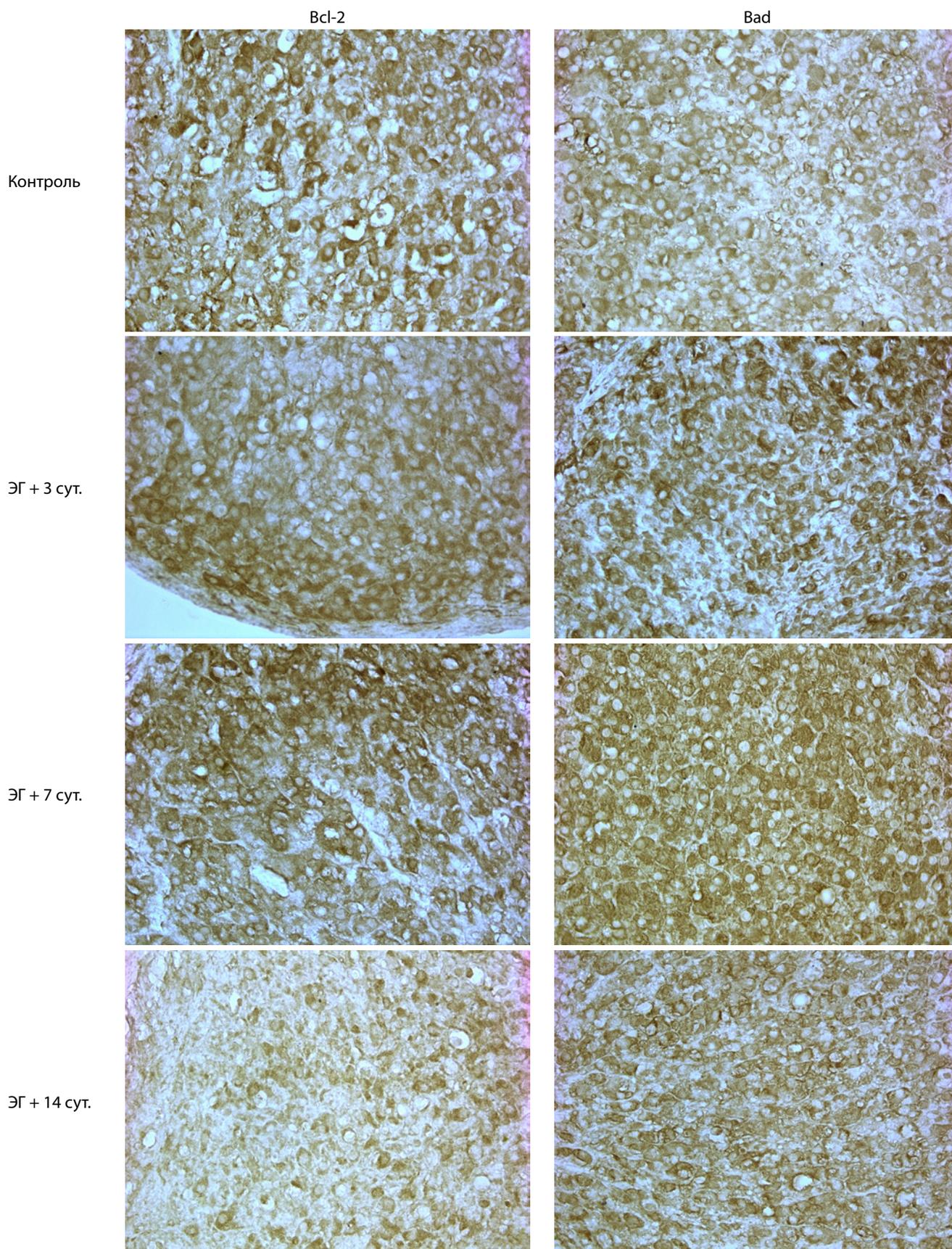
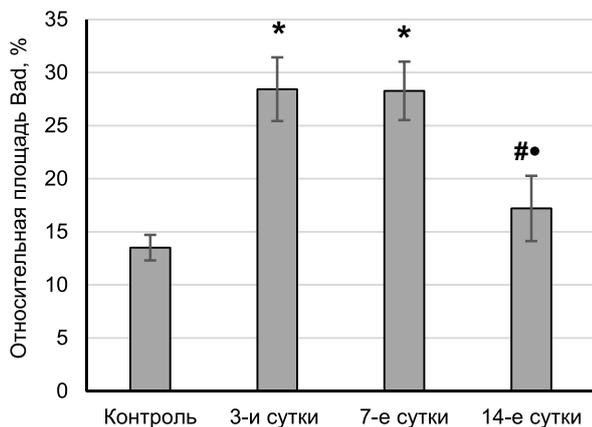


РИС. 1.
Выявление антиапоптотического белка Bcl-2 и проапоптотического белка Bad в лютеоцитах жёлтых тел яичников крыс. Иммуногистохимическая окраска непрямым стрептавидин-биотиновым методом. Объектив 40, окуляр 10

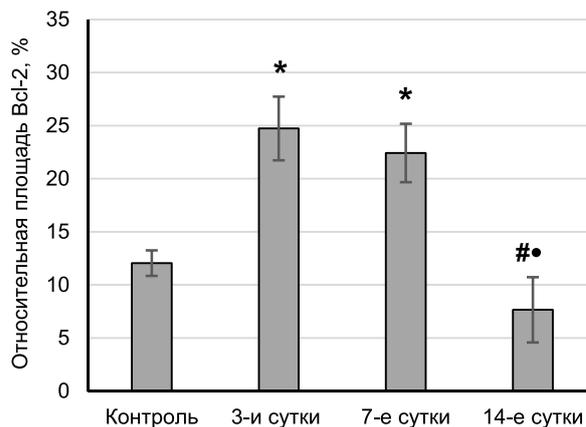
FIG. 1.
Detection of anti-apoptotic protein Bcl-2 and pro-apoptotic protein Bad in the rat ovaries corpus luteum cells. Immunohistochemical staining by indirect streptavidin-biotin method. Magnification $\times 400$



a

РИС. 2.

Площади экспрессии белков Bad (a) и Bcl-2 (б) в клетках жёлтых тел яичников крыс в разные сроки после воздействия ЭГ. Статистическая значимость различий ($p < 0,050$): * – сравнение с контролем, # – с 3-ми сутками, • – с 7-ми сутками



б

FIG. 2.

The expression areas of the proteins Bad (a) and Bcl-2 (б) in the rat ovaries corpus luteum cells at different times after exposure of experimental hyperthermia. The significance of the differences ($p < 0.050$): * – comparison with the control, # – with day 3, • – with day 7

с контролем (рис. 1, 2a). Наряду с этим, по сравнению с интактными животными, происходит усиление интенсивности окрашивания лютеоцитов на белок Bcl-2 (рис. 1). Площадь экспрессии белка Bcl-2 в клетках жёлтых тел яичников в 2 раза превышает значения контроля (рис. 2б), но индекс соотношения Bcl-2/Bad остаётся на уровне контроля (рис. 3). Это свидетельствует о том, что интенсивность апоптоза в клетках жёлтых тел яичников в острый период после ЭГ остаётся, по-видимому, в пределах физиологических значений.

На 7-е сутки после ЭГ площадь экспрессии белка Bad в клетках жёлтых тел сохраняется на уровне 3-х суток (т. е. в 2 раза превышает контрольные величины) (рис. 1, 2). Площадь экспрессии Bcl-2 в лютеоцитах также сохраняется на уровне 3-х суток. Намечается тенденция к уменьшению индекса Bcl2/Bad по сравнению с 3-ми сутками после ЭГ, что характеризует возможность активации внутреннего пути апоптоза клеток жёлтых тел яичников на 7-е сутки после ЭГ (рис. 1, 3).

К 14-м суткам площадь иммуногистохимической окраски клеток жёлтых тел для обоих протеинов снижается. Так, площадь экспрессии Bad уменьшается в 1,7 раза, а Bcl-2 – в 3,2 раза по сравнению с острым периодом (по сравнению с 7-ми сутками после ЭГ – уменьшение в 1,6 раза и в 2,9 раза соответственно) (рис. 1, 2).

В результате индекс соотношения площадей экспрессии Bcl-2/Bad практически в 2 раза уменьшается по сравнению с контролем и заметно уменьшается по сравнению с группой острого периода после ЭГ (рис. 3). Выявленное преобладание «белка смерти» Bad над «белком жизни» Bcl-2 в жёлтых телах яичников на 14-е сутки эксперимента свидетельствует о снятии антиапоптотической защиты, что приводит к активации митохондриального пути апоптоза лютеоцитов.

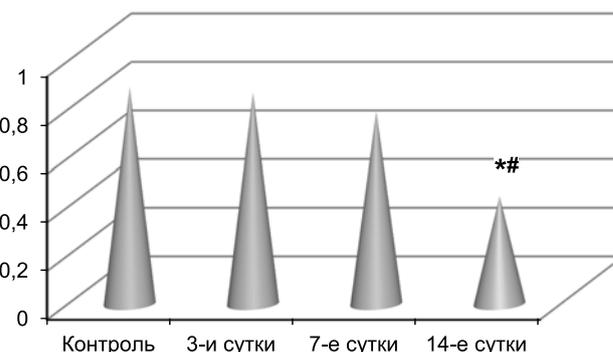


РИС. 3.

Соотношение показателей площадей экспрессии Bcl-2/Bad в клетках жёлтых тел яичников крыс после воздействия ЭГ. Статистическая значимость различий ($p < 0,050$): * – сравнение с контролем, # – с 3-ми сутками

FIG. 3.

The ratio of the Bcl-2/Bad expression areas in the rat ovaries corpus luteum cells after exposure of experimental hyperthermia. The significance of the differences ($p < 0.050$): * – comparison with the control, # – with day 3

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее показано, что действие ЭГ на организм ингибирует синтез и вызывает агрегацию и денатурацию нуклеиновых кислот и белков, влияет на клеточный цикл и апоптоз [16, 17]. При апоптозе действуют два механизма: один запускается связыванием «молекул смерти» с «рецепторами смерти» на поверхности клетки, а другой генерируется сигналами внутри клетки (опосредованные митохондриями), о чём свидетельствует увеличение как экспрессии каспазы-3, так и отношения Bax/Bcl-2

[18, 19]. Bcl-2 – это белок, который находится в ядерной оболочке и в митохондриях. Следует отметить, что митохондриальная ДНК более подвержена мутациям, чем геномная ДНК, и большая часть митохондрий жёлтых тел унаследована от ооцитов. Таким образом, согласно данным литературы, процессы в митохондриях играют решающую роль в принятии решения о жизни/смерти клеток яичников. Показано, что Bcl-2 определяется в лютеоцитах в середине лютеиновой фазы, а наиболее высокие уровни Bax – в регрессирующем жёлтом теле [4]. Изучение взаимосвязи между развитием апоптоза по митохондриальному пути и лютеиновой функции зернистых клеток яичника человека показало, что этот процесс также контролируется активацией каспазы-3 и цитохромом c митохондрий [2]. Известно, что экспрессия белка Bcl-2 во всех компонентах яичников связана с уровнями гонадотропинов: более высокие уровни гонадотропинов увеличивают экспрессию Bcl-2, снижают экспрессию Bax, Bad и снижают активность участвующих в реализации апоптозного сигнала протеаз, в частности, каспазы-3 [3, 4, 20, 21].

В данном исследовании установлено, что воздействие ЭГ в острый период хоть и способствует двукратному росту площади экспрессии белка Bad в лютеоцитах, но компенсируется таким же увеличением протеина Bcl-2. Такие перестройки в итоге удерживают динамику «митохондриальной ветви» апоптоза в клетках жёлтых тел яичников на физиологическом уровне. Ранее нами было показано, что в фолликулоцитах яичников крыс в острый период (3-и сутки) после воздействия ЭГ также происходит одновременная активация белков семейства Bcl-2, однако сверхэкспрессия белка Bcl-2 способствуют ограничению развития апоптоза, обеспечивая сохранность фолликулярного аппарата [10]. В предыдущих работах в фолликулоцитах яичников крыс на 7-е сутки после ЭГ нами выявлены изменения аналогичные данному исследованию: индекс Bcl-2/Bad не менялся по сравнению с контролем [11].

Кандидатом на роль фактора спасения лютеоцитов является Bcl-2, который предотвращает чрезмерную активацию Bad. Исследование механизмов гибели клеток в яичниках выявило, что ЭГ приводит к развитию окислительного стресса. Имеются указания, что из-за мощной сосудистой сети и стероидогенной активности жёлтые тела яичников сильно подвержены воздействию активных форм кислорода [1]. Возрастание содержания перекисных продуктов и изменённые уровни клеточных антиоксидантов создают дисбаланс между прооксидантной и антиоксидантной системами, тем самым изменяя цитотоксические ответы при ЭГ, что формирует возможные катастрофические последствия для репродуктивной функции [19].

Белки Bcl-2 встроены в митохондриальные мембраны и закрывают их каналы, предотвращают выход протеазы AIF и цитохрома c, защищая клетку от развития апоптоза. При этом Bcl-2 блокирует реакции перекисного окисления липидов в мембранах клеток, обеспечивая защиту клеток от повреждения свободными радикалами.

Таким образом, основной функцией избыточной экспрессии белка Bcl-2 при тепловом стрессе является защита клеток от гибели.

На 14-е сутки после ЭГ нами выявлено возрастание относительной площади клеток жёлтых тел яичников, экспрессирующих белок Bad на фоне менее выраженного увеличения площади Bcl-2. Заметим, что снижение экспрессии Bcl-2 (антиапоптотической защиты) можно рассматривать как проявление механизма, направленного на удаление дефектных клеток. Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о «снятии» антиапоптотической защиты и активации митохондриального пути апоптоза в лютеоцитах на 14-е сутки восстановительного периода после ЭГ.

Возможно, выявленная нами активация апоптоза в лютеоцитах на 14-е сутки после ЭГ связана с попыткой организма животных восстановить естественный овариально-маточный цикл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленное преобладание «белка смерти» Bad над «белком жизни» Bcl-2 в жёлтых телах яичников на 14-е сутки эксперимента свидетельствует о нарушении антиапоптотической защиты, что приводит к активации митохондриального пути апоптоза лютеоцитов. Снижение экспрессии Bcl-2 (антиапоптотической защиты) может быть расценено как проявление механизма, направленного на удаление дефектных лютеоцитов, и стремление организма животных нормализовать нарушенный воздействием высокой температуры овариально-маточный цикл.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Al-Gubory KH, Garrel C, Faure P, Sugino N. Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. *Reprod Biomed Online*. 2012; 25(6): 551-560. doi: 10.1016/j.rbmo.2012.08.004
2. Makino A, Ozaki Y, Matsubara H, Sato T, Ikuta K, Nishizawa Y, et al. Role of apoptosis controlled by cytochrome c released from mitochondria for luteal function in human granulosa cells. *Am J Reprod Immunol*. 2005; 53(3): 144-152. doi: 10.1111/j.1600-0897.2005.00258.x
3. Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update*. 2005; 11(2): 162-177. doi: 10.1093/humupd/dmi001
4. Зенкина В.Г., Каредина В.С., Солодкова О.А., Михайлов А.О. Регуляторы апоптоза и механизм их действия в женской гонаде. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2010; 7: 7-14.
5. Hernandez F, Peluffo MC, Bas D, Stouffer RL, Tesone M. Local effects of the sphingosine 1-phosphate on prostaglandin

F2alpha-induced luteolysis in the pregnant rat. *Mol Reprod Dev.* 2009; 76(12): 1153-1164. doi: 10.1002/mrd.21083

6. Al-Zi'abi MO, Fraser HM, Watson ED. Cell death during natural and induced luteal regression in mares. *Reproduction.* 2002; 23(1): 67-77.

7. Amelkina O, Zschockelt L, Painer J, Serra R, Villaespesa F, Braun BC, et al. Apoptosis-related factors in the luteal phase of the domestic cat and their involvement in the persistence of corpora lutea in lynx. *PLoS One.* 2015; 10(11): e0143414. doi: 10.1371/journal.pone.0143414

8. Meng L, Jan SZ, Hamer G, van Pelt AM, van der Stelt I, Keijzer J, et al. Preantral follicular atresia occurs mainly through autophagy, while antral follicles degenerate mostly through apoptosis. *Biol Reprod.* 2018; 99(4): 853-863. doi: 10.1093/biolre/iyoy116

9. Zheng Y, Ma L, Liu N, Tang X, Guo S, Zhang B, et al. Autophagy and apoptosis of porcine ovarian granulosa cells during follicular development. *Animals (Basel).* 2019; 9(12): 1111. doi: 10.3390/ani912111

10. Мичурина С.В., Колесников С.И., Бочкарева А.Л., Архипов С.А., Ищенко И.Ю. Экспрессия белков семейства Bcl-2 в фолликулярном аппарате яичников в острый период после экспериментальной гипертермии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2017; 164(12): 754-758.

11. Мичурина С.В., Колесников С.И., Бочкарева А.Л., Ищенко И.Ю., Архипов С.А. Экспрессия белков-регуляторов апоптоза Bcl-2 и Bad в фолликулярном аппарате яичников крыс в восстановительном периоде после экстремальной гипертермии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2019; 168(8): 155-160.

12. Мичурина С.В., Колесников С.И., Ищенко И.Ю., Бочкарева А.Л., Архипов С.А. Влияние мелатонина на экспрессию белков-регуляторов апоптоза Bcl-2 и Bad в фолликулярном аппарате яичников после воздействия высокой температуры. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2020; 170(11): 552-558.

13. Ajayi AF, Akhigbe RE. Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an Update. *Fertil Res Pract.* 2020; 6: 5. doi: 10.1186/s40738-020-00074-3

14. Cora MC, Kooistra L, Travlos G. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: Review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicol Pathol.* 2015; 43(6): 776-793. doi: 10.1177/0192623315570339

15. Ефремов А.В., Пахомова Ю.В., Пахомов Е.А., Ибрагимов Р.Ш., Шорина Г.Н. Способ экспериментального моделирования общей гипертермии у мелких лабораторных животных: Патент № 2165105 Рос. Федерация; МПК G09B 23/28 (2000.01); заявитель и патентообладатель Новосибирская государственная медицинская академия. № 99126978/13; заявл. 22.12.1999; опубл. 10.04.2001. 2001; (10).

16. Улащик В.С. Локальная гипертермия в онкологии: использование магнитного поля, лазерного излучения, ультразвука. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры.* 2014; 91(2): 48-57.

17. Lellahi SM, Rosenlund IA, Hedberg A, Kiær LT, Mikkola I, Knutsen E, et al. The long noncoding RNA *NEAT1* and nuclear paraspeckles are up-regulated by the transcription factor HSF1 in the heat shock response. *J Biol Chem.* 2018; 293(49): 18965-18976. doi: 10.1074/jbc.RA118.004473

18. Gu ZT, Li L, Wu F, Zhao P, Yang H, Liu YS, et al. Heat stress induced apoptosis is triggered by transcription-independent p53,

Ca(2+) dyshomeostasis and the subsequent Bax mitochondrial translocation. *Sci Rep.* 2015; 5: 11497. doi: 10.1038/srep11497

19. Wang Y, Yang C, Elsheikh NAH, Li C, Yang F, Wang G, et al. HO-1 reduces heat stress-induced apoptosis in bovine granulosa cells by suppressing oxidative stress. *Aging (Albany NY).* 2019; 11(15): 5535-5547. doi: 10.18632/aging.102136

20. Luo M, Li L, Xiao C, Sun Y, Wang GL. Heat stress impairs mice granulosa cell function by diminishing steroids production and inducing apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 2016; 412(1-2): 81-90. doi: 10.1007/s11010-015-2610-0

21. Bowolaksono A, Fauzi M, Sundari AM, Pustimbara A, Lestari R, Abinawanto, et al. The effects of luteinizing hormone as a suppression factor for apoptosis in bovine luteal cells *in vitro*. *Reprod Domest Anim.* 2021; 56(5): 744-753. doi: 10.1111/rda.13913

REFERENCES

1. Al-Gubory KH, Garrel C, Faure P, Sugino N. Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. *Reprod Biomed Online.* 2012; 25(6): 551-560. doi: 10.1016/j.rbmo.2012.08.004

2. Makino A, Ozaki Y, Matsubara H, Sato T, Ikuta K, Nishizawa Y, et al. Role of apoptosis controlled by cytochrome c released from mitochondria for luteal function in human granulosa cells. *Am J Reprod Immunol.* 2005; 53(3): 144-152. doi: 10.1111/j.1600-0897.2005.00258.x

3. Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update.* 2005; 11(2): 162-177. doi: 10.1093/humupd/dmi001

4. Zenkina VG, Karedina VS, Solodkova OA, Mikhailov AO. Regulators of apoptosis and the mechanism of their action in the female gonad. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy.* 2010; 7: 7-14. (In Russ.).

5. Hernandez F, Peluffo MC, Bas D, Stouffer RL, Tesone M. Local effects of the sphingosine 1-phosphate on prostaglandin F2alpha-induced luteolysis in the pregnant rat. *Mol Reprod Dev.* 2009; 76(12): 1153-1164. doi: 10.1002/mrd.21083

6. Al-Zi'abi MO, Fraser HM, Watson ED. Cell death during natural and induced luteal regression in mares. *Reproduction.* 2002; 23(1): 67-77.

7. Amelkina O, Zschockelt L, Painer J, Serra R, Villaespesa F, Braun BC, et al. Apoptosis-related factors in the luteal phase of the domestic cat and their involvement in the persistence of corpora lutea in lynx. *PLoS One.* 2015; 10(11): e0143414. doi: 10.1371/journal.pone.0143414

8. Meng L, Jan SZ, Hamer G, van Pelt AM, van der Stelt I, Keijzer J, et al. Preantral follicular atresia occurs mainly through autophagy, while antral follicles degenerate mostly through apoptosis. *Biol Reprod.* 2018; 99(4): 853-863. doi: 10.1093/biolre/iyoy116

9. Zheng Y, Ma L, Liu N, Tang X, Guo S, Zhang B, et al. Autophagy and apoptosis of porcine ovarian granulosa cells during follicular development. *Animals (Basel).* 2019; 9(12): 1111. doi: 10.3390/ani912111

10. Michurina SV, Kolesnikov SI, Bochkareva AL, Arkhipov SA, Ishchenko IYu. Expression of Bcl-2 family proteins in the ovarian follicular apparatus in the acute period after experimental hyperthermia. *Bull Exp Biol Med.* 2018; 164(6): 780-783. doi: 10.1007/s10517-018-4079-9

11. Michurina SV, Kolesnikov SI, Bochkareva AL, Ishchenko IYu, Arkhipov SA. Expression of apoptosis regulator proteins Bcl-2 and Bad in rat ovarian follicular apparatus during recovery after extreme hypothermia. *Bull Exp Biol Med.* 2019; 168(2): 205-209. doi: 10.1007/s10517-019-04675-x
12. Michurina SV, Kolesnikov SI, Ishchenko IY, Bochkareva AL, Arkhipov SA. Effect of melatonin on expression of apoptosis regulator proteins Bcl-2 and Bad in ovarian follicular apparatus after high temperature exposure. *Bull Exp Biol Med.* 2021; 170(5): 598-603. doi: 10.1007/s10517-021-05114-6
13. Ajayi AF, Akhigbe RE. Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an Update. *Fertil Res Pract.* 2020; 6: 5. doi: 10.1186/s40738-020-00074-3
14. Cora MC, Kooistra L, Travlos G. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: Review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicol Pathol.* 2015; 43(6): 776-793. doi: 10.1177/0192623315570339
15. Efremov AV, Pakhomova YuV, Pakhomov EA, Ibragimov RSh, Shorina GN. *Method of experimental modeling of general hyperthermia in small laboratory animals*: Patent N 2165105 of the Russian Federation. 2001; (10). (In Russ.).
16. Ulashchik VS. Local hyperthermia in oncology: the use of a magnetic field, laser radiation, ultrasound. *Voprosy kurortologii, fizioterapii, i lechebnoi fizicheskoi kultury.* 2014; 91(2): 48-57. (In Russ.).
17. Lellahi SM, Rosenlund IA, Hedberg A, Kiær LT, Mikkola I, Knutsen E, et al. The long noncoding RNA *NEAT1* and nuclear paraspeckles are up-regulated by the transcription factor HSF1 in the heat shock response. *J Biol Chem.* 2018; 293(49): 18965-18976. doi: 10.1074/jbc.RA118.004473
18. Gu ZT, Li L, Wu F, Zhao P, Yang H, Liu YS, et al. Heat stress induced apoptosis is triggered by transcription-independent p53, Ca(2+) dyshomeostasis and the subsequent Bax mitochondrial translocation. *Sci Rep.* 2015; 5: 11497. doi: 10.1038/srep11497
19. Wang Y, Yang C, Elsheikh NAH, Li C, Yang F, Wang G, et al. HO-1 reduces heat stress-induced apoptosis in bovine granulosa cells by suppressing oxidative stress. *Aging (Albany NY).* 2019; 11(15): 5535-5547. doi: 10.18632/aging.102136
20. Luo M, Li L, Xiao C, Sun Y, Wang GL. Heat stress impairs mice granulosa cell function by diminishing steroids production and inducing apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 2016; 412(1-2): 81-90. doi: 10.1007/s11010-015-2610-0
21. Bowolaksono A, Fauzi M, Sundari AM, Pustimbara A, Lestari R, Abinawanto, et al. The effects of luteinizing hormone as a suppression factor for apoptosis in bovine luteal cells *in vitro*. *Reprod Domest Anim.* 2021; 56(5): 744-753. doi: 10.1111/rda.13913

Сведения об авторах

Светлана Викторовна Мичурина – доктор медицинских наук, профессор, руководитель группы экспериментальной фармакологии, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: michurinasv3000@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3630-4669>

Сергей Иванович Колесников – доктор медицинских наук, академик РАН, главный научный сотрудник, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»; профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», e-mail: sikolesnikov2012@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2124-6328>

Ирина Юрьевна Ищенко – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник группы экспериментальной фармакологии, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: irenisch@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6281-0402>

Сергей Алексеевич Архипов – доктор биологических наук, старший научный сотрудник группы экспериментальной фармакологии, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: arhipowsergei@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1390-4426>

Information about the authors

Svetlana V. Michurina – Dr. Sc. (Med.), Professor, Head of the Group of Experimental Pharmacology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, e-mail: michurinasv3000@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3630-4669>

Sergey I. Kolesnikov – Dr. Sc. (Med.), Academician of the RAS, Chief Scientific Officer, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems; Professor, Lomonosov Moscow State University, e-mail: sikolesnikov2012@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2124-6328>

Irina Yu. Ishchenko – Cand. Sc. (Biol.), Leading Research Officer of the Group of Experimental pharmacology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, e-mail: irenisch@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6281-0402>

Sergey A. Arkhipov – Dr. Sc. (Biol.), Senior Research Officer of the Group of Experimental Pharmacology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, e-mail: arhipowsergei@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1390-4426>