



DOI: 10.22363/2312-797X-2023-18-2-273-281  
EDN TTSRET  
УДК 57:619:591.2

Научная статья / Research article

## Молекулярно-биологический маркер Bcl-2: анализ семенников при пренатальном введении эстрогенов белым лабораторным мышам

Р.Т. Сулайманова<sup>1</sup>  , А.Н. Квочко<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Университет «РЕАВИЗ», г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>2</sup> Ставропольский государственный аграрный университет,  
г. Ставрополь, Российская Федерация

 rimma2006@bk.ru

**Аннотация.** В практической ветеринарной деятельности, а также в научных разработках при дифференциальной диагностике заболеваний животных опухолевой и не опухолевой природы используют один из современных методов диагностики заболеваний — иммуногистохимическое исследование. Пренатальное влияние эстрогенов впоследствии приводит к нарушению репродуктивной системы во взрослом организме, которое сопровождается параллельным ростом помолодевших случаев рака стероидозависимых органов потомства: семенников, яичников. Цель исследования — иммуногистохимический анализ маркера Bcl-2 при пренатальном воздействии различных доз синтетического аналога эстрогена синэстрола на семенники потомства белых беспородных лабораторных мышей. После фертилизации беременных самок разделили на 3 группы — одна интактная и две экспериментальные группы. Интактная группа — без воздействия ( $n = 10$ ). Первой экспериментальной группе С-25 ( $n = 13$ ) вводили эстрогеновый препарат синэстрол в виде 2 % масляного раствора в дозе 25 мкг/кг. Второй экспериментальной группе ( $n = 13$ ) вводили эстрогеновый препарат синэстрол в виде 2 % масляного раствора в дозе 40 мкг/кг. По достижению половозрелого возраста потомство выводили из эксперимента. Иммуногистохимический анализ проводили на срезах с парафиновых блоков семенников потомства, предназначенных для стандартного морфологического исследования, определяли маркер ингибитора апоптоза Bcl-2, на показателях клеточных элементов мужских половых желез потомства: сперматогонии, сперматоциты, сперматиды, сперматозоиды, клетки Лейдига. Экспрессия маркера Bcl-2 при воздействии синтетического препарата синэстрола в дозах 25 и 40 мкг/кг показала, что количество позитивно окрашенных клеток в сперматогониях увеличилось на 8,6 и 9,4 % соответственно по сравнению с интактной группой. При сравнительном анализе интактной группы с экспериментальными группами С-25 и С-40 экспрессия маркера Bcl-2 в клетках сперматоцитов и сперматозоидах различий не показала, наблюдалось незначительное увеличение позитивно-окрашенных клеток в сперматидях. Показатель экспрессии маркера Bcl-2 в экспериментальных группах С-25 и С-40 уменьшился в клетках Лейдига на 56,0 ( $P < 0,05$ ) и 60,0 % ( $P < 0,05$ ) соответственно. Введение синтетического аналога эстрогена синэстрола в период закладки

© Сулайманова Р.Т., Квочко А.Н., 2023



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

половых желез плода приводит к нарушению морфологии в семенниках во взрослом периоде. Показатель экспрессии маркера Bcl-2 в экспериментальных группах С-25 и С-40 уменьшился в клетках Лейдига, что приводит к апоптотической гибели клеток, отвечающих за выработку мужского полового гормона тестостерона. Полученные результаты могут быть использованы при выборе оптимальных доз введения синтетического аналога эстрогена синэстрола в пренатальный период.

**Ключевые слова:** маркер ингибитор апоптоза, синэстрола, потомство, гонады, пренатальное воздействие

**Заявление о конфликте интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**История статьи:** поступила в редакцию 5 февраля 2023 г., принята к публикации 9 марта 2023 г.


**Для цитирования:** Сулайманова Р.Т., Квочко А.Н. Молекулярно-биологический маркер BCL-2: анализ семенников при пренатальном введении эстрогенов белым лабораторным мышам // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2023. Т. 18. № 2. С. 273—281. doi: 10.22363/2312-797X-2023-18-2-273-281

## Molecular biological marker BCL-2: testis analysis in prenatal injection of estrogen to white laboratory mice

Rimma T. Sulaimanova<sup>1</sup>  , Andrey N. Kvochko<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Reaviz University, Saint-Petersburg, Russian Federation

<sup>2</sup>Stavropol State Agrarian University, Stavropol, Russian Federation

 rimma2006@bk.ru

**Abstract.** Immunohistochemical study is one of the modern methods of disease diagnostics used in practical veterinary practice, as well as in scientific developments in differential diagnostics of animal diseases of tumour and non-tumour nature. Prenatal influence of estrogens results in reproductive system disorders in an adult organism which is accompanied by parallel growth of steroid dependent cancers of the offspring; testicles and ovaries. The aim of the study was to perform immunohistochemical analysis of Bcl-2 marker during prenatal exposure to different doses of the synthetic estrogen analogue Sinestrol in the testes of the offspring of white non-pedigreed laboratory mice. After fertilization, the pregnant females were divided into 3 groups, one intact and two experimental groups. The intact group was unaffected (n = 10). The first experimental group, C-25 (n = 13), was injected with the estrogen drug Sinestrol in the form of a 2 % oil solution at a dose of 25 µg/kg. The second experimental group (n = 13) was given the estrogen preparation Sinestrol in the form of 2 % oil solution in a dose of 40 mkg/kg. When the offspring reached sexual maturity, they were removed from the experiment. Immunohistochemical analysis was carried out on sections from paraffin blocks of testes of progeny intended for standard morphological study, the marker of apoptosis inhibitor Bcl-2 was determined on indices of cellular elements of male glands of progeny: spermatogonia, spermatocytes, sperm-tides, spermatozoa and Leydig cells. Expression of Bcl-2 marker upon exposure to the synthetic drug Sinestrol at doses of 25 and 40 µg/kg showed that the number of positively stained cells in spermatogonia increased by 8.6 and 9.4 % respectively compared to the intact group. When the intact group was compared with experimental groups C-25 and C-40, the expression of Bcl-2 marker in spermatocyte cells and spermatozoa showed no difference, a slight increase in positively stained cells in spermatids was observed. Bcl-2 marker expression rate in experimental groups C 25 and C-40 decreased in Leydig cells by 56.0 (P < 0.05) and 60.0 % (P < 0.05), respectively. Administration of the synthetic estrogen analogue Sinestrol during fetal gland initiation resulted in impaired morphology in the testes in adulthood. The expression index of Bcl-2 marker in experimental groups C-25 and C-40 decreased in Leydig cells, resulting in apoptotic cell death, which is responsible for production of male sex hormone testosterone. The results can be used to select optimal doses of the synthetic estrogen analogue Sinestrol in the prenatal period.

**Keywords:** marker apoptosis inhibitor, Sinestrol, progeny, gonads, prenatal exposure

**Conflicts of interest.** The authors declared no conflicts of interest.

**Article history:** Received: 5 February 2023. Accepted: 9 March 2023.

**For citation:** Sulaimanova RT, Kvochko AN. Molecular biological marker Bcl-2: testis analysis in prenatal injection of estrogen to white laboratory mice. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*. 2023;18(2):273—281. doi: 10.22363/2312-797X-2023-18-2-273-281

## Введение

В ветеринарной медицине в качестве одного из современных методов диагностики заболеваний животных применяется иммуногистохимическое исследование. Метод используется как в лечебной практике, так и в научных разработках при дифференциальной диагностике заболеваний опухолевой и неопухолевой природы [1].

Центральное место в изучении регуляции процесса апоптоза занимают молекулярные белки семейства Bcl-2, которые отражают синтетические процессы, протекающие в клетках и тканях органов человека и животных. Белки Bcl-2 находятся в постоянном динамическом равновесии, являются фактором выживания клеток органов, защищая ее от запрограммированной гибели. В научных источниках считается, что соотношение активных форм белков Bcl-2 определяет равновесие между жизнью и смертью клетки [2–4].

Определение белков семейства Bcl-2 в клетках и тканях органов выполняют ИГХ-методом, основанным на детекции уровня белка в клетке и позволяющем выявить экспрессию Bcl-2 [5].

Уменьшение концентрации Bcl-2 приводит к апоптотической гибели клеток, тогда как сверхэкспрессия его защищает клетки от смерти. В свою очередь в структурах ядер органов ген Bcl-2 выполняет функцию негативного регулятора апоптоза [6].

Пренатальное влияние эстрогенов на ранних стадиях антенального развития, в особенности периода закладки репродуктивных органов приводит к нарушению разнообразных морфологических изменений в органах, проявляющихся в постнатальной жизни у разных видов животных, особенно при проведении искусственного осеменения [7–9].

Создание модели с экспериментальными животными — важный аспект клинических исследований, так как от качества исследуемой модели зависит обоснованность фундаментальных выводов, механизмов развития заболеваний, результатов доклинических испытаний используемых медикаментозных препаратов [10, 11].

Пренатальное экспериментальное исследование влияния и изучения последствий применения препаратов с эстрогенной активностью является актуальной и малоизученной научной проблемой.

**Цель исследования** — иммуногистохимический анализ маркера Bcl-2 при пренатальном воздействии различных доз синтетического аналога эстрогена синэстрола на семенники потомства белых беспородных лабораторных мышей.

## Материалы и методы исследования

Эксперимент выполнен на самках ( $n = 36$ ) и самцах ( $n = 9$ ) белых лабораторных мышей массой 19...21 г. Экспериментальные животные содержались в стандартных условиях при круглосуточном доступе к воде и пище. Все эксперименты, уход и содержание осуществлялись в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. После фертилизации беременных самок разделили на 3 группы — одна интактная и две экспериментальные группы. Принимая во внимание физиологическую экспрессию гормонов мышей каждой самке в отдельности на стадии гестации E 11.5 беременности в одно и тоже время суток, однократно, внутримышечно вводили различные дозы исследуемых препаратов. Интактная группа — без воздействия ( $n = 10$ ). Первой экспериментальной группе C-25 ( $n = 13$ ) вводили эстрогеновый препарат синестрол в виде 2 % масляного раствора в дозе 25 мкг/кг. Второй экспериментальной группе C-40 ( $n = 13$ ) вводили эстрогеновый препарат синестрол в виде 2 % масляного раствора в дозе 40 мкг/кг. Расчеты эффективности доз препаратов проводили в соответствии с коэффициентом для перерасчета доз веществ в мкг/кг для мышей<sup>1</sup> [12, 13]. Введение лекарственных средств в эксперименте проводили по Методическим рекомендациям изучения общетоксического действия фармакологических веществ<sup>2</sup>. По пять экспериментальных животных, рожденных от самок каждой группы, оставляли с матерью до одного месяца, после чего полученное потомство ( $n = 15$ ) — отдельно самцов и самок — отсаживали в клетки. По достижению половозрелого возраста потомство выводили из эксперимента в фазу диэструса. Определяли эстральный цикл, используя влагалищные мазки, окрашенные по критериям М.С. Сора [14].

Иммуногистохимический анализ проводили на семенниках потомства белых лабораторных мышей, фиксацию и гистологическую проводку осуществляли по стандартной схеме. Подсчет структур семенников потомства производили под иммерсионным объективом на стандартных полях зрения 90<sup>3</sup>.

Иммуногистохимическим методом определяли маркер ингибитора апоптоза Bcl-2. Анализ проводили на срезах с парафиновых блоков семенников потомства, предназначенных для стандартного морфологического исследования. Парафиновые срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике, используя непрямую стрептавидин-биотиную систему детекции Leica BOND (Novocastra™, Германия) для мыши (Mouse Monoclonal Antibody Bcl-2 Oncoprotein. Клон N-19, разведение: 1:300) по рекомендации производителя Santa Cruz Biotechnology (США). Гистологические срезы толщиной 4 мкм окрашивали с помощью иммуногистостейнера Leica Microsystems Bond™ (Германия). В 10 полях зрения при увеличении  $\times 100$  проводилась оценка окрашенных препаратов каждого образца

<sup>1</sup> Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина, 2005. С. 49–51

<sup>2</sup> Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ / Е.В. Арзамасцев, Т.А. Гуськова, И.В. Березовская; под ред. Р.У. Хабриева. М.: Медицина, 2005. С. 41–54.

<sup>3</sup> Гистологическая техника / В.В. Семченко, С.А. Барашкова, В.И. Ноздрин, В.Н. Артемьев. Омск: Омская областная типография, 2006. 290 с.

с использованием светового микроскопа Leica. Среднее число положительных к антигенам клеток вычисляли соотношением с клетками, в которых эти антигены не определялись (на 100 просчитанных клеток).

Экспрессию маркера Bcl-2 оценивали в семенниках потомства: сперматогониях, сперматоцитах, сперматидах, сперматозоидах, клетках Лейдига.

Статистическую обработку осуществляли с использованием программы Statistica 7.0 (StatSoft, США). По каждому параметру вычисляли среднее арифметическое значение и его стандартную ошибку ( $M \pm SD$ ). Достоверность изменений оценивали с помощью метода Краскела — Уолиса, различия определяли при достигнутом уровне значимости  $P < 0,05$ .

## Результаты исследования и обсуждение

Результаты экспрессии маркера Bcl-2 семенников потомства лабораторных мышей при пренатальном введении синтетического препарата синэстрол приведены в таблице и на рис. 1–3.

### Количество Bcl-2 иммунопозитивных клеток в семенниках потомства белых беспородных лабораторных мышей при пренатальном введении синтетического препарата синэстрол

Показатели	Интактная	C-25	C-40
Клетки сперматогониев в эпителии извитого семенного канальца	25,4 ± 1,8	27,6 ± 1,7	27,8 ± 1,5
Клетки сперматоцитов в эпителии извитого семенного канальца	29,2 ± 1,3	29,6 ± 2,1	29,4 ± 1,1
Клетки сперматид в эпителии извитого семенного канальца	24,8 ± 0,8	25,8 ± 0,8	26,0 ± 1,1
Клетки сперматозоидов в просвете извитого семенного канальца	119,4 ± 0,5	117,8 ± 0,9	116,9 ± 1,9
Клетки Лейдига в соединительнотканной строме между извитыми семенными канальцами	5,0 ± 0,7	2,2 ± 0,8*	2,0 ± 0,7*

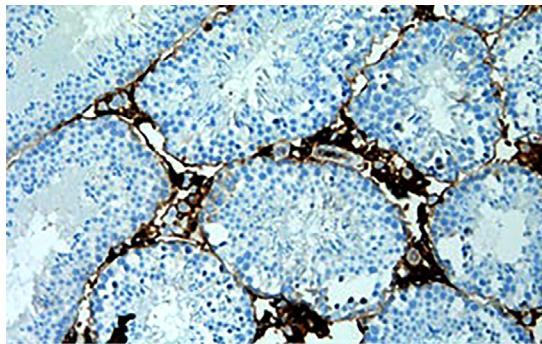
Примечание. \*  $P < 0,05$  в сравнении с интактной группой.

### Number of Bcl-2 immunopositive cells in testes of outbred laboratory mice offspring after prenatal injection of Sinestrol synthetic drug

Indicators	Control	C-25	C-40
Spermatogonian cells in epithelium of convoluted seminiferous tubule	25.4 ± 1.8	27.6 ± 1.7	27.8 ± 1.5
Spermatocyte cells in epithelium of convoluted seminiferous tubule	29.2 ± 1.3	29.6 ± 2.1	29.4 ± 1.1
Spermatid cells in epithelium of convoluted seminiferous tubule	24.8 ± 0.8	25.8 ± 0.8	26.0 ± 1.1
Sperm cells in lumen of convoluted seminiferous tubule	119.4 ± 0.5	117.8 ± 0.9	116.9 ± 1.9
Leydig cells in connective tissue stroma between convoluted seminiferous tubules	5.0 ± 0.7	2.2 ± 0.8*	2.0 ± 0.7*

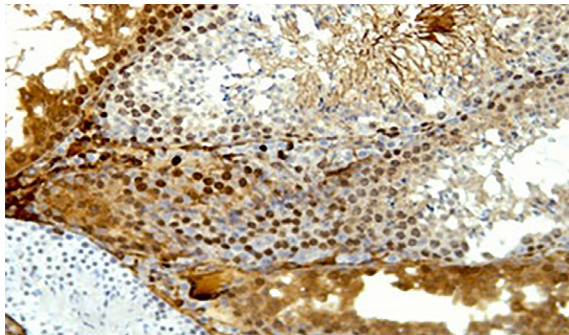
Note: \* $P < 0.05$  in comparison with the control group.

Показатель экспрессии маркера Bcl-2 в группах С-25 и С-40 увеличился в клетках сперматогониев в эпителии извитого семенного канальца на 8,6 и 9,4 % по сравнению с интактной группой, что согласуется с результатами зарубежных авторов [3, 5, 15]. В экспериментальных группах С-25 и С-40 в клетках сперматоцитов в эпителии извитого семенного канальца уровень экспрессии значимых различий не выявил. В клетках сперматидов в обеих экспериментальных группах произошло незначительно увеличение количества позитивно окрашенных клеток экспрессии маркера Bcl-2. В экспериментальных группах С-25 и С-40 в клетках сперматидов значимых различий в показателях экспрессии маркера Bcl-2 не было выявлено. Сравнительный анализ с интактной группой показал, что в экспериментальных группах С-25 и С-40 произошло статистически значимое уменьшение степени экспрессии маркера Bcl-2 количества позитивно окрашенных клеток Лейдига в слоях соединительной ткани между извитыми семенными канальцами на 56,0 ( $P < 0,05$ ) и 60,0 % ( $P < 0,05$ ) соответственно.



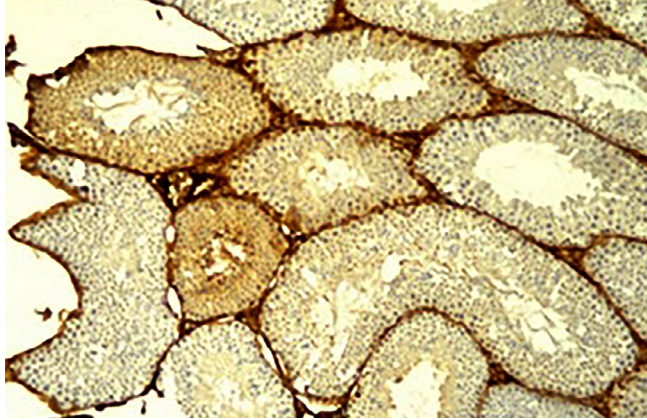
**Рис. 1.** Семенник потомства интактной группы. ИГХ-реакция на маркер Bcl-2. Докраска ядер гематоксилином.  $\times 100$   
*Источник:* выполнено авторами

**Fig. 1.** Testis of the intact group offspring. IHC reaction to Bcl-2 marker. Nucleus staining with hematoxylin.  $\times 100$   
*Source:* made by the authors



**Рис. 2.** Семенник потомства экспериментальной группы С-25 мкг/кг. ИГХ-реакция на маркер Bcl-2. Докраска ядер гематоксилином.  $\times 100$   
*Источник:* выполнено авторами

**Fig. 2.** Testis of the experimental group offspring (C-25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). IHC reaction to Bcl-2 marker. Nucleus staining with hematoxylin.  $\times 100$   
*Source:* made by the authors



**Рис. 3.** Семенник потомства экспериментальной группы С-40 мкг/кг. ИГХ-реакция на маркер Bcl-2. Докраска ядер гематоксилином.  $\times 100$   
*Источник: выполнено авторами*

**Fig. 3.** Testis of the experimental group offspring (С-40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). IHC reaction to Bcl-2 marker. Nucleus staining with hematoxylin.  $\times 100$   
*Source: made by the authors*

Таким образом, экспрессия маркера Bcl-2 при воздействии синтетического препарата синэстрола в дозах 25 и 40 мкг/кг показала, что количество позитивно окрашенных клеток в сперматогониях увеличилось на 8,6 и 9,4 % соответственно, по сравнению с интактной группой. При сравнительном анализе интактной группы с экспериментальными группами С-25 и С-40 экспрессия маркера Bcl-2 в клетках сперматоцитов и сперматозоидах различий не показала, наблюдалось незначительное увеличение позитивно-окрашенных клеток в сперматидях. Показатель экспрессии маркера Bcl-2 в экспериментальных группах С-25 и С-40 уменьшился в клетках Лейдига на 56,0 ( $P < 0,05$ ) и 60,0 % ( $P < 0,05$ ) соответственно.

### Заключение

Можно предполагать, что введение синтетического аналога эстрогена синэстрола в период закладки половых желез плода приводит к нарушению морфологии в семенниках во взрослом периоде. Показатель экспрессии маркера Bcl-2 в экспериментальных группах С-25 и С-40 уменьшился в клетках Лейдига, что вызвало апоптотическую гибель клеток, отвечающих за выработку мужского полового гормона тестостерона. Полученные результаты могут быть использованы при выборе оптимальных доз введения синтетического аналога эстрогена синэстрола в пренатальный период.

### Библиографический список

1. Даренская А.Д., Доброва Н.В., Степанова Е.В. Молекулярно-биологический маркер Bcl-2 при колоректальном раке: характеристика, роль в механизмах регуляции апоптоза, влияние на прогноз (обзор литературы) // Современная онкология. 2019. Т. 21. № 1. С. 52–58. doi: 10.26442/18151434.2019.1.190278

2. Фролов М.А., Слепова О.С., Ловпаче Дж.Н., Морозова Н.С. Маркёры апоптоза и методы изучения апоптотической гибели клеток // Сборник научных статей XI Международного конгресса «Глаукома: теории, тенденции, технологии». М., 2013. С. 265–270.
3. Huang X., Wu D.Y., Chen G., Manji H., Chen D.F. Support of retinal ganglion cell survival and axon regeneration by lithium through a Bcl-2-dependent mechanism // *Eur. J. Ophthalmol.* 2001. Jul-Sep.11 Suppl 2. P. 12–22. doi: 10.1167/iops.02–0198
4. Mooney S.M., Miller M.W. Expression of Bcl-2, Bax and caspase-3 in the brain of the developing rat // *Dev. Brain Res.* 2000. Vol. 123. P. 103–117. doi: 10.1016/s0165–3806(00)00081-x
5. Leahy D.T., Mulcahy H.E., O'Donoghue D.P., Parfrey N.A. Bcl-2 protein expression is associated with better prognosis in colorectal cancer // *Histopathology.* 1999. № 35 (4). P. 360–367. doi: 10.1046/j.1365–2559.1999.00743.x
6. Cory S., Adams J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch // *Nat Rev Cancer.* 2002. № 2. P. 647–656. doi: 10.1038/nrc883
7. Delbès G., Levacher C., Habert R. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction.* 2006. № 132(4). P. 527–538. doi: 10.1530/rep.1.01231
8. Stewart M.K., Mattiske D.M., Pask A.J. Exogenous Oestrogen Impacts Cell Fate Decision in the Developing Gonads: A Potential Cause of Declining Human Reproductive Health // *Int J Mol Sci.* 2020. № 21(21). P. 8377. doi: 10.3390/ijms21218377
9. El-Shahat A.E., Gabr A., Meki A.R. et al. Altered testicular morphology and oxidative stress induced by cadmium in experimental rats and protective effect of simultaneous green tea extract // *International Journal of Morphology.* 2009. № 27(3). P. 757–764. doi: 10.4067/S0717–95022009000300020
10. Ткачев А.В., Ткачева О.Л., Коровин Ю.И., Вертипрахов В.Г. Молекулярно-генетические методики в практической физиологии, ветеринарии и животноводстве: монография. М.: РГАУ — МСХА им. К.А. Тимирязева, 2022. 317 с.
11. Ткачев А.В., Евсюкова А.А., Фрундина А.Д. Эффективность модификации технологии криоконсервирования спермы жеребцов для замораживания эякулятов хряков // Инновационные решения в аграрной науке — взгляд в будущее: материалы XXIII междунар. научно-производ. конф., Майский, 28–29 мая 2019 г. Т. 2. Майский: Белгородский государственный аграрный университет имени В.Я. Горина, 2019. С. 61–62.
12. Гуськова Т.А. Доклиническое токсикологическое изучение лекарственных средств как гарантия безопасности проведения их клинических исследований // *Токсикологический вестник.* 2010. № 5 (104). С. 2–6.
13. Сулайманова Р.Т., Хайруллин Р.М., Имаева А.К., Гниятуллина Г.А., Свирская М.В. Способ моделирования проканцерогенного действия синестрола на яичники потомства женского пола у лабораторных мышей. Патент на изобретение № RU 2676437 от 09.01.2018.
14. Cora M.C., 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 // *Toxicologic Pathology.* 2015. № 43(6). С. 776–793. doi: 10.1177/019262315570339
15. Потапов С.Н., Горголь Н.И., Андреев А.В. Морфологические особенности клеток Лейдига плодов и новорожденных от матерей с преэклампсией // *Медицина сегодня и завтра.* 2011. Т. 4. № 53. С. 23–26.

## References

1. Darenskaya AD, Dobrova NV, Stepanova EV. Molecular-biological marker Bcl-2 in colorectal cancer: the characteristics, the role of mechanisms regulating apoptosis, the effect on the prognosis (review of literature). *Journal of Modern Oncology.* 2019;21(1):52–58. (In Russ.) doi: 10.26442/18151434.2019.1.190278
2. Frolov MA, Slepova OS, Lovpache DN, Morozova NS. Markers of apoptosis and methods for studying apoptotic cell death. *Glaucoma: theories, trends, technologies: conference proceedings.* Moscow; 2013. p.265–270. (In Russ.).
3. Huang X, Wu DY, Chen G, Manji H, Chen DF. Support of retinal ganglion cell survival and axon regeneration by lithium through a Bcl-2-dependent mechanism. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2003;44:347–354. doi: 10.1167/iops.02–0198
4. Mooney SM, Miller MW. Expression of Bcl-2, Bax and caspase-3 in the brain of the developing rat. *Dev. Brain Res.* 2000;123(2):103–117. doi: 10.1016/s0165–3806(00)00081-x
5. Leahy DT, Mulcahy HE, O'Donoghue DP, Parfrey NA. Bcl-2 protein expression is associated with better prognosis in colorectal cancer. *Histopathology.* 1999;35(4):360–367. doi: 10.1046/j.1365–2559.1999.00743.x



6. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(9):647–656. doi: 10.1038/nrc883
7. Delbès G, Levacher C, Habert R. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction*. 2006;132(4):527–538. doi: 10.1530/rep.1.01231
8. Stewart MK, Mattiske DM, Pask AJ. Exogenous Oestrogen Impacts Cell Fate Decision in the Developing Gonads: A Potential Cause of Declining Human Reproductive Health. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):8377. doi: 10.3390/ijms21218377
9. El-Shahat AE, Gabr A, Meki AR, Mehana E. Altered testicular morphology and oxidative stress induced by cadmium in experimental rats and protective effect of simultaneous green tea extract. *International Journal of Morphology*. 2009;27(3):757–764. doi: 10.4067/S0717–95022009000300020
10. Tkachev AV, Tkacheva OL, Korovin YI, Vertiprakhov VG. *Molecular genetic methods in practical physiology, veterinary medicine and animal husbandry*. Moscow: Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy publ.; 2022. (In Russ.).
11. Tkachev AV, Evsyukova AA, Frundina AD. Efficiency of modification of stallion semen cryopreservation technology for freezing boar ejaculates. In: *Innovative solutions in agricultural science — a look into the future: conference proceedings*. Maiky: Belgorod State Agrarian University named after V.Y. Gorin publ.; 2019. p.61–62. (In Russ.).
12. Guskova TA. Preclinical toxicological study of pharmaceuticals as a pledge of clinical studies safety. *Toxicological Review*. 2010;5(104):2–5. (In Russ.).
13. Sulaymanova RT, Khayrullin RM, Imaeva AK, Gniyatullina GA, Svirskaya MV. *Sposob modelirovaniya prokantserogennogo deystviya sinestrola na yaichniki potomstva zhen-skogo pola u laboratornykh myshei* [A method for modeling the pro-cancerogenic effect of synestrol on ovaries of female offspring in laboratory mice]. Patent RUS, no. 2676437, 2018. (In Russ.).
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. *Toxicologic Pathology*. 2015;43(6):776–793. doi: 10.1177/0192623315570339
15. Potapov SN, Gorgol NI, Andreev AV. Morphological features of Leydig’s cells in fetuses and newborns from mothers with pre-eclampsia. *Medicine Today and Tomorrow*. 2011;(4):23–26. (In Russ.).

#### Об авторах:

Сулайманова Римма Тагировна — кандидат биологических наук, доцент, заведующая кафедрой медико-биологических дисциплин, Университет «Ревиз», Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Калинина, д. 8; e-mail: rimma2006@bk.ru

ORCID: 0000–0002–1658–9054

Квочко Андрей Николаевич — доктор биологических наук, профессор, профессор РАН, заведующий кафедрой физиологии, хирургии и акушерства, Ставропольский государственный аграрный университет, Российская Федерация, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, д. 12; e-mail: kvochko@yandex.ru

ORCID: 0000–0003–4445–7638

#### About authors:

Sulaymanova Rimma Tagirovna — Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Medical and Biological Disciplines, Reaviz University, 8/2 Kalinina st., Saint Petersburg, 198095, Russian Federation; e-mail: rimma2006@bk.ru

ORCID: 0000–0002–1658–9054

Kvochko Andrey Nikolaevich — Doctor of Biological Sciences, Professor, Professor of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Physiology, Surgery and Obstetrics, Stavropol State Agrarian University, 12 Zootekhnicheskoy lane, Stavropol, 355017, Russian Federation; e-mail: kvochko@yandex.ru

ORCID: 0000–0003–4445–7638