

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ EXPERIMENTAL RESEARCHES

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА ЭКСПРЕССИЮ БЕЛКОВ Bcl-2 и Bad В КЛЕТКАХ ЖЁЛТЫХ ТЕЛ ЯИЧНИКОВ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕРМИИ

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

Растёт интерес к выяснению роли мелатонина (МТ) в регуляции пролиферации и апоптоза клеток яичников при различных заболеваниях и дестабилизирующих воздействиях. Считается, что выбор между реализацией программы гибели или выживания клетки определяет соотношение антиапоптотических и проапоптотических белков.

Цель. Выявить влияние мелатонина на экспрессию антиапоптотического Bcl-2 и проапоптотического Bad и соотношение Bcl-2/Bad в лютеоцитах яичников крыс Вистар в острый (3-и сутки) и восстановительный (7-е и 14-е сутки) периоды после однократного воздействия экспериментальной гипертермии (ЭГ).

Методы. Разогревание составляло не более 17 минут. МТ вводили подкожно (0,1 мг в 0,2 мл физиологического раствора (ФР)) в течение 3 суток после ЭГ. Группы сравнения – крысы с введением ФР (контроль) и животные после ЭГ и ФР. Экспрессию Bad и Bcl-2 определяли иммуногистохимически на 3-и, 7-е и 14-е сутки после ЭГ и введения МТ/ФР.

Результаты. На 3-и сутки после ЭГ эффект гормона не выявлялся. Через неделю после ЭГ + МТ площадь экспрессии Bad уменьшалась значительно, чем у крыс после ЭГ + ФР, что приводило к росту Bcl-2/Bad. Это свидетельствовало об увеличении антиапоптотической защиты, блокирующей развитие внутреннего пути апоптоза на данном сроке. Через 2 недели после ЭГ + ФР площадь Bcl-2 уменьшалась значительно, чем площадь Bad. В результате Bcl-2/Bad практически в 2 раза снижался по сравнению с контролем. Это свидетельствовало об активации «митохондриальной ветви» апоптоза лютеоцитов. Через 2 недели после ЭГ + МТ площади Bad и Bcl-2 уменьшались синхронно, что восстанавливало Bcl-2/Bad до контроля.

Заключение. Введение МТ после ЭГ сдвигает соотношение площадей экспрессии Bcl-2/Bad в сторону увеличения антиапоптотического Bcl-2 уже через неделю восстановительного периода и способствует более ранней нормализации Bcl-2/Bad до физиологического уровня (уже через 2 недели после ЭГ + МТ).

Ключевые слова: мелатонин, апоптоз, экспериментальная гипертермия, яичники крыс, жёлтые тела, лютеоциты, Bad, Bcl-2, Bcl-2/Bad

Для цитирования: Мичурина С.В., Колесников С.И., Ищенко И.Ю., Архипов С.А. Влияние мелатонина на экспрессию белков Bcl-2 и Bad в клетках жёлтых тел яичников после воздействия экспериментальной гипертермии. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(1): 203-213. doi: 10.29413/ABS.2024-9.1.20

Статья поступила: 21.04.2023

Статья принята: 15.01.2024

Статья опубликована: 26.03.2024

THE EFFECT OF MELATONIN ON THE Bcl-2 AND Bad PROTEINS EXPRESSION IN OVARIAN CORPUS LUTEUM CELLS AFTER EXPOSURE TO EXPERIMENTAL HYPERTHERMIA

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

¹ Research Institute of Clinical
and Experimental Lymphology –
Branch of the 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. There is growing interest in determining the role of melatonin in the regulation of proliferation and apoptosis of ovarian cells at various diseases and destabilizing influences. It is believed that the choice between the implementation of a cell death or survival program determines the ratio of anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins.

The aim. To identify the effect of melatonin on the expression of anti-apoptotic Bcl-2 and pro-apoptotic Bad and the Bcl-2/Bad ratio in the ovarian luteocytes of Wistar rats in the acute (day 3) and recovery (days 7 and 14) periods after a single exposure to experimental hyperthermia.

Methods. Warming up took no more than 17 minutes. Melatonin was injected subcutaneously (0.1 mg in 0.2 ml of physiological solution) for 3 days after experimental hyperthermia. Comparison groups included rats with physiological solution injection (control) and animals after experimental hyperthermia + physiological solution injection. The Bad and Bcl-2 expression was determined immunohistochemically on days 3, 7 and 14 after experimental hyperthermia + physiological solution or melatonin injection.

Results. On the day 3 after experimental hyperthermia, the effect of the hormone was not detected. A week after experimental hyperthermia + melatonin injection, the Bad expression area decreased more significantly than in rats after experimental hyperthermia + physiological solution injection, which led to an increase in Bcl-2/Bad ratio. This indicated an increase in anti-apoptotic protection, blocking the development of the internal apoptosis pathway at this time. 2 weeks after experimental hyperthermia + physiological solution injection, the Bcl-2 area decreased more significantly than the Bad area. As a result, the Bcl-2/Bad ratio decreased almost 2-fold compared to the control group. This indicated the activation of the “mitochondrial branch” of luteocyte apoptosis. 2 weeks after experimental hyperthermia + melatonin injection, the Bad and Bcl-2 areas decreased synchronously, which restored Bcl-2/Bad to control values.

Conclusion. The melatonin injection after experimental hyperthermia shifts the ratio of Bcl-2/Bad expression areas towards an increase in anti-apoptotic Bcl-2 already a week after the recovery period and promotes earlier normalization of Bcl-2/Bad to physiological levels (as early as 2 weeks after experimental hyperthermia + melatonin injection).

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

Received: 21.04.2023

Accepted: 15.01.2024

Published: 26.03.2024

For citation: Michurina S.V., Kolesnikov S.I., Ishchenko I.Yu., Arkhipov S.A. The effect of melatonin on the Bcl-2 and Bad proteins expression in ovarian corpus luteum cells after exposure to experimental hyperthermia. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(1): 203-213. doi: 10.29413/ABS.2024-9.1.20

ВВЕДЕНИЕ

В современных условиях возрастает влияние высокой температуры на организм человека в связи с глобальным изменением климата, освоением регионов с жарким климатом, развитием туризма и миграции, а также с работой в ряде отраслей промышленности (металлургической, угольной, горнорудной и др.). Вместе с тем к настоящему времени накоплен обширный научный материал об использовании гипертермии для терапии онкологических, инфекционных, паразитарных заболеваний, наркозависимых состояний, СПИДа. Общая гипертермия в диапазоне температур от 42,5° до 44,0 °C является экстремальным фактором внешней среды, на действие которого организм реагирует комплексом сложных изменений, приводящих к глубоким расстройствам клеточных и внеклеточных взаимоотношений в биологических структурах и значительным нарушениям кровообращения и лимфотока, развитием гипоксии и стимуляцией апоптоза. В таких условиях значительную нагрузку испытывают репродуктивные органы, в частности яичники, являющиеся центральным звеном женской половой сферы [1].

Важно отметить, что вызванная стрессом регулируемая клеточная гибель также представляет собой стратегию сохранения биологического равновесия, напоминающую адаптивный ответ на стресс.

Выделяются два основных пути передачи сигнала апоптоза: рецептор-зависимый (внешний) сигнальный путь с участием рецепторов клеточной гибели, экспрессируемых на поверхности клеточной мембраны, и митохондриальный (внутренний или собственный) путь. Внутренний путь апоптоза – это форма регулируемой клеточной гибели, запускаемая различными изменениями микроокружения, включая повреждение ДНК, стресс эндоплазматического ретикула, избыток активных форм кислорода и др. Митохондриальный сигнальный путь апоптоза реализуется в результате повышения проницаемости наружной мембраны митохондрий, выхода апоптогенных белков из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму клетки и последующего запуска целого каскада реакций, приводящего в итоге к развитию программируемой клеточной гибели. Важную роль в механизмах регуляции программируемой клеточной гибели играет ингибитор апоптоза – белок Bcl-2, предотвращающий транслокацию Bcl-2-ассоциированных проапоптозных белков клеточной гибели Bax и Bad за счёт олигомеризации с этими белками и блокирующий таким образом высвобождение проапоптотических малых молекул из митохондрий [2]. Соотношение активных форм ингибиторов и индукторов апоптоза определяет выбор между реализацией программы гибели и выживанием клетки и информативно при определении степени ингибирования апоптоза [3]. Возможность влиять на взаимодействие антиапоптотических и проапоптотических членов семейства BCL-2 с помощью фармакологических или генетических вмешательств имеет большое значение в медицине при лечении различных (онкологических, аутоиммунных, нейродегенеративных и др.) заболеваний [3].

Любые стрессы и экстремальные воздействия, включая гипертермию, приводят к нарушениям систем детоксикации и адаптации организма. В восстановлении нарушенного гомеостаза и оптимизации функций различных органов и систем принимает участие гормон эпифиза – мелатонин (МТ). Этот гормон, обладающий широким спектром свойств, является основным синхронизатором эндогенных ритмов организма, а также мощным антиоксидантом. Причём МТ является антиоксидантом, который находится в митохондриях клеток, при этом в более высоких концентрациях, чем в других органеллах или субклеточных участках. Считается, что МТ даже может синтезироваться в митохондриях [4]. Одним из наиболее значимых физиологических свойств эпифизарного МТ является его способность регулировать клеточную пролиферацию и апоптоз [5, 6].

Эпифизарный МТ участвует в регуляции секреции половых гормонов и процессов полового созревания, обеспечивая тем самым полноценное функционирование репродуктивной системы. Дефицит МТ у мышей приводит к атрезии фолликулов и ускоряет возрастное снижение фертильности [7]. Этот гормон является ключевым регулятором репродуктивных функций человека [8].

Жёлтое тело выполняет роль временно функционирующего органа и определяет решающее значение в регуляции эстрального цикла и поддержании беременности. Лютеиновую функцию в значительной степени осуществляет прогестерон – основной стероидный гормон, синтезируемый этой железой. Установлено, что МТ играет ключевую роль в физиологии репродукции, регулируя выработку пролактина, фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов. Синтез МТ в яичниках и яичках отражает ауто- и паракринную регуляцию репродуктивной физиологии, гарантируя высокое качество яйцеклетки и спермы. Гормон вырабатывается в клетках эпителия, стромы, миометрия и участвует в поддержании гомеостаза органа, регулируя множественные пути, связанные с процессами децидуализации и имплантации [9]. МТ функционирует как важный регулятор в яичнике, на что указывает экспрессия мелатониновых рецепторов MT1 и MT2 в различных компартментах яичника [10]. Подтверждено наличие MT1 и MT2 в лютеоцитах и регулирующая роль МТ в эндокринной функции жёлтых тел яичников лошадей [11], свиней, мышей [10, 12]. Установлено, что этот гормон способен увеличивать высвобождение прогестерона жёлтыми телами у супоросных свиноматок [10], индуцировать выработку прогестерона гранулезными и лютеиновыми клетками у человека [13]. МТ активирует набор генов, экспрессирующихся в жёлтых телах свиноматок и мышей, связанных с синтезом прогестерона, включая член 1 подсемейства А семейства 11 цитохрома P450 (*Cyp11a1*), член C18 семейства 1 альдокеторедуктазы (*Akr1c18*), изопентенилдифосфат-дельта-изомеразу 1 (*Idi1*) и рецептор лютеинизирующего гормона/хориогонадотропина (LHCGR), и, как следствие, повышает выработку прогестерона у свиноматок [14].

В настоящее время возрос интерес к выяснению роли МТ в регуляции клеточной пролиферации и апоп-

тоза в ряде различных клеток яичника. Однако в научных публикациях недостаточно освещены аспекты, касающиеся роли МТ и его влияния на «митохондриальную ветвь» апоптоза в лютеоцитах жёлтых тел яичников в экспериментальных моделях перегрева. Это определило наш интерес к изучению влияния МТ на процессы программируемой клеточной гибели в клетках жёлтых тел яичников при воздействии высокой температуры.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провести анализ влияния мелатонина после однократного воздействия экспериментальной гипертермии (ЭГ) на экспрессию ингибитора апоптоза белка Bcl-2 и индуктора программируемой клеточной гибели протеина Bad и на соотношение Bcl-2/Bad в лютеоцитах крыс Wistar в острый (3-и сутки) и восстановительный (7-е и 14-е сутки) периоды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на 3-месячных самках крыс линии Wistar массой тела 180–200 г. Животные содержались в сертифицированном виварии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России при температуре воздуха 20–22 °C на стандартном пищевом рационе и при свободном доступе к воде. Эксперименты выполняли в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза о защите животных, используемых в научных целях, и правилами надлежащей лабораторной практики. Исследование одобрено Этическим комитетом Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (протокол № 128 от 15.03.2017). Определение фаз полового цикла проводили методом вагинальных мазков [15]. Крыс, находившихся в фазе диэструс полового цикла, подвергали однократному воздействию ЭГ в соответствии со «Способом экспериментального моделирования общей гипертермии у мелких лабораторных животных» [16]. Согласно способу моделирования общей гипертермии, разогревание животных производилось в резервуаре стандартной термобани ТБ-110 при погружении в горячую воду до уровня шеи. Конструкция термобани предусматривает автоматическое поддержание температуры нагрева воды и равномерное перемешивание её слоёв, что позволяет считать в эксперименте температуру теплоносителя величиной постоянной. Преимущество моделирования общей гипертермии в водной среде перед воздушной заключается в том, что осуществляется равномерное, глубокое и быстрое нагревание организма животного. Температурный режим нагрева горячей воды-теплоносителя подбирался экспериментально и составил 45 °C. Время разогре-

вания каждой особи до уровня ректальной температуры 43,5 °C (стадия теплового удара) составляло не более 17 минут и было индивидуальным. Гибели крыс от гипертермии не зарегистрировано.

Было сформировано три группы: 1-я (контроль) – крысы без воздействия ЭГ, которым подкожно вводили 0,2 мл физиологического раствора (ФР); 2-я (ЭГ + ФР) – животные, подвергнутые воздействию ЭГ и получавшие 0,2 мл ФР; 3-я (ЭГ + МТ) – животные, подвергнутые воздействию ЭГ и получавшие МТ. МТ (ICN Biomedicals, Inc, США) вводили подкожно в дозе по 0,1 мг в 0,2 мл ФР. Первое введение МТ осуществляли в день проведения ЭГ, затем – в последующие 2 суток (вечером, после захода солнца, 1 раз в сутки). Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом через 3 (острый период), 7 и 14 суток (восстановительный период) после воздействия ЭГ и МТ, что соответствовало представлениям о фазности в течении постгипертермического периода. На каждую точку выведения из опыта приходилось по 5 особей из каждой группы.

Фиксацию яичников проводили в 10%-м растворе нейтрального формалина, затем их обезживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заключали в парафин. Иммуногистохимическое исследование экспрессии белков Bcl-2 и Bad проводили на парафиновых срезах яичников толщиной 3 мкм с помощью непрямого двухэтапного стрептавидин-биотинового метода, используя набор Novostain 500 (NCL-RTU-D, Novocastra; Великобритания), мышиные моноклональные антитела к антиапоптотическому белку Bcl-2 (IgG, № 610538; BD Biosciences, США) и к проапоптотическому белку Bad (IgG, № 610392; ICN Biosciences, Inc., США). На последнем этапе иммуногистохимическое окрашивание осуществлялось в хромогенном субстрате, содержащем диаминобензидин. Изучение срезов и получение микрофотографий выполняли при помощи моторизованного микроскопа Axiolmager M2 (Carl Zeiss, Германия) с камерой AxioCam HRc (Carl Zeiss, Германия) при конечном увеличении в 630 раз. Количественную оценку относительных площадей окрашенных участков осуществляли с помощью компьютерной программы Axio Vision 4.7.1 (Carl Zeiss, Германия) и блока автоматических измерений (NEXIV AutoMeasure; Nikon, Япония). Вычисляли соотношение площадей Bcl-2/Bad.

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Statistica 6.1 (StatSoft Inc.; серийный № AXXR101E832903FA). В качестве исходных данных по каждому маркеру сравнивали различия по среднему полю зрения в группе. Каждая выборка включала до 50 полей зрения на каждую группу для каждого маркера. Выборки соответствовали нормальному распределению. Вычисляли значения среднего арифметического и стандартной ошибки среднего. Статистическую значимость различий сравниваемых величин определяли с помощью параметрического критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для соотношения Bcl-2/Bad определяли значения медианы, первого и третьего квартилей. Статистическую значимость различий сравниваемых величин вычисля-

ли с помощью непараметрического U-критерия Манна – Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В клетках жёлтых тел на 3-и сутки эксперимента при введении как плацебо, так и МТ после ЭГ площади экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 и проапоптотического протеина Bad увеличивались синхрон-

но (рис. 2). Наряду с этим происходило усиление интенсивности окрашивания лютеоцитов на оба белка (рис. 1). В результате у животных обеих групп соотношение Bcl-2/Bad оставалось на уровне контроля (рис. 3). Это свидетельствует о том, что интенсивность апоптоза в клетках жёлтых тел яичников в острый период после ЭГ остаётся в пределах физиологических значений, и на этом этапе МТ не оказывает статистически значимого влияния на развитие клеточной гибели.

Через неделю после ЭГ и введения ФР площади экспрессии Bcl-2 и Bad в лютеоцитах и соотношение Bcl2/Bad

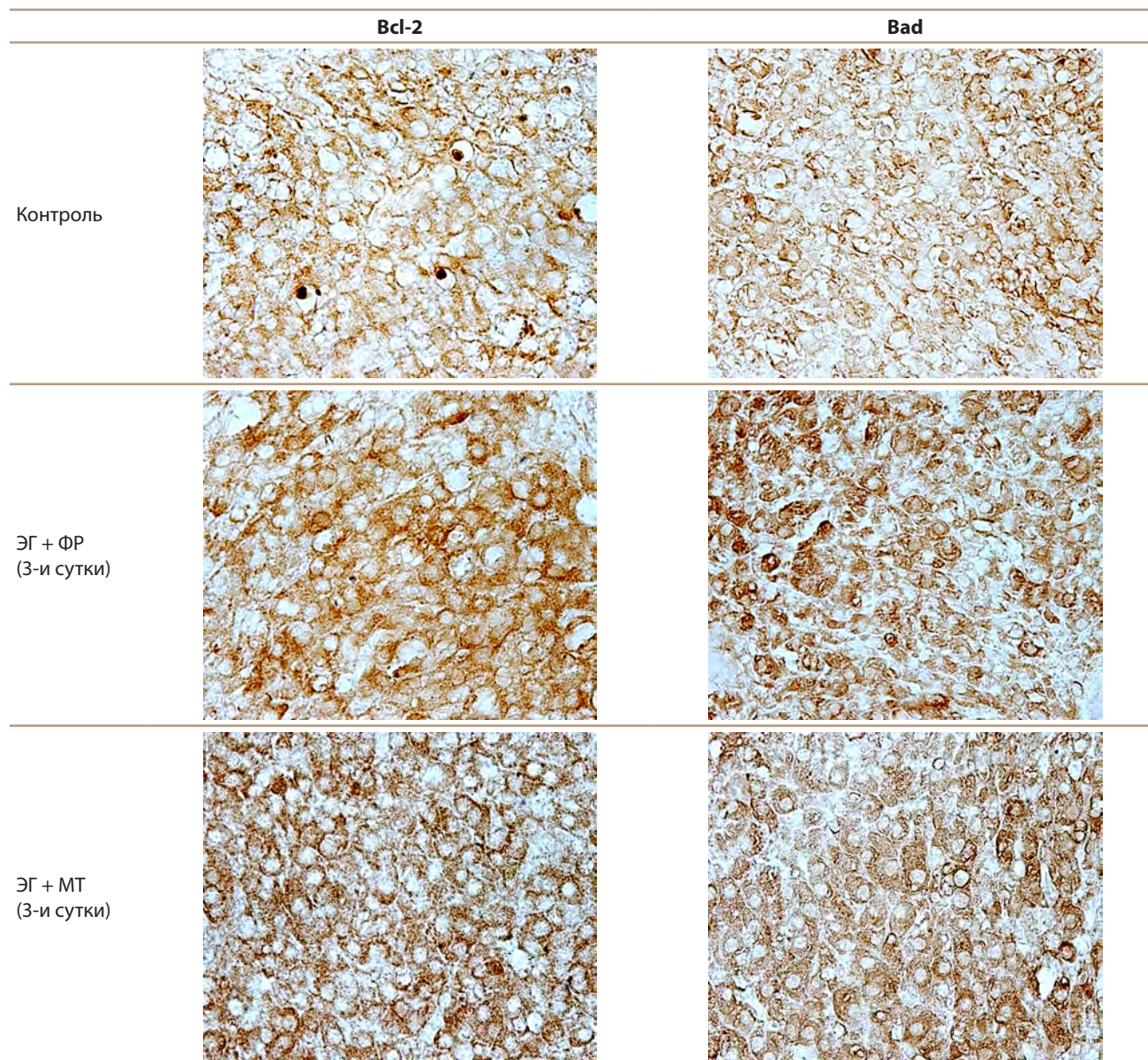


РИС. 1.

Микрофотографии жёлтых тел яичников крыс на 3-и сутки после воздействия экспериментальной гипертермии (ЭГ) и введения физиологического раствора (ФР) либо мелатонина (МТ). Иммуногистохимическая окраска непрямым стрептавидин-биотиновым методом на антиапоптотический белок Bcl-2 и проапоптотический белок Bad в клетках жёлтых тел; увеличение $\times 400$

FIG. 1.

Microphotographs of rat ovarian corpus luteum on day 3 after exposure to experimental hyperthermia (ЭГ) and physiological solution (ФР) or melatonin (MT) injection. Immunohistochemical staining by indirect streptavidin-biotin method for anti-apoptotic protein Bcl-2 and pro-apoptotic protein Bad in corpus luteum cells; magnification $\times 400$

сохранялись на уровне 3-х суток (рис. 2, 3). Введение МТ после гипертермии способствовало уменьшению интенсивности окрашивания (рис. 1, 2) и снижению показателей для обоих белков по сравнению со всеми группами (рис. 2). Однако площадь экспрессии проапоптотического белка Bad уменьшалась значительно, чем антиапоптотического протеина Bcl-2 (рис. 2). В результате на этом сро-

ке восстановительного периода соотношение Bcl2/Bad статистически значимо возрастало по сравнению со всеми группами (рис. 3). Это свидетельствует о более раннем создании антиапоптотической защиты, блокирующей развитие внутреннего пути апоптоза клеток жёлтых тел яичников уже на 7-е сутки после гипертермии и введения МТ по сравнению с животными без лечения МТ.

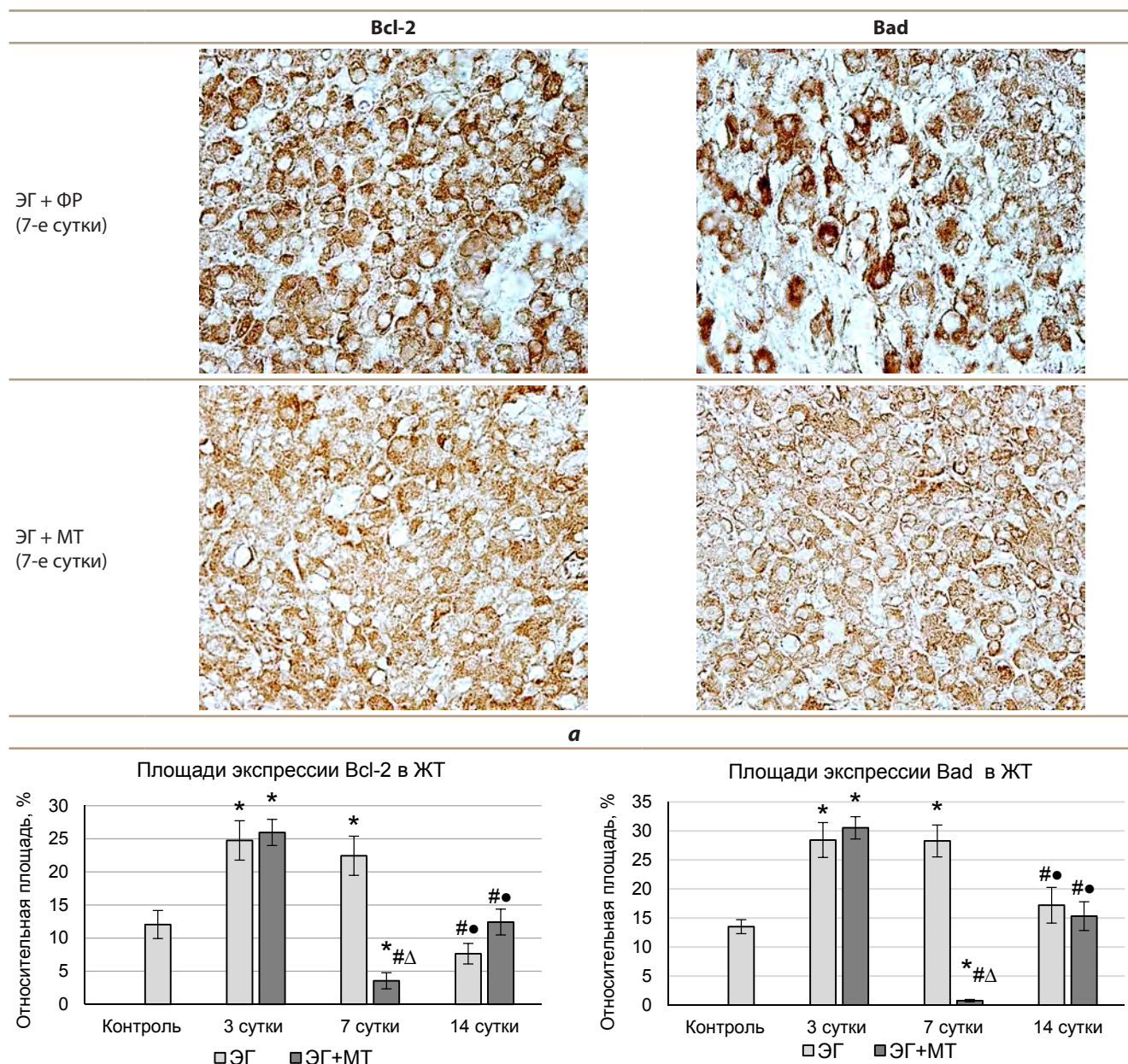


РИС. 2.

а – микрофотографии жёлтых тел яичников крыс на 7-е сутки после воздействий ЭГ + ФР и ЭГ + МТ; иммуногистохимическая окраска непрямым стрептавидин-биотиновым методом на Bcl-2 и Bad в клетках жёлтых тел; увеличение $\times 400$.

б – графики площади экспрессии исследуемых белков в разные сроки эксперимента ($p < 0,05$): * – по сравнению с контролем; # – по сравнению с 3-ми сутками; • – по сравнению с 7-ми сутками; Δ – межгрупповое сравнение одного и того же срока

6

FIG. 2.

а – microphotographs of rat ovarian corpus luteum on day 7 after exposure to experimental hyperthermia (ЭГ) and physiological solution (ФР) or melatonin (MT) injection; immunohistochemical staining by indirect streptavidin-biotin method for Bcl-2 and Bad in corpus luteum cells; magnification $\times 400$. **б** – graphs of the expression area of the studied proteins at different time periods of the experiment ($p < 0,05$): * – compared to the control; # – compared to day 3; • – compared to day 7; Δ – an intergroup comparison of the same period

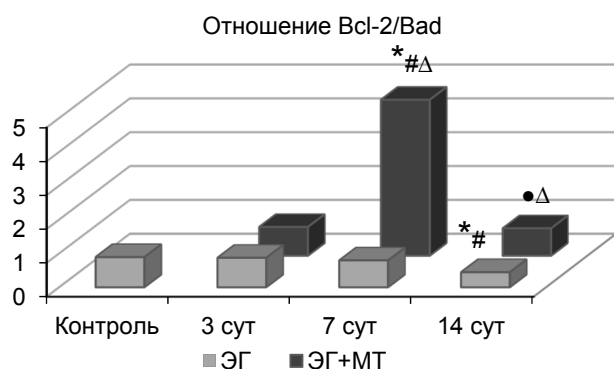


РИС. 3.

Соотношение площадей экспрессии Bcl-2/Bad в разные сроки эксперимента ($p < 0,05$): * – по сравнению с контролем; # – по сравнению с 3-ми сутками; • – по сравнению с 7-ми сутками; Δ – межгрупповое сравнение одного и того же срока

FIG. 3.

Bcl-2/Bad expression area ratio at different time periods of the experiment ($p < 0.05$): * – compared to the control; # – compared to day 3; • – compared to day 7; Δ – an intergroup comparison of the same period

На 14-е сутки эксперимента у крыс, получавших ФР после ЭГ, площадь экспрессии Bcl-2 в клетках жёл-

тых тел яичников уменьшалась, причём значительнее, чем для Bad (рис. 2). В результате соотношение площадей Bcl-2/Bad снижалось практически в 2 раза по сравнению с контролем (рис. 3). Это свидетельствует об активации «митохондриальной ветви» программируемой клеточной гибели лютеоцитов на данном этапе восстановительного периода. Введение МТ животным, подвергшихся гипертермии, способствовало снижению интенсивности окрашивания (рис. 4) и более выраженному уменьшению Bad по сравнению со снижением Bcl-2, что приводило к восстановлению индекса Bcl-2/Bad до контрольного уровня (рис. 2, 3). Полученные результаты свидетельствуют о цитопротективном эффекте введения МТ животным после гипертермии, который уже на 14-е сутки восстановительного периода обеспечивает развитие митохондриального пути апоптоза лютеоцитов в рамках физиологической нормы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Тепловой стресс является известным стимулятором образования активных форм кислорода (АФК), которые могут поставить под угрозу беременность и развитие плода. Перегревание/термический стресс оказы-

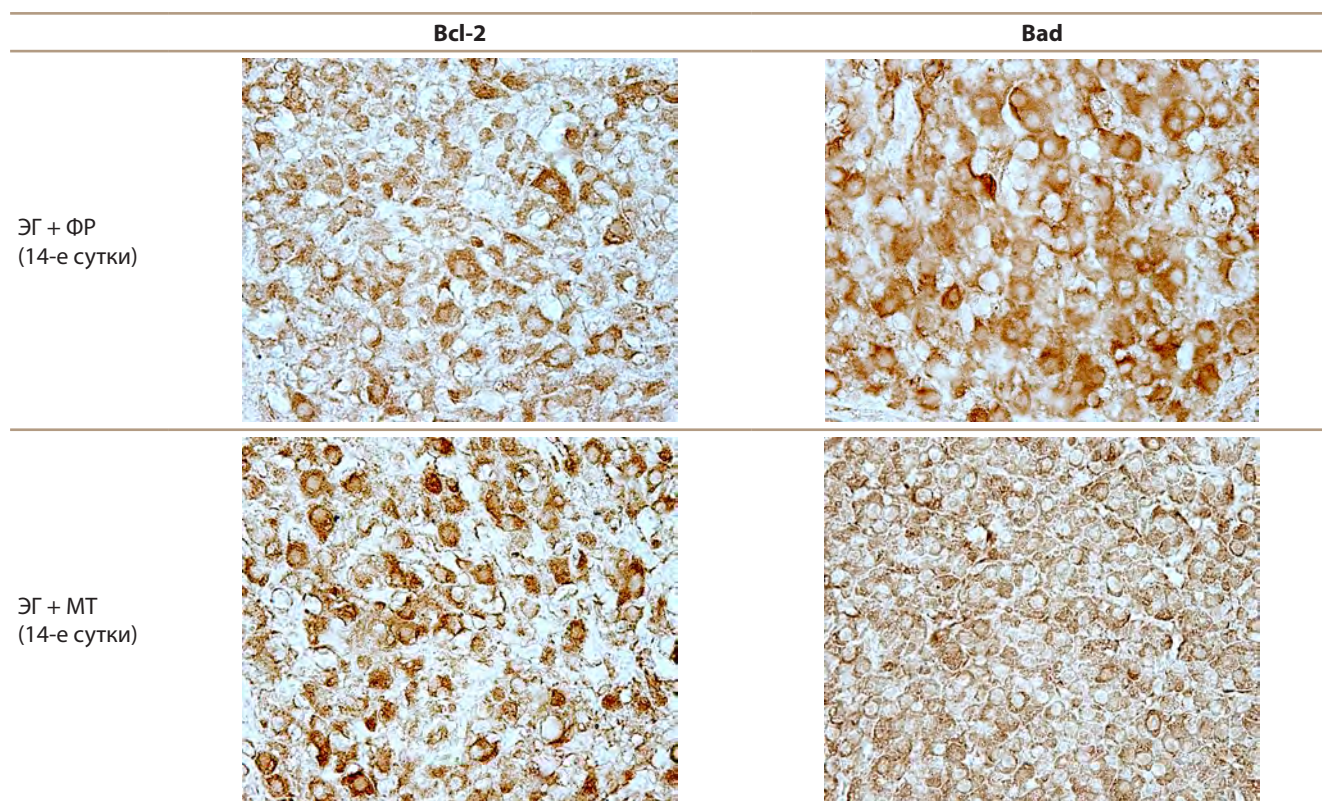


РИС. 4.

Микрофотографии жёлтых тел яичников крыс на 14-е сутки после воздействий ЭГ + ФР и ЭГ + МТ. Иммуногистохимическая окраска непрямым стрептавидин-биотиновым методом на Bcl-2 и Bad в лютеоцитах яичников; увеличение $\times 400$

FIG. 4.

Microphotographs of rat ovarian corpus luteum on day 14 after exposure to experimental hyperthermia (ЭГ) + physiological solution (ФР) injection or after exposure to experimental hyperthermia (ЭГ) + melatonin (MT) injection. Immunohistochemical staining by indirect streptavidin-biotin method for Bcl-2 and Bad in ovarian luteocytes; magnification $\times 400$

вает пагубное влияние на потенциал развития ооцитов у свиней, мышей, крупного рогатого скота, включая неблагоприятное воздействие на выживаемость, скорость созревания и мейотическую компетентность ооцитов, образование в них F-актина и α -тубулина, экспрессию генов *NRF2*, *CDK1* и *GDF9* [17].

МТ представляет собой плейотропную молекулу, которая регулирует различные процессы, включая беременность. Применение МТ в условиях теплового стресса у свиней улучшает качество и скорость созревания ооцитов (частично за счёт восстановления распределения F-актина) [17], оказывает положительное влияние на продолжительность эстрального периода и выживаемость эмбрионов [18]. Использование МТ снижает выработку АФК в созревающих ооцитах крупного рогатого скота и повышает способность к развитию эмбрионов из ооцитов, подвергшихся тепловому шоку [17]. Введение МТ на протяжении всей беременности у овец, находившихся в условиях термического стресса, улучшает их окислительно-восстановительный статус и приводит к увеличению среднего количества потомства, массы ягнят, а также к росту производства молока [19]. Обнаружено, что при тепловом стрессе этот гормон подавляет экспрессию p53 и повышает уровень лютеинизирующего гормона и экспрессию гена *Bcl-2* в клетках гранулезы овец [20].

Наши исследования показали, что действие высокой внешней температуры приводило к изменению соотношения белков регуляторов апоптоза (преобладание проапоптотического белка Bad над антиапоптотическим белком Bcl-2) в жёлтых телах яичников через 2 недели после ЭГ. Важно, что площадь экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 уменьшалась значительнее, чем площадь экспрессии проапоптотического белка Bad, что приводило к снижению индекса соотношения Bcl-2/Bad в 2 раза по сравнению с контролем. Это свидетельствовало о недостаточности антиапоптотической защиты и об активации «митохондриальной ветви» апоптоза лютеоцитов. Воздействие гипертермии способствует возникновению состояния окислительного стресса. Повреждающие эффекты таких воздействий приводят к митохондриальной дисфункции и избыточному накоплению в них АФК, что способствует развитию апоптоза клеток в различных компартментах яичника. Соответственно, благодаря своим антиоксидантным и антиапоптотическим эффектам МТ может значительно снижать окислительный стресс и сдерживать апоптоз [20–22]. При этом соотношение активных форм проапоптотических (Bax, Bad) и антиапоптотических (Bcl-2, Bcl-xL) белков будет определять выбор между реализацией программы выживания и гибели клетки [3]. Так, Bcl-2 может предотвращать транслокацию индукторов апоптоза Bax и Bad за счёт олигомеризации с этими белками и тем самым блокировать высвобождение этих молекул из митохондрий, что в свою очередь будет сдерживать апоптоз. Установлено, что Bcl-2 с Bad связывается сильнее, чем с Bax [2].

Показано, что МТ значительно ингибирует апоптоз текальных клеток у овец, снижая экспрессию проапоп-

тотического белка Bax и повышая экспрессию антиапоптотического протеина Bcl-2, что имеет значение для замедления атрезии яичников и старения [23]. Установлено, что МТ подавляет митохондриальный путь апоптоза гранулезных клеток в яичниках мышей, подвергавшихся химиотерапии циклофосфамидом, – снижает повышенные уровни экспрессии расщепленной каспазы 3, Bax, цитоплазматического Cyt-c и повышает сниженную экспрессию Bcl-2 в яичниках [24]. МТ может защищать яичники мышей от преждевременной недостаточности, вызванной гликозидами триптеригия, уменьшая апоптотическое повреждение – гормон снижает экспрессию каспазы 3, Bax и увеличивает экспрессию Bcl-2 [25].

В результате настоящего исследования мы установили, что введение МТ крысам после гипертермии сдвигает соотношение площадей экспрессии Bcl-2/Bad в жёлтых телах яичников в сторону увеличения антиапоптотического Bcl-2 уже на 7-е сутки восстановительного периода, в отличие от животных, не получавших лечения этим гормоном, что способствует нормализации Bcl-2/Bad до физиологического уровня (уже на 14-е сутки). В более раннем исследовании нами также было выявлено, что МТ может ингибировать митохондриальный путь апоптоза в фолликулах яичников крыс уже на 7-й день постгипертермии [5].

МТ, уменьшая окислительный стресс и апоптотическое повреждение, защищает клетки жёлтых тел в яичниках. Гормон восстанавливает пониженное в результате токсических воздействий количество жёлтых тел и численную плотность фолликулов у мышей и крыс [25, 26], улучшает уровни лютеинизирующего гормона, лютеиновую функцию и выживаемость эмбрионов овец и коз [19]. МТ защищает жёлтое тело от АФК и играет ключевую роль в поддержании его функции у женщин [19]. Лечение этим гормоном бесплодных женщин с дефектом лютеиновой фазы увеличивает внутрифолликулярную концентрацию МТ, уменьшает внутрифолликулярное окислительное повреждение, улучшает выработку прогестерона жёлтым телом и повышает уровень оплодотворения и беременности [27].

МТ и его рецептор MT1 играют важную роль в лютеинизации. Установлено, что передача сигналов мелатонин/MT1 заметно улучшает экспрессию маркерных генов жёлтого тела. Результаты высокопроизводительного секвенирования выявили, что взаимодействие с рецептором внеклеточного матрикса, фокальная адгезия и активация пути PI3K/Akt, которые участвуют в лютеинизации клеток гранулезы, могут опосредовать действие сигнала мелатонин/MT1 [28]. МТ увеличивает выработку прогестерона в жёлтом теле супоросных свиноматок, повышает экспрессию как P450_{scs}, так и StAR, что приводит к повышению жизнеспособности лютеиновых клеток. Эпифизарный гормон выполняет свою регулирующую роль в функционировании лютеоцитов через пути передачи сигналов, опосредованных мелатониновыми рецепторами MT1 и MT2, наличие которых подтверждено в клетках жёлтых тел [10, 12].

Механизмы передачи сигналов, опосредованных МТ, через рецепторы этого гормона очень сложны и ва-

рируются в зависимости от типа и вида клеток в яичнике. В основном они включают путь циклического аденозинмонофосфата/протеинкиназы А (сАМР/РКА), путь внеклеточной регулируемой сигналом киназы/активируемой митогеном протеинкиназы (ERK/MAPK), путь фосфатидилинозитол-3-киназы/регулируемой сигналом апоптоза киназы (PI3K/AKT) и кальций-регулируемый путь [23, 29]. В частности, МТ активирует путь PI3K/Akt, опосредуя синтез и секрецию прогестерона текальными клетками [30]. В дополнение к своим антиоксидантным свойствам МТ может активировать путь SIRT1/PGC-1 α , что способствует митохондриальному биогенезу, нарушенному в результате воздействия токсинов из окружающей среды [20].

Противодействие окислительному стрессу и перепрограммирование нарушенного метаболизма в клетках обеспечивается МТ, синтезируемым в митохондриях, где его распределение значительно выше, чем в других субклеточных органеллах, и не имеет циркадного ритма. Установлено, что МТ высвобождается из митохондрий и затем через МТ1-рецептор на мембране контролирует выброс цитохрома с, т. е. обеспечивает аутомитокринную регуляцию. МТ присутствует в митохондриальных мембранах и переходит в митохондрии с помощью олигопептидных транспортеров PEPT1 и PEPT2, расположенных на мембране. Высокие концентрации МТ и его множественное действие в качестве антиоксиданта обеспечивают мощную защиту этих органелл, подвергающихся воздействию свободных радикалов. Внутри митохондрий МТ действует как прямой поглотитель свободных радикалов и связанных с ними нерадикальных продуктов и стимулирует антиоксидантные ферменты, включая супероксиддисмутазу 2, каталазу и глутатионредуктазу, при этом подавляя прооксидантные ферменты. Регулируя активность липоксигеназы, МТ защищает клетки от гидропероксидации полиненасыщенных жирных кислот. Он модулирует реакции эндоплазматического ретикула на стресс, активность сиртуинов, процессы митофагии и аутофагии. МТ путём прямого захвата АФК в митохондриях, активации антиоксидантной защиты и сохранения целостности мембран играет решающую роль в поддержании нормальных функций митохондрий и энергетического обмена в клетках [9]. Таким образом, воздействие мелатонином в условиях гипертермии приводит к снижению апоптотической гибели клеток жёлтых тел и, как следствие, к уменьшению повреждающего действия перегрева на морфологическую организацию органа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введение МТ после ЭГ сдвигает соотношение площадей экспрессии Bcl-2/Bad в сторону увеличения антиапоптотического Bcl-2 уже на 7-е сутки восстановительного периода. Введение этого гормона после гипертермии способствует более ранней нормализации Bcl-2/Bad до физиологического уровня – уже на 14-е сутки после воздействия ЭГ и МТ.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Исследование поддержано бюджетным проектом Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (FWNR-2022-0009).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Бочкарева А.Л., Мичурина С.В., Коненков В.И., Бочкарев И.Г. Влияние мелатонина на фолликулярный аппарат и сосуды яичников крыс в условиях гипертермии. *Морфология*. 2015; 148(5): 71-76. [Bochkareva AL, Michurina SV, Konenkov VI, Bochkarev IG. The effect of melatonin on the follicular apparatus and vessels of the ovaries of rats in hyperthermia. *Morphology*. 2015; 148(5): 71-76. (In Russ.)].
2. Duan L, Dong S, Huang K, Cong Y, Luo S, Zhang JZH. Computational analysis of binding free energies, hotspots and the binding mechanism of Bcl-xL/Bcl-2 binding to Bad/Bax. *Phys Chem Chem Phys*. 2021; 23(3): 2025-2037. doi: 10.1039/d0cp04693k
3. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018; 25(3): 486-541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4
4. Reiter RJ, Sharma R, Pires de Campos Zuccari DA, de Almeida Chuffa LG, Manucha W, Rodriguez C. Melatonin synthesis in and uptake by mitochondria: Implications for diseased cells with dysfunctional mitochondria. *Future Med Chem*. 2021; 13(4): 335-339. doi: 10.4155/fmc-2020-0326
5. 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
6. Michurina SV, Ishchenko IY, Arkhipov SA, Letyagin AY, Korolev MA, Zavjalov EL. The expression of apoptosis-regulating proteins Bcl-2 and Bad in liver cells of C57Bl/6 mice under light-induced functional pinealectomy and after correction with melatonin. *Vavilovskii Zhurnal Genet Selektii*. 2021; 25(3): 310-317. doi: 10.18699/VJ21.034
7. Yang C, Liu Q, Chen Y, Wang X, Ran Z, Fang F, et al. Melatonin delays ovarian aging in mice by slowing down the exhaustion of ovarian reserve. *Commun Biol*. 2021; 4(1): 534. doi: 10.1038/s42003-021-02042-z
8. Russo M, Forte G, Montanino Oliva M, Laganà AS, Unfer V. Melatonin and myo-inositol: supporting reproduction from the oocyte to birth. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(16): 8433. doi: 10.3390/ijms22168433
9. Kvetnoy I, Ivanov D, Mironova E, Evsyukova I, Nasyrov R, Kvetnaia T, et al. Melatonin as the cornerstone of neuroimmunoenocrinology. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(3): 1835. doi: 10.3390/ijms23031835

10. Zhang W, Wang Z, Zhang L, Zhang Z, Chen J, Chen W, et al. Melatonin stimulates the secretion of progesterone along with the expression of cholesterol side-chain cleavage enzyme (P450scc) and steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in corpus luteum of pregnant sows. *Theriogenology*. 2018; 108: 297-305. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.12.026
11. Pedreros M, Ratto M, Guerra M. Expression of functional melatonin MT(1) receptors in equine luteal cells: In vitro effects of melatonin on progesterone secretion. *Reprod Fertil Dev*. 2011; 23(3): 417-423. doi: 10.1071/RD10137
12. Zhang ZL, Peng J, Yang ST, Chen JX, Wang CX, Tong DW. Expression of arylalkylamine n-acetyltransferase (AANAT) and acetylserotonin o-methyltransferase (ASMT) in the corpus luteum of pregnant sows and synthesis of melatonin in luteal cells. *Cell Tissue Res*. 2022; 388(1): 167-179. doi: 10.1007/s00441-021-03556-y
13. Fang L, Li Y, Wang S, Yu Y, Li Y, Guo Y, et al. Melatonin induces progesterone production in human granulosa-lutein cells through upregulation of StAR expression. *Aging (Albany NY)*. 2019; 11(20): 9013-9024. doi: 10.18632/aging.102367
14. Wang J, Zhu T, Ma X, Wang Y, Liu J, Li G, et al. Melatonergic systems of AANAT, melatonin, and its receptor MT2 in the corpus luteum are essential for reproductive success in mammals. *Biol Reprod*. 2021; 104(2): 430-444. doi: 10.1093/biolre/iaaa190
15. 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
16. 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 С1 Рос. Федерация; МПК G09B 23/28 (2000.01). № 99126978/13; заявл. 22.12.1999; опубл. 10.04.2001. Бюл. № 10. [Efremov AV, Pakhomova YuV, Pakhomov EA, Ibragimov RSh, Shorina GN. *Method of experimental modeling of general hyperthermia in small laboratory animals*: Patent No. 2165105 C1 of the Russian Federation. 2001; (10). (In Russ.)].
17. Yang L, Zhao Z, Cui M, Zhang L, Li Q. Melatonin restores the developmental competence of heat stressed porcine oocytes, and alters the expression of genes related to oocyte maturation. *Animals (Basel)*. 2021; 11(4): 1086. doi: 10.3390/ani11041086
18. Arend LS, Knox RV. Fertility responses of melatonin-treated gilts before and during the follicular and early luteal phases when there are different temperatures and lighting conditions in the housing area. *Anim Reprod Sci*. 2021; 230: 106769. doi: 10.1016/j.anireprosci.2021.106769
19. Bouroutzika E, Kouretas D, Papadopoulos S, Veskoukis AS, Theodosiadou E, Makri S, et al. Effects of melatonin administration to pregnant ewes under heat-stress conditions, in redox status and reproductive outcome. *Antioxidants (Basel)*. 2020; 9(3): 266. doi: 10.3390/antiox9030266
20. Chen Y, Shan X, Jiang H, Guo Z. Exogenous melatonin directly and indirectly influences sheep oocytes. *Front Vet Sci*. 2022; 9: 903195. doi: 10.3389/fvets.2022.903195
21. Данилова М.В., Усольцева Е.Н. Значение гормона мелатонина эпифиза в поддержании здоровья женщин репродуктивного возраста (обзор). *Акушерство, гинекология и репродукция*. 2019; 13(4): 337-344. [Danilova MV, Usoltseva EN. Significance of the pineal gland hormone melatonin in maintaining the health of women of reproductive age (a review). *Obstetrics, Gynecology and Reproduction*. 2019; 13(4): 337-344. (In Russ.)]. doi: 10.17749/2313-7347.2019.13.4.337-344
22. Xing CH, Wang Y, Liu JC, Pan ZN, Zhang HL, Sun SC, et al. Melatonin reverses mitochondria dysfunction and oxidative stress-induced apoptosis of Sudan I-exposed mouse oocytes. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2021; 225: 112783. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112783
23. Ma J, Wang J, Hu S, Li Y, Zhang Y, Yang Y, et al. Effects of melatonin on development and hormone secretion of sheep theca cells *in vitro*. *Theriogenology*. 2023; 198: 172-182. doi: 10.1016/j.theriogenology.2022.12.036
24. Feng J, Ma WW, Li HX, Pei XY, Deng SL, Jia H, et al. Melatonin prevents cyclophosphamide-induced primordial follicle loss by inhibiting ovarian granulosa cell apoptosis and maintaining AMH expression. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13: 895095. doi: 10.3389/fendo.2022.895095
25. Ma M, Chen XY, Li B, Li XT. Melatonin protects premature ovarian insufficiency induced by tripterygium glycosides: Role of SIRT1. *Am J Transl Res*. 2017; 9(4): 1580-1602.
26. Goktepe O, Balcioglu E, Baran M, Cengiz O, Ceyhan A, Suna PA, et al. Protective effects of melatonin on female rat ovary treated with nonylphenol. *Biotech Histochem*. 2023; 98(1): 13-19. doi: 10.1080/10520295.2022.2075566
27. Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee L, et al. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. *Endocr J*. 2013; 60(1): 1-13. doi: 10.1507/endocr.ej12-0263
28. He C, Ma T, Shi J, Zhang Z, Wang J, Zhu K, et al. Melatonin and its receptor MT1 are involved in the downstream reaction to luteinizing hormone and participate in the regulation of luteinization in different species. *J Pineal Res*. 2016; 61(3): 279-290. doi: 10.1111/jpi.12345
29. Wang X, Meng K, He Y, Wang H, Zhang Y, Quan F. Melatonin stimulates STAR expression and progesterone production via activation of the PI3K/AKT pathway in bovine theca cells. *Int J Biol Sci*. 2019; 15(2): 404-415. doi: 10.7150/ijbs.27912

Сведения об авторах

Мичурина Светлана Викторовна – профессор, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник, заведующая группой 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>

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

Ищенко Ирина Юрьевна – 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, <https://orcid.org/0000-0001-6281-0402>

Архипов Сергей Алексеевич – 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 the 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 – Member of RAS, Advisor of RAS, Honored Scientist of the Russian Federation, Chief Research Officer, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems; Professor at the Department of the State Policy, Lomonosov Moscow State University, e-mail: sikolesnikov2012@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2124-6328>

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

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