

© Бессалова Е.Ю.

УДК 591:147.8

## **ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И СТРУКТУРНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА ЯИЧНИКОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

*Е.Ю.Бессалова*

*Кафедра нормальной анатомии человека (зав. – проф. В.С.Пикалюк) Крымского государственного  
медицинского университета им. С.И.Георгиевского, г. Симферополь*

---

**Резюме.** У статті описані особливості планування морфологічних експериментів, які ставлять за мету вивчити репродуктивні показники самок, наведена низка класичних та оригінальних методів дослідження морфофункціонального стану яєчників, а також оригінальна класифікація фолікулів яєчників великих ссавців.

**Ключові слова:** яєчник, естральний цикл, методи дослідження, морфологія, експериментальні тварини.

---

В настоящее время значительное количество научных исследований посвящено изучению морфофункционального состояния яичников, являющихся центральным звеном женской репродуктивной системы. Существует множество направлений в этой области научного познания: морфология яичников в норме, сравнительная, экологическая, экспериментальная морфология, патоморфология яичников [1-3]. Большое значение имеет методология проведения исследований. Наибольшую научную и практическую ценность представляют работы, в которых учтены особенности физиологии репродукции и использован комплексный подход, включающий физиологические и морфологические методики.

**Постановка морфологического эксперимента при изучении репродуктивной функции.** Необходимым условием формирования структурной группы является создание стандартных условий содержания животных [4, 5]. С целью исключения побочных факторов, влияющих на морфофункциональное состояние половой системы, при проведении эксперимента важно соблюдать следующие условия: 1. Все исследования проводить в весенне-летний период (март-сентябрь) с учетом годовых циклов поло-

вых функций млекопитающих (Л.В.Алексеева, 1977). 2. Фотопериод свет-темнота 12-12 часов является оптимальным в опытах на крысах, при условии отсутствия в виварии окон [2, 5]. 3. Учитывая циркадные биоритмы регуляции и функционирования женской репродуктивной системы и связанные с ними колебания интенсивности обменных процессов, все манипуляции проводить в одно и то же время суток. Вагинальные мазки брать в фиксированное время суток (например, 12 часов дня) [6]. 4. При статистической обработке данных органометрии не учитывать яичники, взятые от животных в период течки, поскольку их масса и объем в этот период значительно больше (за счет наличия множества крупных фолликулов). 5. При изучении показателей фертильности самок в период течки подсаживать к самцу, а не наоборот, мазок брать утром, при наличии сперматозоидов в мазке следующий день можно считать первым днем беременности. Во время беременности, длящейся в норме 21 сутки, мазки брать не следует, во избежание развития патологии.

**Выбор экспериментальных животных.** Оптимальными экспериментальными животными являются линейные крысы и мыши как полиэстричные животные с длительностью эст-

рального цикла 4-5 дней и спонтанным типом овуляции (Л.В.Алексеева, 1977). За счет высокой однородности инбредных животных количество крыс и мышей может быть минимальным, что является оптимальным с позиций биоэтики, при сохранении высокой достоверности результатов исследований [5, 7]. Мы также проводили эксперименты на домашних свиньях крупной белой породы, что позволяет использовать широкий спектр макроскопических и макрометрических методов исследования. Домашние и лабораторные свиньи тоже являются полиэстричными животными, способными к оплодотворению в течение всего года, половой цикл длится 18-25 дней, тип овуляции – спонтанный, однако контакт с самцом является сильным фактором, отражающимся на овуляции и ее сроках. Важно и то, что при постановке опыта на сельскохозяйственных животных результаты исследований можно использовать и в животноводстве. При изучении разных видов экспериментальных животных возможно выявить видовые особенности предмета исследования, что представляет биологический интерес.

**Возрастная периодизация экспериментальных животных.** При изучении репродукции белых крыс важно правильно формировать группы и серии экспериментальных животных с учетом онтогенетического подхода. Основные этапы развития репродуктивного статуса белых крыс следующие: 1-е сутки жизни – период новорожденности, в яичниках происходит первое мейотическое деление овоцитов и формирование примордиальных фолликулов; 30-е сутки – завершается вскармливание молоком, оканчивается ювенильный период и начинается ранний этап полового созревания, в яичниках впервые появляются полостные фолликулы; 60-е сутки – период полового созревания, интенсивного роста; 90-е сутки – неустойчивый половой статус в период ранней половозрелости, появляется первая течка (овуляция); 180-е сутки – расцвет репродуктивной функции; 360-е сутки – период зрелости, предшествующий старческому увяданию; более 400 суток – угасание половой функции [1, 5].

При использовании нескольких видов экспериментальных животных важно подобрать соответствующие возрастные группы. Так, например, в онтогенезе домашних свиней 1-14-е сутки – период новорожденности и молочного

вскармливания; 2 месяца – начало полового созревания, в яичниках впервые появляются полостные фолликулы; 6 месяцев – период интенсивного роста и полового созревания, характерно появление первой течки и полового поведения; 10 месяцев – животные допускаются к спариванию (размножению) в соответствии с зоотехническими нормативами; 14 месяцев – период расцвета репродуктивной функции, стабильная зрелость (Б.П.Хватов, 1955). Известно [8], что первые сутки относятся к перинатальному периоду, когда интенсивно протекают процессы половой дифференциации нейроэндокринной системы, в частности, гипоталамуса, включая также структуры других гуморальных уровней, играющих роль в регуляции фолликулогенеза и лютеогенеза. По мере взросления организма нейроэндокринная система животных приобретает большую устойчивость, что связано с формированием прямых и обратных гуморальных связей между различными уровнями регуляции, созреванием регуляторных центров. Таким образом, наиболее сильное влияние на репродуктивную систему оказывают факторы, действующие на ранних возрастных этапах и в критические периоды развития.

**Половые циклы млекопитающих животных.** Как известно, существуют циклирующие (полиэстричные) животные, к которым относятся мышевидные грызуны, домашние свиньи, приматы, а также человек, и нециклирующие (моноэстричные) животные, которых большинство. Половой цикл – это совокупность изменений в органах половой системы самок, составляющих один законченный период (Л.В.Алексеева, 1977). В связи с этим выделяют овариальный цикл и цикл половых путей, тесно связанные между собой. Цикл делится на 4 стадии: 1) предтечка (prooestrus), 2) течка (oestrus), 3) послетечка (metaoestrus), 4) стадия покоя – интервал между циклами (dioestrus). На наш взгляд, наиболее удобно первой стадией цикла считать именно предтечку, а не течку, несмотря на то, что общепринято считать длительность цикла от течки до течки, а эструс первой стадией полового цикла. При взятии мазка важно приучить животных к рукам экспериментатора. Эта процедура безболезненна и крысы, как правило, очень быстро привыкают к этой манипуляции, использование средств фиксации излишне. Крысу усаживают на крышку клетки,

она цепляется передними лапами, приподнимают заднюю часть туловища. Вагинальный мазок берут ватной палочкой, смоченной в воде и слегка отжатой, наносят на чистое сухое предметное стекло, фиксацию мазка можно не делать. Лучше смотреть и фотографировать окрашенные мазки, однако и без окраски клетки вагинальной слизи в вагинальном мазке хорошо различимы. Окрашивают мазки сразу, для этого подходят очень многие красители, в том числе и гематоксилин-эозин. Наиболее удобными являются быстро красящие вещества – крезил-виолет, фаст-грин, при этом достаточно обмакнуть стекло в краситель на 2-3 секунды и промыть в воде. Изучать необходимо свежие препараты во избежание появления артефактов, но при анализе препаратов, изготовленных ранее (за 30-60 суток до повторного просмотра), мы не находили явных отличий и повторно установленные стадии цикла совпадали с записями в журналах. Покровным стеклом препараты можно не накрывать, необходимо лишь беречь их от пыли. У мышевидных грызунов стадия цикла четко диагностируется на основании микроскопического исследования вагинального мазка: проэструс (фолликулиновая фаза, стадия роста фолликулов) – базальные клетки с ядрами; эструс (овуляция) – комочки многочисленных чешуек, видимых даже невооруженным глазом; метэструс (фаза активности желтого тела) – присутствуют клетки, содержащие ядра, и чешуйки, и лейкоциты; в стадию диэструс (период покоя) лейкоциты покрывают все поле зрения; у неполовозрелых крыс в мазке густая слизь и лейкоциты. Но у крупных животных влагалищный мазок не всегда несет достоверную информацию о стадии эстрального цикла. Например, у свињи, вследствие анатомических особенностей полового аппарата, учет соотношения лейкоцитов и эпителиальных клеток в мазке не является удовлетворительным для точной диагностики стадий полового цикла. Только взятие большого количества слизи и последующая ее обработка (центрифугирование, размешивание остатка и приготовление мазка) при учете процентного содержания отдельных клеточных элементов дают более точную характеристику секрета (Б.П.Хватов, 1955). Однако признаки течки у крупных животных четко выражены и позволяют выделить животное на основании осмотра наружных половых органов и поведения ("охо-

та"). Видимо, в связи с тем, что течка у млекопитающих является наиболее ярким признаком наличия цикла, было общепринято считать течку первым периодом эстрального цикла.

**Критерии и методы исследования репродукции млекопитающих.** При обработке материала оптимально использовать следующие методы:

1. *Физиологические методы:* прижизненный контроль и наблюдение за динамикой массы тела [9], половым циклом и поведением животных, определение сроков открытия влагалища (в норме – на 50-60-е сутки жизни) и появления первой течки у крыс, взятие вагинальных мазков, оценка способности к спариванию, определение продолжительности беременности, численности потомства и динамики его массы; определение средней продолжительности эстрального цикла путем вычисления среднего промежутка между фазами проэструса за определенный период времени (у грызунов оптимально не менее чем за 30 дней).

Коэффициент каждой стадии эстрального цикла определяют по формуле:  $K = a/b \times 100\%$ , где  $K$  – коэффициент стадии цикла,  $a$  – количество дней, приходящихся на данную стадию цикла за период наблюдения,  $b$  – общая длительность исследования в днях (у крыс и мышей желательно не менее 30). Определяют коэффициенты проэструса ( $п$ ), эструса ( $э$ ), метэструса ( $м$ ) и диэструса ( $д$ ), обозначая их –  $K_п$ ,  $K_э$ ,  $K_м$ ,  $K_д$ .

По нашим наблюдениям [10], цикл у лабораторных крыс, как правило, длится 4-5 дней (хотя в литературе встречаются данные о том, что средняя продолжительность цикла составляет 6-7 дней [5]). На каждую стадию цикла, при взятии мазков в полдень, в среднем приходится 1 сутки, при этом у молодых животных (90 суток) часто встречается укороченный проэструс, когда в мазке наряду с клетками базального слоя эпителия влагалища присутствуют многочисленные чешуйки (можно обозначать  $п/э=1/2п+1/2э$  и определять  $K_{п/э}$ ), что часто сочетается с удлиненным диэструсом (2 и более суток).

2. *Морфологические методы.* А. *Макроскопические методы:* 1) *макроскопическое описание яичников;* 2) *морфометрические и количественные методы исследования* [11]: измерение абсолютной массы яичников; вычисление относительной массы яичников (коэффициента мас-

сы) по формуле:  $M_{\text{отн}} = M_{\text{абс}}/M_{\text{жив}} \times 100\%$ , где  $M_{\text{отн}}$  – относительная масса яичника,  $M_{\text{абс}}$  – абсолютная масса яичника,  $M_{\text{жив}}$  – масса животного; вычисление индекса воздействия экспериментальных условий (лекарственных препаратов, условий окружающей среды и т.п.) по формуле:  $I = \sum Mo / \sum Mk \times 100\%$ , где  $I$  – индекс (при положительном значении индекс стимуляции, отрицательном – угнетения,  $\sum Mo$  – сумма масс правого и левого яичников подопытных животных,  $\sum Mk$  – сумма масс правого и левого яичников интактных животных; 3) органомерметрические исследования (определение длины, ширины и толщины яичника, диаметра желтых тел, крупных полостных фолликулов), вычисление объема яичников по формуле:  $V = \pi ABC/6$ , где  $V$  – объем яичника,  $A$  – длина яичника,  $B$  – ширина яичника,  $C$  – толщина яичника; вычисление удельного веса по формуле:  $R_{\text{уд}} = M_{\text{абс}}/V$ , где  $R_{\text{уд}}$  – удельный вес яичника,  $M_{\text{абс}}$  – абсолютная масса яичника,  $V$  – объем яичника; подсчет абсолютного числа полостных фолликулов и желтых тел в яичниках крупных животных на серийных срезах толщиной 1 мм; анализ соотношения строма-паренхимы, изучение состояния сосудистого русла и развития сосудистой сети методом точечного счета или методом сопоставления площадей [12].

Б. *Микроскопические методы с использованием световой микроскопии* (Г.А. Меркулов, 1969): 1) гистоморфологические методы: обзорные методы окраски гематоксилином и эозином, по способу ван Гизон; окраска коллагеновых волокон по способам Маллори, Гейденгайна, Массона. При этом заливать препараты удобнее в целлоидин по общепринятой методике, но морфометрические показатели парафиновых и целлоидиновых срезов значительно отличаются, поскольку при заливке в целлоидин ткани не уменьшаются в объеме. В связи с этим допустимо сравнивать морфометрические показатели, полученные только при одинаковых способах заливки.

2) *гистохимические методы*: определение активности оксидоредуктаз в тканях яичников (СДГ – по Нахласу, ЛДГ – по Пирсу, Гессу, Скарпелли); выявление общих липидов суданом В и нейтральных липидов суданом III, IV. На липиды окрашиваются гормонпродуцирующие структуры яичников (желтое тело, атретическое тело, внутренняя тека, называемая также

текальной железой, интерстициальная гормонпродуцирующая ткань), клетки которых содержат липидные включения, содержащие преимущественно холестерин, являющийся предшественником овариальных гормонов.

3) *гистоморфометрические количественные методы* [11, 12]: определение активности ферментов и интенсивности окраски продуктов гистохимической реакции количественным методом; дифференциальный подсчет фолликулов по стадиям развития на каждом пятом срезе яичника, сделанном во фронтальной плоскости, анализ динамики желтых тел (количество, степень развития), анализ атретического процесса; измерение линейных размеров компонентов яичников (толщину оболочек фолликулов и овоцитов, диаметр фолликулов, овоцитов, ядер овоцитов); определение площадей различных структур гонад (площадь фолликулов, площадь, занимаемая зернистой оболочкой, площадь овоцитов и их ядер). Для этого удобно использовать современные морфометрические комплексы при увеличении микроскопа x100, x400, x1000 с программным обеспечением. Используют фронтальные срезы яичников, окрашенные обзорными методами. Параметры снимают только с фолликулов, содержащих на данном срезе овоцит с ядром. Измеряют морфометрические параметры не менее чем 10 фолликулов каждой популяции в каждой серии эксперимента.

В. *Электронно-микроскопические методы*. Ультроструктурное изучение овоцитов, фолликулярных клеток, паренхиматозных и стромальных элементов яичников.

**Классификации фолликулов.** Существуют две основные классификации фолликулов: международная классификация и классификация по Т. Pedersen, Н. Peters (1968), рекомендованная для изучения яичников мышевидных грызунов. Международная классификация является удобной, но несколько упрощенной для научных исследований, а классификация Pedersen, Peters слишком сложна и не адаптирована для яичников крупных животных. В то же время, обе классификации мало согласуются между собой. На основании систематизации Pedersen, Peters нами применительно к яичникам крупных животных разработана новая классификация [13], удобная и адаптированная для морфометрических исследований и изучения фолликулогенеза (таблица).

Таблица

## Классификация и морфологические критерии зрелости фолликулов

Международная гистологическая номенклатура	Классификация Pedersen, Peters для изучения фолликулогенеза в яичниках мышевидных грызунов			Оригинальная классификация, адаптированная для изучения фолликулогенеза в яичниках свиней		
Типы (классы) фолликулов	типы (классы) фолликулов	количество фолликулярных клеток (ФК)		типы (классы) фолликулов	количество фолликулярных клеток	
Овогонии	малые	1	овогонии, ФК нет	малые	1	до 10
Примордиальные		2	овоцит, 1-3			
		3а	4 - 20			
Первичные	средние	3б	21 – 60	средние	3а	21 – 60
		4	61 – 100		3б	61 – 100
		5а	101 – 200		4а	101 – 200
Вторичные (полостные)	крупные	5б	201 – 400	крупные	4б	201 – 400
		6	401 – 600		5	401 – 600
		7	более 600		6	более 600
Зрелые третичные		8	преовуляторный фолликул		7	преовуляторный фолликул

Разработанная нами классификация имеет следующие особенности: 1. Овогонии, фактически не являющиеся фолликулами (отсутствуют фолликулярные клетки), не включены в классификацию. Овогонии присутствуют в яичниках в перинатальном возрасте, а начиная со 2-3 суток жизни, у большинства животных не обнаруживаются, поэтому, на наш взгляд, выделение овогоний как класса фолликулов в яичниках не новорожденных животных нецелесообразно. 2. Каждой из четырех групп фолликулов по международной классификации соответствует 2 класса фолликулов по оригинальной классификации, за исключением зрелых – это 7 класс. При этом, первичные фолликулы подразделены на четыре подкласса: 3а, 3б, 4а, 4б. Это обусловлено тем, что это первичные фолликулы, то есть большая разнородная популяция (от 20 до 400 фолликулярных клеток), значительно варьирующая по морфометрическим показателям. Такое разделение на подклассы появилось естественным образом: при морфометрических исследованиях фолликулов внутри подклассов показатели относительно однородны. 3. При подсчете количества фолликулярных клеток в

одном слое на максимальном срезе фолликула отмечена интересная особенность. По классификации Pedersen, Peters, полость в фолликулах грызунов появляется при числе фолликулярных клеток 400. Несмотря на то, что фолликулоциты и овоциты свиней имеют иные размеры, чем у крыс, полость формируется при том же числе фолликулярных клеток. Тем самым нами создана классификация для морфометрических исследований и изучения фолликулогенеза у представителей различных таксонов млекопитающих.

Таким образом, методологический подход, подразумевающий физиологическое исследование, предшествующее изучению строения гонад, обогащает морфологическую работу, показывая конечный результат реализации репродуктивной функции у экспериментальных животных, что делает морфологические работы более полными. Знание биологии репродукции и особенностей физиологии экспериментальных животных позволяет выбрать оптимальный индивидуальный способ постановки эксперимента и получить достоверные результаты.

## Литература

1. Волкова О.В., Боровая Т.Г. Морфогенетические основы развития и функции яичников. – М., 1999. – 253 с.
2. Никитин А.И. Вредные факторы среды и репродуктивная система человека. – СПб.: ЭЛБИ-СПб., 2005. – 216 с.
3. Королев В.А., Прохорова Н.С. Характер эволюционных преобразований репродуктивной функции человека // Тавр. медико-биол. вест. – 2002. – Т. 5, № 3. – С. 51-53.
4. Кожемякин Ю.М., Хромов О.С., Філоненко М.А., Сайфетдінова Г.А. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. – К.: Авіценна, 2002. – 156 с.
5. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. – 3-е изд., пер. и доп. – К.: Вища школа, 1983. – 383 с.
6. Комаров Ф.И., Рапопорт С.И. Хронобиология и хрономедицина. – М.: Триада-Х, 2000. – 488 с.
7. Добровольский Г.А. Планирование медико-морфологического эксперимента. – Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 1984. – 128 с.
8. Резников А.Г., Пишак В.П., Носенко Н.Д. и др. Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология. – Черновцы: Медакадемія, 2004. – 351 с.
9. Маркин Л.Б., Яковлева Э.Б. Аменорея на фоне потери массы тела (патогенез, клиника, диагностика, лечение, диагностика, отдаленные последствия). – Львов: Стрім, 2005. – 240 с.
10. Бессалова Е.Ю., Королев В.А. Показатели фертильности самок белых крыс при парентеральном введении ксеногенной спинномозговой жидкости // Світ медицини та біології. – 2006. – № 1. – С. 5-10.
11. Волкова О.В., Боровая Т.Г. Методы количественного анализа в оценке морфофункционального состояния яичника // Арх. анат. – 1990. – Т. 99, № 11. – С. 81-84.
12. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: Рук. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
13. Бессалова Е.Ю. Оригинальная классификация фолликулов, адаптированная для экспериментального изучения яичников крупных млекопитающих // Тр. Крым. гос. мед. ун-та им. С.И.Георгиевского "Пробл., достиж. и перспек. развития медико-биол. наук и прак. здравоохранения. – Т. 142, Ч. I. – Симферополь, 2006. – С. 4-5.

### ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И СТРУКТУРНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА ЯИЧНИКОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

*Е.Ю.Бессалова*

**Резюме.** В статье описаны особенности планирования морфологических экспериментов, ставящих задачу изучения репродуктивных показателей самок, представлен ряд классических и оригинальных методов исследования морфофункционального состояния яичников млекопитающих, приведена оригинальная классификация фолликулов яичников крупных млекопитающих.

**Ключевые слова:** яичник, эстральный цикл, методы исследования, морфология, экспериментальные животные.

### PHYSIOLOGIC AND STRUCTURAL METHODS OF EVALUATING THE MORPHOFUNCTIONAL STATUS OF THE OVARIES OF MAMMALS

*Ye. Yu. Bessalova*

**Abstract.** The paper describes the specific characteristics of planning morphological experiments, setting the task of studying the reproductive indices of females, presents a number of classical and original methods of investigating the morphofunctional status of the ovaries of mammals and an original classification of ovarian follicles of large animals.

**Key words:** ovary, estrous cycle, investigation methods, morphology, experimental animal.

Crimean State Medical University named after S.I.Georgiyevsky (Simferopol)

Надійшла в редакцію 21.06.2006 р.