

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТОМСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)

Институт биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства
Кафедра зоологии позвоночных и экологии

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК

Руководитель ООП

доктор биол. наук

_____ Д. С. Воробьёв

« ____ » _____ 2020 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА БАКАЛАВРА

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НАДПОЧЕЧНИКОВ
И ЯИЧНИКОВ КРЫС В ПОЗДНЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ ПОД
ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА
СУКЦИНАТА

по основной образовательной программе подготовки бакалавров
направление подготовки
06.03.01 – БИОЛОГИЯ

Степаненко Ольга Андреевна

Руководитель ВКР

канд. биол. наук, доцент

_____ В. В. Ярцев

« ____ » _____ 2020 г.

Автор работы

студентка группы № 01602

_____ О. А. Степаненко

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)
Биологический институт
Кафедра зоологии позвоночных и экологии

УТВЕРЖДАЮ

И. о. зав. кафедрой зоологии
позвоночных и экологии

_____ В.В. Ярцев

«_____» _____ 2020 г.

ЗАДАНИЕ

По подготовке ВКР бакалавра

Студентке Степаненко Ольге Андреевне группы 01602

1. Тема ВКР: Гистологическая характеристика надпочечников и яичников крыс в позднем онтогенезе под воздействием этилметилгидроксипиридина сукцината

2. Срок сдачи студентом выполненной ВКР:

а) на кафедре – 26 мая 2020 г.

б) в ГЭК – 22 июня 2020 г.

3. Исходные данные к работе: целью работы является изучение гистологических особенностей надпочечников и яичников крыс линии «Wistar» поздних этапов онтогенеза при использовании этилметилгидроксипиридина сукцината

Задачи: 1) Провести сравнительную оценку морфологических параметров надпочечников крыс поздних этапов онтогенеза при использовании фармакологической терапии и без воздействия; 2) Оценить состояние адренокортикоцитов надпочечников животных на поздних этапах онтогенеза при использовании фармакологической терапии и без воздействия; 3) Сопоставить полученные гистологические данные с уровнем кортикостерона в плазме крови животных на поздних этапах онтогенеза при использовании фармакологической терапии и без воздействия; 4) Оценить состояние яичников крыс поздних этапов онтогенеза при использовании фармакологической терапии и без воздействия путём сравнения соотношения овариальных фолликулов.

Объектом исследования являются надпочечник и яичник крысы линии «Wistar».

4. Краткое содержание работы: введение, литературный обзор, материалы и методы, гистологическая характеристика надпочечников крыс в позднем онтогенезе под воздействием этилметилгидроксипиридина сукцината, гистологическая характеристика яичников крыс в позднем онтогенезе под воздействием этилметилгидроксипиридина сукцината, выводы, список используемой литературы, приложения.

5. Указать предприятие, организацию по заданию которого выполняется работа: Национальный исследовательский Томский государственный университет.

6. Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей): 19 рисунков, 8 таблиц.

7. Дата выдачи задания «29» октября 2019 г.

Руководитель ВКР

канд. биол. наук, доцент

_____ В. В. Ярцев

Задание принял к исполнению «___» _____ 2019 г.

_____ О. А. Степаненко

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа 60 с., 8 таб., 19 рис., 6 прил., 59 источников.

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НАДПОЧЕЧНИКОВ И ЯИЧНИКОВ КРЫС В ПОЗДНЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА СУКЦИНАТА

Объект исследования – надпочечник и яичник крысы линии «Wistar», предмет исследования – их морфологическая особенность при использовании этилметилгидроксипиридина сукцината.

Цель: изучить гистологические особенности надпочечников и яичников крыс линии «Wistar» поздних этапов онтогенеза при использовании этилметилгидроксипиридина сукцината.

В процессе работы исследована морфологическая особенность надпочечников и яичников крыс линии «Wistar» поздних этапов онтогенеза при использовании этилметилгидроксипиридина сукцината.

Выявлено, что уменьшение паренхиматозной массы коркового вещества надпочечников крыс, находившихся под воздействием этилметилгидроксипиридина сукцината по сравнению с интактными, связано с преобразованием сетчатой и преимущественно пучковой зоны. Вероятно, такие изменения пучковой зоны связаны с меньшими объёмами цитоплазмы и ядра клеток этой зоны.

В опытной группе, получавшей фармакологическую терапию, отмечается меньшая концентрация кортикостерона в плазме и гипотрофией адренкортикоцитов зоны. Всё это в целом указывает на снижение активности адренкортикоцитов, направленной на секрецию данного гормона.

Анализ количественного соотношения фолликулов разной степени зрелости выявил значимые отличия между экспериментальными группами, выраженными в увеличении числа первичных однослойных, первичных многослойных и вторичных многослойных фолликулов у опытной группы.

Выявить определенный путь действия этилметилгидроксипиридина сукцината достаточно проблематично. Это связано с неспецифичностью и, в большей мере, множественностью действий препарата. Но, исходя из полученных данных морфологии надпочечника и яичника, можно утверждать, что этилметилгидроксипиридина сукцинат продемонстрировал противострессорные свойства на уровне адренкортикоцитов пучковой зоны надпочечников, на содержании гормона кортикостерона в сыворотке крови крыс, на количественном соотношении растущих фолликулов, какие являются характеристикой овариального или репродуктивного резерва.

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ВВЕДЕНИЕ | 6 |
| 1. Литературный обзор | 9 |
| 1.1. Периодизация онтогенеза серой крысы (<i>Rattus norvegicus</i>) | 9 |
| 1.2. Возрастные изменения крыс линии «Wistar» | 10 |
| 1.3. Свойства этилметилгидроксипиридина сукцината (препарат «Мексидол»). | 14 |
| 1.4. Строение, функции и возрастные изменения надпочечников крыс | 15 |
| 1.5. Строение, функции и возрастные изменения яичников крыс | 19 |
| 2. Материалы и методы исследования | 29 |
| 2.1. Характеристика тест-объекта | 29 |
| 2.2. Схема эксперимента | 29 |
| 2.3. Гистологический анализ органов исследования | 30 |
| 2.4. Определение содержания кортикостерона в сыворотке крови | 33 |
| 2.5. Статистическая обработка данных | 34 |
| 2.6. Авторский вклад | 35 |
| 3. Результаты и их обсуждение | 36 |
| 3.1. Гистологическая характеристика надпочечников крыс в позднем онтогенезе под воздействием этилметилгидроксипиридина сукцината | 36 |
| 3.2. Гистологическая характеристика яичников крыс в позднем онтогенезе под воздействием этилметилгидроксипиридина сукцината | 43 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 48 |
| ВЫВОДЫ | 49 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ | 50 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ А | 55 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ Б | 56 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ В | 57 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ Г | 58 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ Д | 59 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ Е | 60 |

ВВЕДЕНИЕ

Продолжительность жизни, активное долголетие являются важнейшими показателями состояния здоровья и, сопровождающих онтогенез, возрастных изменений всех живых организмов. Причины, определяющие продолжительность жизни, весьма разнообразны, и могут быть вызваны внешними и внутренними факторами. К первой группе относится ряд воздействия на организм из внешней среды, которые приводят к возрастным изменениям. Например, продукты питания, образ жизни, социальное окружение и т.д. Вторую группу составляют причины, связанные с наследственностью индивида, его генов, контролирующих программу индивидуального развития. К ним можно отнести затухание синтеза, ослабление регуляции генов, отравление продуктами метаболизма, мутации и другие (Мартынов, 2003). Согласно современным представлениям под возрастными изменениями или старением понимают происходящее с возрастом замедление, угнетение и утрату физиологических функций организма, которое сопровождается повышенной частотой онкологических и дегенеративных заболеваний (Анисимов, 2008).

Внутренние органы и мягкие ткани как возможные объекты для определения возрастной изменчивости длительное время критически оценивались многими исследователями. Однако широкое внедрение микрометрических (количественных) методик в исследования морфологии позволило определить значимые признаки структурных компонентов внутренних органов, выраженные в цифровом эквиваленте, которые объективно отображают изменения, происходящие с увеличением количества прожитых лет (Алексеев, 2016).

Особый интерес представляет исследование надпочечников и анализ их адаптивных изменений при старении организма, поскольку их адекватное функционирование обеспечивает целостное взаимодействие ряда систем и определяет приспособительные возможности организма в условиях возрастной изменчивости и повреждения структурных компонентов ткани (Колдышева, 2008). Не менее важна и половая система организма, а конкретнее ее центральное звено – гонады. Проблема преждевременного истощения овариального резерва, а также возможность возобновления запаса герминогенных клеток в постнатальном периоде является актуальной в настоящее время в связи с тем, что многие женщины откладывают рождение ребенка на поздний репродуктивный период и сталкиваются с ситуацией невозможности зачатия (Зенкина, 2014). Есть основания думать, что работа вышеперечисленных желез обусловлена межэндокринными

отношениями гипоталамо-гипофизарно-гонадной (ГГГС) и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой систем (ГГНС) (Басенко, 1999).

К настоящему времени накоплен достаточный материал по изменению морфологических и функциональных характеристик надпочечников при старении организма. Исследователи акцентируют свое внимание на выяснении тонких механизмов, приводящих к развитию возрастных изменений, а также их коррекции, поскольку именно надпочечники участвуют в приспособительных возможностях организма и метаболизм углеводов и белков (Юссеф, 2007). В противоположность надпочечникам возрастная морфологическая инволюция женских половых органов среди прочих других исследована в меньшей степени. В ряде работ рассматриваются процессы старения женских половых органов с позиций функциональных изменений под влиянием гормонов, но анализ количественных морфологических характеристик женской половой системы при возрастных изменениях отсутствует (Алексеев, 2016).

Изучение данных процессов важно для понимания механизмов старения, а также его коррекции, особенно в связи с увеличением частоты встречаемости болезней пожилого возраста у более молодых лиц, а также, мировой демографической ситуацией. Для коррекции возрастных изменений существуют разные методы. Например, такие как фармакологическая, клеточная терапии, генная, озонотерапия, фитотерапия и другие. Медицинское применение препарата «этилметилгидроксипиридина сукцинат» было разрешено с 1996 г. в качестве антиоксидантного средства для лечения острых нарушений мозгового кровообращения, дисциркуляторной энцефалопатии, сосудистой дистонии, атеросклеротических нарушений функций мозга, невротических и неврозоподобных расстройств с проявлением тревоги у пациента, а также острой интоксикации нейролептиками (Воронина, 2016). Такие патологии, зачастую, выявляются в позднем онтогенезе, и их коррекция уже возможна с помощью фармакологических препаратов. В связи с этим этилметилгидроксипиридин сукцинат подходит в качестве Исходя из имеющихся данных, этот препарат ранее не испытывался как геронтологический препарат.

Целью настоящей работы является изучение гистологических особенностей надпочечников и яичников крыс линии «Wistar» поздних этапов онтогенеза при использовании этилметилгидроксипиридина сукцината

Исходя из этого, для достижения указанной цели на разрешение были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительную оценку морфологических параметров надпочечников крыс поздних этапов онтогенеза при использовании фармакологической терапии и без воздействия;

2. Оценить состояние адренокортикоцитов надпочечников животных на поздних этапах онтогенеза при использовании фармакологической терапии и без воздействия.

3. Сопоставить полученные гистологические данные с уровнем кортикостерона в плазме крови животных на поздних этапах онтогенеза при использовании фармакологической терапии и без воздействия.

4. Оценить состояние яичников крыс поздних этапов онтогенеза при использовании фармакологической терапии и без воздействия путём сравнения соотношения овариальных фолликулов.

1. Литературный обзор

1.1. Периодизация онтогенеза серой крысы (*Rattus norvegicus*)

Грызуны (*Rodentia*) являются самым многочисленным отрядом современных млекопитающих, численность которых составляет 42% всех видов млекопитающих мировой фауны. Они распространены по всем континентам, кроме Антарктиды, а также на многих океанических островах, где часто являются единственными млекопитающими (Sharp, 2012).

Очень часто грызуны являются удобным объектом для постановки многих экспериментов, связанных со здоровьем человека. К числу видов, которые имеют особо тесные связи с человеком, принадлежат представители рода крысы (*Rattus*) – серая крыса, *Rattus norvegicus* (Berkenheut, 1769), которая также называется рыжей, амбарной и пасюком, и черная, или корабельная, чердачная крыса. Серая крыса – это первое животное, одомашненное в большей степени для научных целей (Sharp, 2012). Первое упоминание в литературе об использовании крыс в научном эксперименте относится к 1856 году (Sharp, 2012). Во второй половине XIX в. сформировались популяции лабораторных белых крыс, и вскоре стало очевидным, насколько это удобный экспериментальный объект. А именно: крыса нетребовательна к условиям содержания; не занимает много места; плодовита и быстро взрослеет; её диета схожа с человеческой; она очень чувствительна к фармакологическим препаратам и токсинам; высокоразвитая нервная система и сложное поведение идеальны для изучения работы мозга и психики. Крысы стали важной моделью для токсикологии, нейробиологии и физиологии, а также молекулярной генетике и геномике (Беляев, 2013).

Исследователям в области биомедицинских наук, использующих крыс, необходимо знать, как соотносить возраст крыс и человека. Как рассчитывать дозу препарата для человека, исходя из дозы для крысы. Количество исследований по этим вопросам мало, а поиск ответов – актуален на текущий момент.

Для соотнесения возрастов разных видов животных проводились эксперименты с весом хрусталика глаза: развитие и рост хрусталика в течение жизни. Такой метод был применен в конце 1980-х годов, на млекопитающих. В результате погрешность в определении возраста была велика. Позже, на основе роста молярных зубов, были разработаны методы по соотношению возрастов мелких млекопитающих. В других

исследованиях предлагалось подсчитать эндостальный слой в большеберцовой кости, чтобы соотнести возраст мелких млекопитающих с возрастом человека (Sengupta, 2011).

Определением границ возрастных групп крыс занимался доктор биологических наук А.Н. Котерова (2018). В таблице 1 представлены результаты. Периоды: неонатальный, детский, ювенильный, препубертатный и поздний пубертатный – слабо коррелируют с аналогичными стадиями развития у людей.

Таблица 1 – Периодизация постанатльного развития серых крыс (*Rattus norvegicus*)
(по А. Н. Котерову, 2018)

| Период | ♂♂, дни | ♀♀, дни |
|---------------------|---------|---------|
| Неонатальный | 0–7 | 0–7 |
| Детский | 8–20 | 8–20 |
| Ювенильный | 21–32 | 21–32 |
| Препубертатный | 33–55 | 33–37 |
| Постпубертатный | 56–70 | 38–46 |
| Социальная зрелость | 160–180 | 160–180 |
| Менопауза | – | 450–540 |

Известно, что средняя продолжительность жизни диких крыс составляет около 2-х лет, в то время как средняя продолжительность жизни лабораторных крыс может достигать 3-х лет (Hubrecht, 2010).

1.2. Возрастные изменения крыс линии «Wistar»

В связи со сложностью содержания и сохранения жизнеспособности возрастных животных, работ по возрастным изменениям крыс ограниченное количество. Они посвящены изучению пищеварительной, выделительной и опорно-двигательной системам. Возрастные изменения репродуктивной и стресс-реализующей системы описаны в подразделах «Строение, функции и возрастные изменения яичников крыс» и «Строение, функции и возрастные изменения надпочечников крыс».

Пищеварительная система. Распространенными возрастными изменениями печени являются наличие липофусцинового пигмента в гепатоцитах, гемосидеринового пигмента в гепатоцитах и клетках Купфера, изменения в размере ядер и увеличение объема, а также

в ploидности гепатоцитов и образование внутриядерных псевдоинклюзивных органов. Кроме того, старение часто связано с разрастанием соединительных тканей и случайным образованием желчных кист, особенно у самок (Komarek et al., 2000).

Выделительная система. Центральным органом выделительной системы являются парные почки, обладающие фильтрационной функцией. В работе (Хирокава, 1975) приведен обширный ряд научных исследований, демонстрирующих изменения почек стареющих крыс. Почки с возрастом заметно увеличиваются и приобретают светло-желтый оттенок. С гистологической стороны выявлены дегенерации различной степени в сторону гиалинизации, обнаруживающиеся в связи с атрофией или расширением канальцев белковыми слепками (цилиндрами), в то время как пролиферативные и воспалительные изменения клубочков менее заметны. При заболеваниях почек возможна кистозная дилатация (расширение) канальцев, содержащих белковые слепки различных размеров. В результате был сделан такой вывод: поражение почек с возрастом становятся более выраженными, что проявляется в увеличении мезангиального матрикса, утолщением базальной мембраны, серповидным образованием и гиалинизацией клубочков, а также дегенерацией канальцев.

Возрастные изменения мышечной системы крыс выражаются в атрофии волокон скелетных мышц, расщеплении волокон, увеличении накопления ипофусцина, потере волокон и фиброзе (Komarek et al., 2000).

1.2.1. Роль окислительного стресса при старении

Не вызывает сомнения то, что эффективно воздействовать на процессы старения, с целью продления периода активного долголетия, возможно только разобравшись в механизмах старения (Баранов, 2007). В настоящее время геронтологами представлен ряд механизмов, в основе которых лежит снижение способности ДНК участвовать в синтезе РНК, с помощью которых осуществляется метилирование ДНК, гликозилирование белков и ДНК, окислительное повреждение биомолекул и т.д. (Виленчик, 1987).

Продукция свободных радикалов. Согласно данным, полученные в ходе исследования свободных радикалов, определяются зависимости, свидетельствующие о постепенном увеличении интенсивности продукции активных форм кислорода (АФК) (Кожевников, 1985; Скулачев, 1996; Колдышева, 2008; Трегубова, 2012). Считается, что скорость продукции супероксида (АФК) митохондриями, в различных тканях организма, с возрастом повышается. Это связывают с повреждением свободными радикалами мембран

самых митохондрий, которые являются основным продуцентом АФК в организме. Именно окислительное повреждение митохондрий считают одним из основных факторов старения и патологических изменений. Также свободные радикалы способны образовываться в результате многих реакций метаболизма (Анисимов, 2008).

Окисление органических молекул в клетке происходит путем переноса электронов от окисляемых молекул на молекулу кислорода в электронно-транспортной цепи (ЭТЦ), включающей в себя пять белковых комплексов, два из которых непосредственно участвуют в продуцировании АФК. Для полного восстановления молекулы кислорода до двух молекул воды необходимо присоединить четыре электрона. Однако ферменты переносят электроны на молекулы кислорода по одному, поэтому образуются полувосстановленные формы кислорода, обладающих большой реакционной способностью. В процессе старения в ЭТЦ наблюдается повышенное образование промежуточного продукта, образующего супероксидные радикалы. Они представляют собой молекулу кислорода, присоединившую только один электрон, и поэтому находятся в свободно-радикальном состоянии. Этот факт свидетельствует о дестабилизации работы ЭТЦ в митохондриях, вызывающий увеличение количества молекул АФК.

В результате нарушения окислительных процессов в митохондриях может существенно снижаться эффективность переноса электронов по ЭТЦ, что приводит к утечкам ферментов, в процессе восстановления. Это, в свою очередь, повышает вероятность образования АФК (супероксидного радикала, гидроксильного радикала и перекиси водорода) (Виленчик, 1987; Анисимов, 2008).

Система антиоксидантной защиты. Большинство АФК нейтрализуются до взаимодействия с компонентами клетки. К основным эндогенным факторам антиоксидантной защиты организма относят некоторые ферменты и витамины. Например, ферменты супероксиддисмутаза (СОД) превращает супероксидный радикал (O_2^*) в перекись водорода (H_2O_2), глутатион-пероксидаза превращает перекись водорода в воду и кислород, а витамины Е и С связывают жирорастворимые и водорастворимые свободные радикалы, соответственно. Мелатонин также является антиоксидантом – связывает жиро- и водорастворимые радикалы (Анисимов, 2008).

С возрастом происходит снижение как активности основных антиокислительных ферментов (СОД, глутатион-пероксидазы), так и общей антиокислительной активности (Анисимов, 1999).

Окислительное повреждение биомолекул. В присутствии ионов переходных металлов, например, двухвалентного железа (Fe^{2+}), перекись водорода может образовывать гидроксильный радикал (OH^*), обладающий наибольшей активностью среди

АФК (Донцов и др., 2006). Главными причинами повреждений биомолекул являются: отрыв атома водорода; присоединение к молекулам по двойной связи; перенос электронов. Повреждение ДНК при этом характеризуется разрывом цепи, окислением и модификацией основания, образованием гидропероксидов ДНК, повреждением хромосом. Взаимодействуя с белками, OH^* образует гидропероксиды, что меняет их третичную структуру или вызывает агрегацию и денатурацию. В связи с этим ферментативная и регуляторная активность процессов нарушается. Взаимодействие молекулы OH^* с липидами ведет к образованию перекисных соединений. Незаряженные радикалы OH^* способны проходить через толщу гидрофобного липидного слоя и вступать в химическое взаимодействие с полиненасыщенными жирными кислотами. В результате подобных реакций образуются липидные радикалы, способные взаимодействовать с растворенным в среде кислородом, образуя липоперекисный радикал. Последний атакует рядом расположенную молекулу фосфолепида с образованием гидроперекиси липида и гидроксильного радикала (OH^*). Далее развивается цепная реакция. Избыточная концентрация АФК приводит к патологическим изменениям, которые называются оксидативным стрессом (Донцов и др., 2006; Анисимов, 2008; Мартусевич, 2015).

1.2.2. Фармакологическая терапия при окислительном стрессе

Фармакологическая регуляция образования АФК может быть осуществлена двумя способами: прямым воздействием на радикалы кислорода и их связывание, и путём повышения активности ферментов антиоксидантной защиты. При этом применение фармакологической терапии может быть направлено как на устранение первичных повреждений, вызванных действием АФК, так и на блокирование вызванным ими апоптозом (Новиков и др., 2014).

Пристальное внимание исследователей привлекают модифицированные природные антиоксиданты, называемые «физиологически совместимые антиоксиданты» (ФСАО). Эта группа веществ способна поддерживать показатели гомеостаза в физиологических границах при экстремальных ситуациях. Особенностью ФСАО является осуществление сдвига окислительно-восстановительного потенциала клетки, синхронизированного с биологическими циклами (Новиков и др., 2014).

Выделяют ряд антиоксидантов под названием SkQ, особенностью которых является адресное взаимодействие с митохондриальными свободными радикалами. Соединение SkQ является регенерируемыми антиоксидантами многократного действия (Зоров и др., 2013).

1.3. Свойства этилметилгидроксипиридина сукцината (препарат «Мексидол»).

«Мексидол» – отечественный синтетический препарат с оригинальным механизмом действия и широким спектром фармакологических эффектов, реализуемых на двух уровнях – нейрональном и сосудистом.

Среди известных антиоксидантов «Мексидол» занимает особое положение в связи с его способностью оказывать влияние на разные этапы свободнорадикальных процессов в мембранах и внутри клетки. К тому же, он не обладает прооксидантным действием, что характерно для многих других антиоксидантов (Воронина, 2012). О стресспротекторных свойствах «Мексидола» свидетельствует работа Т.А. Замощиной с соавт. (2018), где в качестве моделей стресса выбраны световой десинхронизм и физическая нагрузка с применением методики принудительного плавания.

Действие «Мексидола», в полости рта, оказывает умеренное противомикробное воздействие. Препарат обладает достоверно выраженным и быстрым купированием воспалительных реакций в десне (Румянцев и др., 2013).

Механизм действия «Мексидола». «Мексидол» ингибирует процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), реагирует со свободными радикалами пептидов, снижает повышенный при патологии уровень оксида азота (II) (NO) в мозге, повышает активность антиоксидантных ферментов, а именно супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы, отвечающих за образование и расщепление АФК (Воронина, 2016). Механизм действия «Мексидола» определяется его антиоксидантными и мембранопротекторными действиями, в которых можно выделить ключевые звенья:

1. Эффективное ингибирование свободнорадикального окисления (СРО) липидов мембран, активное взаимодействие с перекисными радикалами липидов и пептидов.
2. Повышение активности антиоксидантных ферментов, а именно супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы, отвечающих за образование и расщепление АФК.
3. Повышение содержания полярных фракций липидов и снижение соотношения «холестерин-фосфолипиды». Снижение вязкости мембраны и увеличивает ее текучесть.
4. Изменение активности мембраносвязанных ферментов.
5. Изменение рецепторных комплексов мембран мозга (ГАМК, ацетилхолиновый).
6. Стабилизация биологических мембранных элементов крови при их гемолизе и механическом повреждении, при образовании свободных радикалов.

Препарат активизирует энергетический синтез в митохондриях (Воронина, 2001).

Благодаря своему механизму действия, «Мексидол», обладает широким спектром действия, оказывает влияние на ключевые процессы развития заболеваний, которые связаны со свободнорадикальным окислением (Воронина, 2001).

1.4. Строение, функции и возрастные изменения надпочечников крыс

Надпочечники представляют собой парный орган, расположенный у верхнего полюса каждой почки и тесно прилегающий к ее поверхности. Имеют вид желтоватого тела (рисунок 1). Снаружи каждый надпочечник покрыт соединительнотканной оболочкой (Белик, 2011).

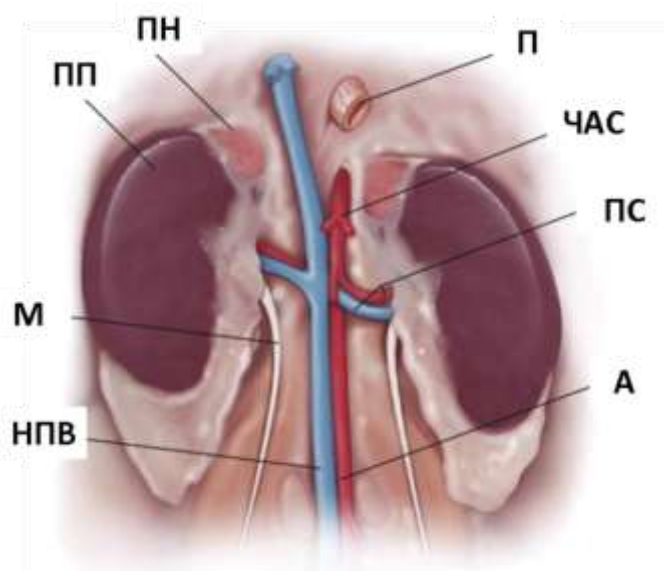


Рисунок 1 – Схема топографии надпочечников серой крысы (*Rattus norvegicus*). Удалены печень, селезенка, поджелудочная железа и желудочно-кишечный тракт (по Р. М. Treuting, 2017)

Примечание: П – пищевод, ЧАС – чревный артериальный ствол, ПС – почечные сосуды, А – аорта, НПВ – нижняя полая вена, М – мочеточник, ПП – правая почка, ПН – правый надпочечник.

Паренхима железы дифференцирована на корковое и мозговое вещество, которые отличаются по функциям и происхождению. Мозговое вещество занимает центральное положение и по периферии окружено корковым веществом, которое прочно спаяно с соединительнотканной капсулой (Розен, 1994)

Мозговое вещество секретируют катехоламины – адреналин и норадреналин. Кортикостероидные гормоны: минералокортикоиды – альдостерон; глюкокортикоиды – гидрокортизон, кортикостерон; половые гормоны – андрогены, эстроген и прогестерон (Розен, 1994).

1.4.1. Микроскопическое строение надпочечника крыс

Мозговое вещество надпочечных желез представлено плотно размещенными комплексами, состоящими из крупных, округлой или полигональной формы, секреторных клеток (Казимирко, 2012). Комплексы клеток разграничиваются синусоидами – кровеносными сосудами (рисунок 2).

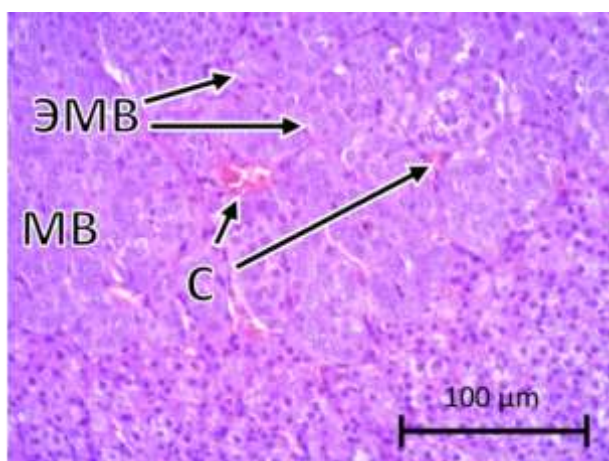


Рисунок 2 – Микроструктура мозгового вещества надпочечника крыс линии «Wistar» (опытная группа). Участок продольного среза. Гематоксилин Майера – эозин. Фото автора
Примечание: МВ – мозговое вещество, ЭМВ – эндокриноциты мозгового вещества, С – синусоиды.

Кортикостероидные гормоны: минералокортикоиды – альдостерон; глюкокортикоиды – гидрокортизон, кортикостерон; половые гормоны – андрогены, эстроген и прогестерон (Розен, 1994).

Корковое вещество надпочечников состоит из трех гистологических зон: клубочковой, пучковой и сетчатой, различающихся по расположению секреторных клеток относительно друг друга. Последние объединены в систему многочисленных эпителиальных тяжей, тесно прилегающих друг к другу, которые ориентированы перпендикулярно капсуле (Белик, 2011).

Под соединительнотканной капсулой располагается клубочковая зона. Она построена из клеток, собранных в сферические скопления, в каждом из которых насчитывается по 5–10 адренокортикоцитов, имеющих вытянутую форму (рисунок 3)..

Между клубочковой и пучковой зонами наблюдается переходная зона, состоящая из плотно располагающихся относительно друг друга клеток (Белик, 2011).

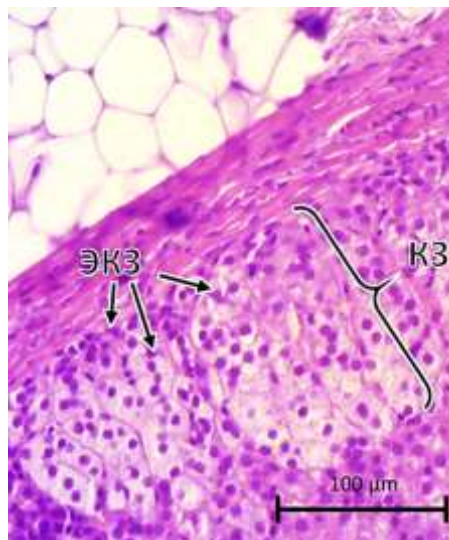


Рисунок 3 – Микроструктура клубочковой зоны коры надпочечника крыс линии «Wistar» (опытная группа). Гематоксилин Майера – эозин. Фото автора

Примечание: КЗ – клубочковая зона, ЭКЗ – эндокриноциты клубочковой зоны.

Средняя, пучковая зона, самая широкая, представлена крупными клетками призматической и полигональной формы, образующих узкие радиальные тяжи, толщина которых составляет 1–2 клетки. Тяжи отделяются друг от друга волокнистой соединительной тканью с редкими капиллярными синусоидами (Белик, 2011) (рисунок X).

Самая глубокая зона коркового вещества – сетчатая, состоит из компактно расположенных клеток, образующих между собой анастомозирующие тяжи и изолированные группы. Последние разделены многочисленными кровеносными капиллярами синусоидного типа. Размеры клеток этой зоны меньше, чем в пучковой зоне (Белик, 2011) (рисунок 4).

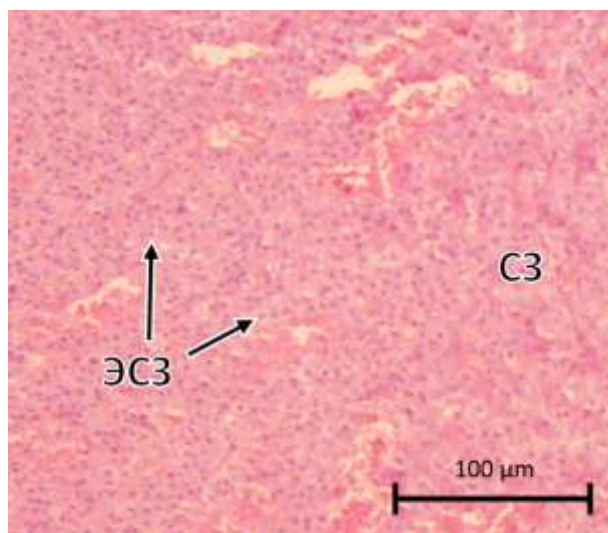


Рисунок 4 – Микроструктура сетчатой зоны коры надпочечника крыс линии «Wistar» (опытная группа). Гематоксилин Майера – эозин. Фото автора

Примечание: СЗ – сетчатая зона, ЭСЗ – эндокриноциты сетчатой зоны.

1.4.2. Гипоталамо-гипофизарно-адреналовая система

Как известно, гипофиз и надпочечники в составе оси гипоталамус – гипофиз – надпочечники играют ключевую роль в регуляции активности стрессреализующих систем организма. Стресс – одна из общих неспецифических нервно-гуморальных реакций организма человека и животных на действие раздражителей (стрессоров), она имеет защитное значение и направлена на восстановление нарушенного гомеостаза. Любое стрессорное воздействие приводит к увеличению синтеза и секреции кортиколиберина (кортикотропин-рилизинг-гормона, КРГ). КРГ по воротной системе сосудов поступает в аденогипофиз, где связывается со специфическими G-белок-сопряженными рецепторами кортикотропных клеток. КРГ – главный стимулятор синтеза и секреции проопиомеланокортина (ПОМК), предшественника адренотропного гормона (АКТГ). АКТГ через кровоток достигает коры надпочечников, где на клетках пучковой и сетчатой зон связывается со специфическим рецептором и стимулирует синтез и секрецию глюкокортикоидов, активируя аденилатциклазу и стимулируя продукцию циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) (Наволоцкая, 2015).

В свою очередь, глюкокортикоиды по принципу отрицательной обратной связи ингибируют синтез и секрецию КРГ и АКТГ, восстанавливая исходный гормональный уровень. Возрастание уровня глюкокортикоидов в крови способствует высвобождению катехоламинов, активирует ферменты глюконеогенеза, усиливает липолиз, подавляет

белковый синтез, увеличивает секрецию глюкагона, снижает секрецию инсулина и т.д., то есть запускает реакции, позволяющие организму бороться с негативным воздействием стрессора (Наволоцкая, 2015).

Надпочечники являются важнейшими эндокринными железами крыс. Они участвуют в нейрогуморальной регуляции водно-солевого, белкового, жирового и углеводного обменов, контролируют адаптационные процессы организма. Надпочечные железы обладают относительной лабильностью и способны к быстрой морфофункциональной перестройке (Розен, 1994).

1.4.3. Возрастные изменения надпочечников крыс

К признакам возрастных изменений надпочечников можно отнести редукцию отчасти клубочковой и, главным образом, сетчатой зоны. В адренокортикоцитах пучковой зоны происходит уменьшение количества и размеров липосом, за счет чего ткань надпочечников в этой зоне выглядит более плотной. Синусоидные кровеносные капилляры пучковой зоны коры, расположенные между тяжами спонгиоцитов, местами сужаются, нарушая таким образом правильный ход тяжей. Соединительнотканые прослойки между эпителиальными тяжами коркового вещества утолщаются. В сосудах и строме обнаруживаются признаки склероза (Перчик, 2006).

Известно, что по мере старения в плазме крови и тканях надпочечников уменьшается уровень стероидных гормонов (Юссеф, 2007).

1.5. Строение, функции и возрастные изменения яичников крыс

К половым органам самки крыс относятся яичники, яйцеводы, матка, влагалище и наружные половые органы (рисунок 5). Яичник крысы представляет собой парный орган небольшого размера, гроздевидной формы, желто-серого цвета, расположенный позади почки. Яичники не имеют выводных протоков и снаружи не покрыты брюшиной. При созревании яйцеклетки стенка яичника разрывается, и яйцеклетка попадает в полость овариальной сумки, которая окружает яичник (Гамбарян, 1955; Treuting, 2017).

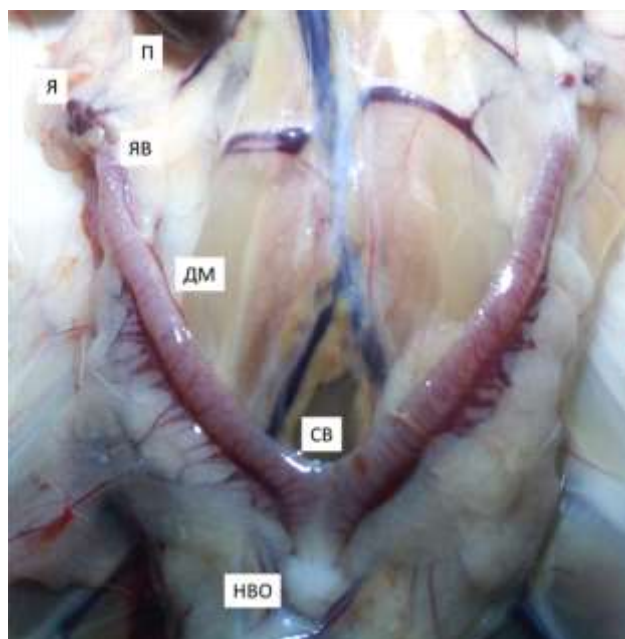


Рисунок 5 – Строение женской половой системы серых крыс (*Rattus norvegicus*). Фото автора

Примечание: Я – яичник, ЯВ – яйцевод, ДМ – двурогая матка, СВ – свод влагалища, НВО – наружное влагалищное отверстие, П – почка

1.5.1. Микроскопическое строение яичников крыс

С гистологической точки зрения, яичник от периферии к центру подразделяется на корковую и мозговую зону (Думитру и др., 1981; Treuting, 2017). Следует отметить, что некоторые авторы в строении яичника выделяют три слоя корковый (наружный, фолликулярный), мозговой и внутренний (сосудистый) (рисунки 6) (Серов, 2004; Treuting, 2017).

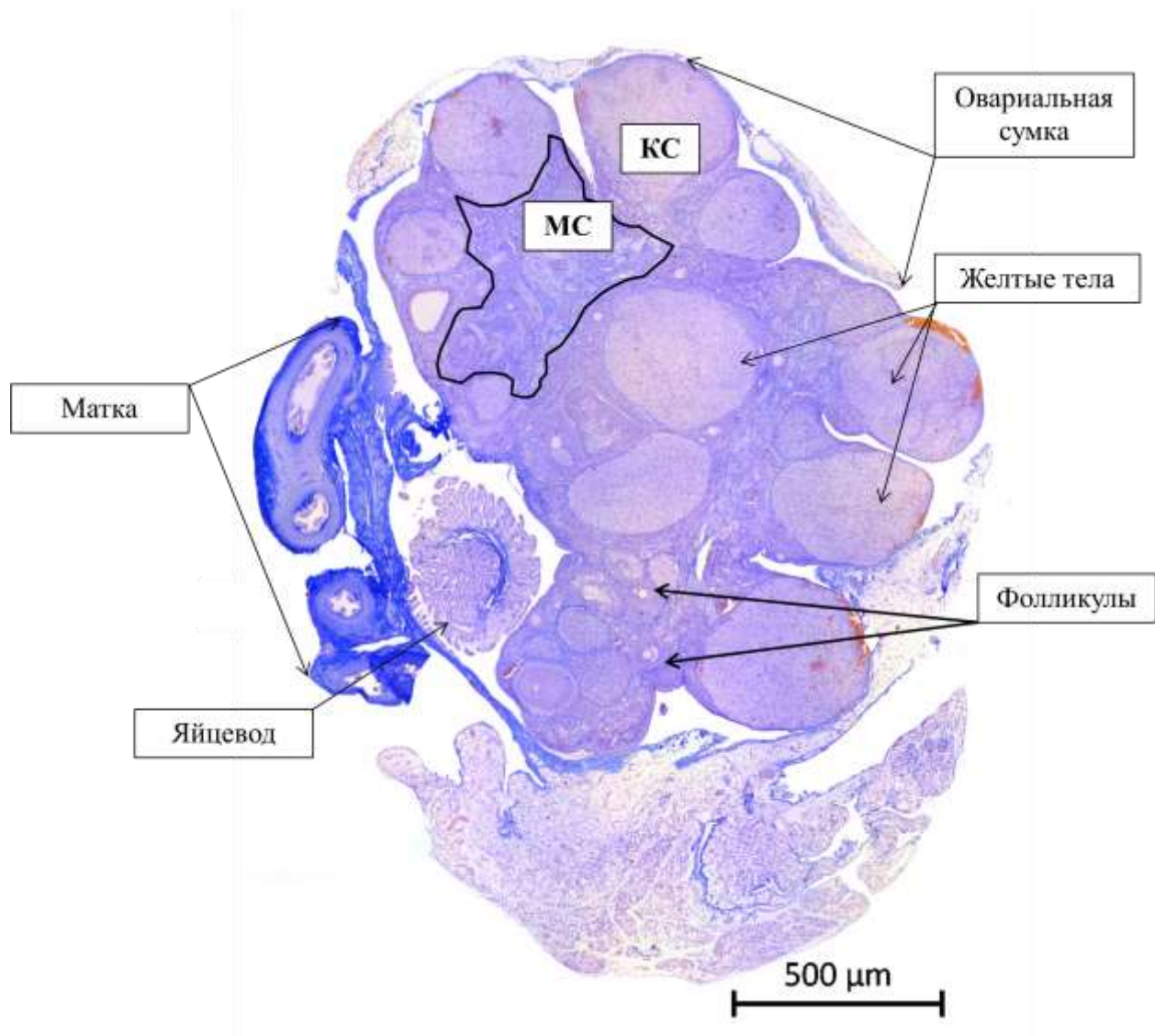


Рисунок 6 – Продольный срез яичника серых крыс (*Rattus norvegicus*).

Модифицированный азан. Фото автора

Примечание: КС – корковый слой, МС – мозговой слой.

Корковый слой снаружи покрыт кубическими или кубически-цилиндрическими эпителиальными клетками, или зародышевым эпителием, который подстиляется белочной оболочкой (рисунок 6). Корковый слой представляет собой скопление незрелых ооцитов, заключенных в комплекс фолликулярных клеток, и строму, состоящую из примордиальных фолликулов на разных стадиях развития желтых и белых (соединительнотканых рубцов) тел (Гамбарян, 1995; Думитру и др., 1981).

В состав стромы коркового слоя входят клетки трех типов: соединительнотканые, выполняющие опорную функцию, сократительные и интерстициальные. Эти клеточные

элементы способны к гипертрофии и секреции половых гормонов (Серов, 2004; Гамбарян, 1995).

В зоне коркового слоя происходит формирование яйцеклеток, претерпевающих разные стадии развития, что отражают названия фолликулов, в которых и находятся женские половые клетки: примордиальные, первичные однослойные, первичные многослойные, вторичные многослойные и третичные (Граафовы пузырьки) (рисунок 6) (Голиченков, 2004). Причем, толщина этой зоны имеет большие размеры в период полового созревания и на начальных этапах половой жизни, чем в конце (Думитру и др., 1981).

Примордиальные фолликулы – расположены на периферии коркового слоя яичника, под белочной оболочкой, представлены в виде покоящихся сферических образований. Фолликулярные клетки приплюснутые, расположены вокруг яйцеклетки в один слой. Имеют самые маленькие размеры, по сравнению с последующими (Думитру и др., 1981).

Первичные однослойные фолликулы представляют собой примордиальные фолликулы, вступившие в созревание, продолжающиеся до определенного размера. Фолликулярные клетки имеют кубическую форму (Думитру и др., 1981).

Первичные многослойные фолликулы продолжают расти за счет увеличения объема яйцеклетки и усиленного деления фолликулярных клеток (Думитру и др., 1981).

На этом этапе фолликулярный эпителий становится многослойным. Начинается процесс дифференциации клеточного фолликулярного слоя на зернистый и текальный слои. Происходит синтез фолликулярной жидкости, которая заполняет одну или несколько полостей (атриумы) (Думитру и др., 1981).

Третичный фолликул (Граафов пузырьки) – самый крупный по размеру. Выступает на поверхности яичника. Стенка этого фолликула состоит из нескольких слоев клеток. Внутренний слой эпителиальных клеток образует *zona granulosa* (гранулезный слой), на небольшом выступе, направленном в полость, заполненной фолликулярной жидкостью, расположен ооцит. Этот выступ называют яйценосной ножкой или бугорком (Серов, 2004). За гранулезным слоем следует плотный слой клеток, называемый *theca interna* (внутренняя оболочка). Снабжен кровеносными сосудами и является главным синтезатором фолликулярных половых стероидных гормонов. Внешний слой стенки фолликула называется *theca externa* (наружная оболочка) (Думитру и др., 1981).

Во всех перечисленных выше типах фолликулов находятся ооциты первого порядка, которые претерпевают блокаду мейоза, и только после разрыва стенки зрелого фолликула (Граафова пузырька) возобновляются процессы мейоза с образованием ооцита второго порядка. Далее такой ооцит вступает во второе деление созревания, которое блокируется в

метафазе. Второй блок, в свою очередь, снимается только при оплодотворении (Голиченков, 2004).

Мозговой слой яичников расположен центрально или пароцентрально по отношению к корковому слою. Представлен клетками различного происхождения, кровеносными, лимфатическими сосудами и нервными элементами (рисунок 6) (Серов, 2004; Гамбарян, 1995; Думитру и др., 1981).

1.5.2. Половые циклы женской репродуктивной системы млекопитающих

У самок репродуктивные процессы всегда характеризуются специфически закономерной периодичностью, причем смена этих процессов охватывает органы половой системы и системы их регуляции (Розен, 1994).

Цикличность половых процессов самок обусловлена женским типом функционально-структурной организации гипоталамической регуляции, включающей циклический и тонический центры. Их совместная деятельность определяет циклический выброс гонадотропинов клетками аденогипофиза. Также циклический характер репродуктивных процессов самок определяется волнообразно меняющимся функциональным состоянием яичников, гормоны которых способны влиять на ритмичность процессов обоих центров гипоталамуса и, следовательно, на гонадотропные функции гипофиза. Таким образом, совместное и сбалансированное функционирование этих двух механизмов, объединяющихся в гипоталамо-гипофизарно-гонадную систему, обеспечивает реализацию и нормальное течение половых циклов (Розен, 1994).

Возможность циклических процессов репродуктивной системы самок реализуется в результате волнообразного характера роста и созревания фолликулов и желтых тел в яичниках, в которых образуются половые стероиды (эстрогены, прогестины и андрогены) под влиянием гипоталамо-гипофизарной системы. Периодичность продукции этих гормонов, в частности – эстрогенов и прогестеронов, оказывает как прямое влияние на половую систему, так и обратное влияние на функционирование центров гипоталамуса. Циклические изменения уровня секреции овариальных гормонов по механизму обратной связи регулируют функциональное состояние циклического и тонического центров гипоталамуса, что поддерживает их циклическую деятельность. При понижении уровня секреции половых гормонов происходит стимуляция, а при повышении уровня – торможение активности центров гипоталамуса и, следовательно, гипофиза (Розен, 1994).

В общих чертах, механизм регуляции активности гипоталамо-гипофизарной системы, под влиянием половых стероидов, выражается как в изменении чувствительности тонического центра к нейромедиаторам, так и во влиянии на уровень активности циклического центра, связанного со специфическими циторецепторами (Розен, 1994).

1.5.3. Овариальный цикл

Овариальным циклом называют периодические изменения, протекающие в половых гонадах (яичниках) у женских особей репродуктивного возраста (Розен, 1994).

Физиология овариального цикла сводится к смене двух фаз: фолликулярной и лютеиновой (Розен, 1994).

Фолликулярная фаза цикла – период доминирования созревающих фолликулов. Начальные этапы созревания фолликулов не зависят от гонадотропных гормонов и протекают спонтанно. Из клеток зачаткового эпителия образуются первичные ооциты, которые окружаются одним слоем гранулезных клеток, в свою очередь, образующихся из интерстициальных клеток стромы. Под этой структурой и понимают примордиальный фолликул. Затем примордиальный фолликул претерпевает ряд изменений: деление гранулезных клеток, образование внутреннего и наружного фолликулярного слоя из соединительнотканых клеток стромы, увеличение размеров фолликула и ооцита. За этими изменениями следует формирование полости, заполняемой фолликулярной жидкостью, которое происходит в результате расслоения и оттеснения к стенке пузырька гранулезного слоя. В это время внутренняя оболочка и гранулезный слой продуцируют половые стероидные гормоны (Розен, 1994).

Фолликул, при достижении зрелого состояния, становится гормонозависимым, и дальнейшее его функционирование тесно связано с функциями гипоталамо-гипофизарной системы (Розен, 1994).

Эндокринный механизм функционирования фолликулов. На начальных этапах овариального цикла созревающие везикулярные фолликулы становятся чувствительными к лютеотропному гормону гипофиза (ЛТГ), т. к. под влиянием эстрагенов они начинают синтезировать рецепторы к этому гормону. ЛТГ, в свою очередь, увеличивает чувствительность фолликулов к фолликулостимулирующему гормону гипофиза (ФСГ) и лютеинизирующему гормону гипофиза (ЛГ), в связи со стимуляцией синтеза или активации рецепторов к этим гормонам. В данный период цикла продукция ФСГ

увеличивается, а продукция ЛГ остается на прежнем уровне. ФСГ необходим для стимуляции роста фолликулов, дальнейшее их развитие происходит под прямым влиянием ЛГ, а именно, зрелыми фолликулами усиленно синтезируются половые стероидные гормоны и, прежде всего, эстрогены. Эстрогены, по принципу положительной обратной связи активируют циклический выброс рилизинг-фактора ЛГ и ФСГ (ЛГ/ФСГ-РФ) гипоталамусом, в результате чего происходит овуляторный выброс ФСГ и ЛГ гипофизом. На секрецию гипофизарных гормонов оказывают свое влияние как эстрогены, так и простагландины. Последние, синтезируются в гипоталамусе под влиянием эстрогенов и в гипофизе под влиянием ЛГ/ФСГ-РФ. Циклический выброс ЛГ и повышенная к нему чувствительность клеток зрелого фолликула, развивающаяся под действием возросшей, в это время, секреции ФСГ и ЛГГ, вызывает процесс овуляции, которая у разных видов млекопитающих происходит через 8–50 ч. (Розен, 1994; Шушкевич, 2009).

В фолликуле, при участии простагландинов, ЛГ вызывает активацию протеолитических ферментов, приводящих к разрушению фолликулярной стенки и выходу яйцеклетки из яичника (Розен, 1994; Шушкевич, 2009).

В фолликулярной фазе прослеживаются следующие закономерности: увеличение секреции ФСГ; передовулярное увеличение секреции эстрогенов и тестостерона; резкое увеличение концентрация ЛГ; последующее предовулярное увеличение секреции гипофизарных ЛГ, а также ФСГ (Розен, 1994; Шушкевич, 2009).

Лютеиновая фаза цикла – период доминирования желтых тел. Длится с момента образования данных структур до их разрушения (или лизиса). Желтые тела, секретирующие, в большей степени, прогестерон, выполняют у млекопитающих следующие важные функции: подготавливают матку к беременности и обеспечивают правильное ее течение; оказывают тормозные эффекты на созревание фолликулов и овуляцию. Если беременность не наступает, желтые тела претерпевают регрессию и перестают синтезировать прогестерон. Обратное развитие желтого тела заканчивается формированием белого тела, которое представляет собой гиалиновое образование (Розен, 1994).

Секреция прогестерона начинается сразу после образования желтого тела. Затем синтез гормона увеличивается и, после достижения его максимальной концентрации, при условии, что не произойдет оплодотворение, постепенно снижается вследствие регрессии желтых тел. У крыс лютеиновая фаза цикла обычно длится 38–40 ч (Розен, 1994).

Эндокринный механизм функционирования желтых тел. Стимулом для формирования желтых тел является ЛГ, который активирует дифференцировку

лютеиновых клеток и синтез гормона прогестерона. Эффект ЛГ на процесс лютеинизации опосредован ЛТГ. Он увеличивает чувствительность лютеиновых клеток к низким концентрациям ЛГ, усиливая синтез рецепторов к последнему. Лютеиновые клетки желтого тела, возникшие под влиянием ЛГ и ЛТГ, синтезируют прогестерон, определяющий общее функциональное состояние гипоталамус–гипофиз–гонады и полового тракта в данной фазе овариального цикла (Розен, 1994; Шушкевич, 2009).

1.4.2.1. Эстральный цикл

Эстральным циклом называют периодические изменения, протекающие в половом тракте (матке и влагалище) у женских особей репродуктивного возраста. Продолжительность данного цикла равна продолжительности овариального цикла (Розен, 1994).

Эстральный цикл складывается из следующих четырех последовательных стадий (Розен, 1994):

Прозэструс (предтечка). Характеризуется наиболее высоким уровнем секреции эстрагенов зрелыми фолликулами и гипертрофией и гиперплазией эпителиальных клеток влагалища, а также последующим отторжением эпителиальных клеток, секретирующих слизь.

Эструс (течка). Характеризуется расслаиванием (стратификацией) гипертрофированных и гиперплазированных эпителиальных клеток влагалища. Данные клетки образуют наружный чешуйчатый слой, в которых происходит процесс депонирования кератина, что способствует ороговению и отторжению эпителиальных клеток. Стадия эструса по времени совпадает с овуляцией.

Метаэструс (послетечка). Характеризуется резким снижением концентрации эстрогенов в крови, уменьшением активности эпителиальных клеток и отторжением базального слоя клеток влагалища. *Метаэструс* по времени совпадает с формированием желтых тел.

Диэструс (межтечка). Характеризуется низким уровнем эстрогенов, заторможенностью пролиферации, стратификации и ороговения эпителиальных клеток влагалища, а также высоким уровнем секреции слизи.

Атрезия (разрушение) желтого тела и переход яичника в фолликулярную фазу овуляторного цикла индуцируют начало нового эстрального цикла.

1.5.4. Возрастные изменения яичников крыс

В работе Д. Д. Пелюсо с соавт. (Peluso et al., 1979) выявлено, что с возрастом концентрация прогестерона, эстрагена и тестостерона на стадии проэструса эстрального цикла выше, если сравнивать с показателями крыс зрелого возраста, тогда как на стадии эструса уровень концентрации прогестерона и тестостерона старых крыс имеет меньшие значения (таблица 2).

Процессы старения женских гонад представлены рядом изменений. Так, поверхность яичников становится крупнобугристой, белочная оболочка утолщается. В корковом веществе яичников отмечается постепенный склероз стромы. Уменьшается количество фолликулов различной степени зрелости, при этом количество белых тел, напротив, увеличивается. Уменьшается толщина коркового вещества. В мозговом веществе начинает преобладать грубоволокнистая соединительная ткань, формируется склероз сосудов, разной степени выраженности. С возрастом прослеживается увеличение диаметра сосудов корковой и мозговой зон яичников, сопровождающиеся утолщением их стенки и увеличением просвета. В результате полной атрофии в старшем возрасте яичники деформируются в плоские фиброзные пластинки (Горбатюк, 2013; Алексеев, 2016).

Таблица 2 – Основные этапы развития женской репродуктивной системы крыс

| Время, сут. | Описание |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | период новорожденности, в яичниках происходит первое мейотическое деление ооцитов и формирование примордиальных фолликулов |
| 30 | завершается вскармливание молоком, начинается половое созревание, появляются первые атриальные (полостные) фолликулы |
| 60 | период полового созревания, интенсивного созревания фолликулов |
| 90 | период ранней половозрелости, появляется первая течка (овуляция) |
| 180 | расцвет репродуктивной функции |
| 360 | период зрелости, предшествующий старческому увяданию |
| Более 400 | угасание половой функции |

Овариальный резерв примордиальных фолликулов у различных млекопитающих, в том числе и у крыс снижается с возрастом. Более того, у грызунов этот процесс происходит в постоянной пропорции к существующему числу фолликулов (Cruz et al. 2017).

Анализ распределения развивающихся фолликулов (первичных однослойных и многослойных) показал, что к 8-месячному возрасту их число уменьшается более чем наполовину, и остается относительно постоянным до 14-месячного возраста (Cruz et al., 2017).

Информация о количестве антральных фолликулов (вторичных многослойных и Граафовых пузырьков) неоднозначная. Существует мнение, что количество антральных фолликулов также, как и развивающихся, уменьшается с 8-месячного возраста (Lerner et al. 1990). Однако, ряд авторов (Jones & Krohn, 1961; Fernandois et al. 2016) доказал, что их количество остается неизменным. Последнее указывает на то, что вовлечение новых примордиальных фолликулов в пул растущих фолликулов яичников у пожилых крыс происходит более эффективно.

Яичники возрастных крыс обладают низким начальным набором и скоростью роста примордиальных фолликулов, но имеют пропорционально большее количество фолликулов, достигающих преовуляторной стадии (Граафовых пузырьков) (Jones & Krohn 1961, Peluso et al. 1979). Однако, их более высокая доля пропорционально не отражается на большей овуляции, поскольку они способны деградировать в прекистозные и кистозные структуры (Cruz et al. 2017).

Количество желтых тел уменьшается с возрастом и практически отсутствует с 12-месячного возраста. Идентичная тенденция имеется у атретических фолликулов (Cruz et al. 2017).

2. Материалы и методы исследования

Данная работа выполнена на базе Национального исследовательского Томского государственного университета под научным руководством канд. биол. наук, доцента В.В. Ярцева. Экспериментальная часть исследования проведена на базе экспериментальной лаборатории биомедицинских технологий Филиала Томского научно-исследовательского института курортологии и физиотерапии Федерального государственного бюджетного учреждения Сибирский федеральный научно-клинический центр федерального медико-биологического агентства (ТНИИКиФ ФГБУ СибФНКЦ ФМБА) под руководством научного сотрудника, канд. биол. наук А.А. Гостюхиной.

2.1. Характеристика тест-объекта

Крысы линии «Wistar» – аутбредные белые крысы. Эта линия разработана Вистаровским институтом в 1906 г. для использования в биологических и медицинских исследованиях и является первой линией крыс, выведенной в качестве модельного организма в то время, когда лаборатории использовали преимущественно домовых мышей. Более половины всех лабораторных линий крыс произошли от первой популяции. На данный момент крысы «Wistar» являются наиболее популярными крысами в лабораторных исследованиях. Они используются в онкологических исследованиях, тератологии, для изучения проблем питания и старения (Ахмадеев, 2012).

В настоящей работе в качестве биологического объекта исследования использовали самок крыс линии «Wistar» массой 250–300 г, в возрасте 18-и месяцев ($n = 12$). Животные содержались в стандартных условиях вивария филиала ТНИИКиФ ФГБУ СибФНКЦ ФМБА России по 6 особей в клетке при естественном освещении, на стандартном рационе и свободным доступом к воде и корму. Эксперимент проводился в помещении при температуре воздуха 20–25 °С и относительной влажности 50–65 %. Все процедуры с животными производились в утреннее время согласно правилам и рекомендациям гуманного обращения с животными, используемыми для экспериментов и иных научных целей (ГОСТ 34088-2017).

2.2. Схема эксперимента

Экспериментальных животных разделили на 2 группы:

1. Интактная группа ($n = 6$) – крысы, не подвергавшиеся никаким экспериментальным воздействиям;

2. Опытная группа ($n = 6$) – крысы, получавшие «Мексидол» в виде инъекций по 0,1 мл 1 % раствора на 100 г массы животного.

Этилметилгидроксипиридина сукцинат или «Мексидол» фармацевтической компании «Фармасофт» (ООО «Элара», Россия) вводили внутримышечно в дозе 10 мг/кг, исходя из минимальной разовой дозы для человека (100 мг) (Чучалин и др., 2017) и коэффициентов пересчёта (Миронов и др., 2012). Для этого заводской 5% раствор «Мексидола» разводили до 1%, чтобы точно дозировать выбранную дозу из расчета 0,1 мл разведенного раствора на 100 г массы животного. Курс инъекций составил 5 дней (Замошина и др., 2018). Длительность эксперимента составила 24 дня. После его завершения всех животных выводили одномоментным декапитированием под CO₂-наркозом.

Затем у крыс, зафиксированных (при помощи иголок на препаровальной доске) на спине вскрывали брюшную стенку (после смачивания вентральной стороны антисептическим раствором) и препарировали левые надпочечник и яичник, которые извлекали и отделяли от окружающих тканей, с последующей фиксацией в 10 % забуференном растворе формалина для последующего гистологического анализа.

2.3. Гистологический анализ органов исследования

Гистологический анализ проводили по стандартной методике (Ярцев, 2019). После фиксации в 10% забуференном формалине, надпочечники и яичники обезвоживали в растворах этанола возрастающей крепости (70%, 95%, 98%), просветляли в бутаноле и проводили заливку в парафин (LabPoint, Россия) (приложение А). Срезы толщиной 5 мкм изготавливали на ротационном микротоме RMD-3000 (MTPoint, Россия) и переносили на предметные стёкла с белок-глицериновым покрытием, выполняющим адгезивную функцию. Для надпочечников использовали срезы только из центральной части органа, яичник нарезали полностью.

Непосредственно перед самим окрашиванием проводили дополнительную обработку срезов, состоящую из нескольких этапов. Вначале проводили удаление парафина (депарафинизация). Следующим шагом в подготовке насыщали срезы водой (регидротация) в серии спиртов с падающей концентрацией (98%, 95%, 70%). После попадания срезов в воду проводили их окрашивание (Ярцев, 2019). Срезы надпочечников

окрашивали гематоксилином Майера и эозином (приложение Б). Окраску срезов яичников осуществляли 2-я методами (Ярцев, 2019): стекла с четными номерами образцов – окраска модифицированным азаном, с нечетными – окраска по Ван-Гизону (приложение В).

Готовые препараты заключали в синтетическую монтирующую среду с последующим помещением под покровное стекло. Всего изготовили 44 и XX микропрепаратов надпочечников и яичников соответственно. Полученные гистологические препараты анализировали с помощью микроскопов МСП-1 (Ломо, Россия) и Axio Lab A1 с последующей морфометрией по микрофотоснимкам, получаемым с помощью камеры AxioCam ERc 5s и программы ZEN 2 (Carl Zeiss Microscopy, Германия).

Для оценки морфологического и функционального состояния надпочечников исследователи используют большое разнообразие параметров. Так, в работах ряда авторов наиболее информативными показателями изменения состояния надпочечников являются индекс органа (Дёмина, 2007) соотношение его зон, ширина коры, объёмные и поверхностные плотности клеток, площади их компонентов и ядерно-цитоплазматическое отношение (Полина, 2009; Колдышева, 2008; Беляев и др., 2017; Солодкова и др., 2012; Юссеф, 2007). Из работ следует, что для оценки морфологических особенностей надпочечников можно использовать морфометрические, цитометрические и кариометрические показатели, т.к. объективным критерием оценки секреторной активности гормон-синтезирующих клеток является изменение (абсолютных) размеров, как частей надпочечника, так и его основных структурных компонентов (Беляев и др., 2017). В связи с этим нами использованы морфологические показатели, приведённые в таблице 3.

Таблица 3 – Измеренные показатели надпочечников крыс

| Первичные (измеренные) показатели | |
|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Площадь надпочечника, мкм ² | S _{общ} |
| Площадь мозгового вещества мкм ² | S _{МВ} |
| Общая площадь пучковой и сетчатой зон и мозгового вещества, мкм ² | S _(ПЗ+СЗ+МВ) |
| Общая площадь сетчатой зоны и мозгового вещества, мкм ² | S _(СЗ+МВ) |
| Площадь адренкортикоцитов, мкм ² | S _{кл} |
| Площадь ядер адренкортикоцитов, мкм ² | S _я |
| Максимальный диаметр ядра, мкм | D _{max} я |
| Минимальный диаметр ядра, мкм | D _{min} я |
| Вторичные (рассчитанные) показатели | |
| Площадь клубочковой зоны, мкм ² | S _{КЗ} = S _{общ} - S _(ПЗ+СЗ+МВ) |

| | |
|------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Площадь пучковой зоны, мкм ² | $S_{ПЗ} = S_{(ПЗ+СЗ+МВ)} - S_{(СЗ+М)}$ |
| Площадь сетчатой зоны, мкм ² | $S_{СЗ} = S_{(СЗ+МВ)} - S_{МВ}$ |
| Площадь коркового вещества, мкм ² | $S_{КВ} = S_{(ПЗ+СЗ+МВ)} - S_{МВ}$ |
| Относительная площадь мозгового вещества, % | $ОП\ КВ = (S_{МВ} / S_{общ}) \times 100$ |
| Относительная площадь коркового вещества, % | $ОП\ МВ = (S_{КВ} / S_{общ}) \times 100$ |
| Относительная площадь клубочковой зоны, % | $ОП\ КЗ = (S_{КЗ} / S_{общ}) \times 100$ |
| Относительная площадь пучковой зоны, % | $ОП\ ПЗ = (S_{ПЗ} / S_{общ}) \times 100$ |
| Относительная площадь сетчатой зоны, % | $ОП\ СЗ = (S_{СЗ} / S_{общ}) \times 100$ |
| Площадь цитоплазмы аденокортикоцитов, мкм | $S_{ц} = S_{кл} - S_{я}$ |
| Объём ядер аденокортикоцитов, мкм ³ | $V_{я} = 3,14 / 6 \times D_{max} \text{ я} \times D_{min} \text{ я}^2$ |
| Ядерно-цитоплазматическое отношение | $ЯЦО = S_{я} / S_{ц}$ |

Для оценки морфологического и функционального состояния яичников используют разные параметры. Так, в ряде работ в качестве наиболее информативных показателей состояния яичников использованы число фолликулов на разных стадиях вызревания и регрессии, жёлтых тел и кистозных образований, процент различных структур от суммарного числа всех генеративных объектов яичника (коэффициент вызревания), коэффициент регрессии, представляющий собой отношение суммы количества развивающихся фолликулов (первичных, вторичных и третичных) к числу атретических, количество фиброзной ткани, определенное методом точечного счета (Волков, 2014; Татарчук и др., 2015; Шкиль и др., 2016). Для оценки репродуктивной функции яичников также используются соотношение строма–паренхима, и изучается состояние сосудистого русла и развития сосудистой сети методом точечного счета или методом сопоставления площадей (Бессалова, 2006). В одной из других работ анализировали диаметр яичника и желтого тела, приняв их форму за сферу, с последующим расчетом объема и площади поверхности этих структур (Дорликар, 2013).

Из работ следует, что для оценки морфологических особенностей яичников можно использовать морфометрические и цитометрические показатели, т.к. объективным критерием оценки функциональной активности женской репродуктивной системы является изменение качественных и количественных характеристик основных структурных компонентов женских гонад (Бессалова, 2006).

В данной работе при выявлении использована следующая их классификация (Pedersen, Peters, 1968; Гунин, 2017):

- Примордиальный фолликул – ооцит, окруженный одним слоем уплощенных прегранулезных клеток.

- Первичный однослойный фолликул – ооцит, окруженный одним слоем кубовидных клеток гранулезы.
- Первичный многослойный фолликул – ооцит, окруженный несколькими слоями кубовидных клеток гранулезы.
- Вторичный фолликул – ооцит, окруженный более чем одним слоем гранулезных клеток, между которыми образуются полости.
- Третичный фолликул – ооцит, окруженный более, чем одним слоем гранулезных клеток и имеющим в центре антральную полость; фолликулярные клетки со всех сторон окружают ооцит; имеется сформированная тека.
- Граафов пузырьк – поздняя стадия третичного фолликула, ооцит окружен яйценосным бугорком.
- Атретический фолликул – фолликул, подвергающийся обратному развитию или атрезии, в таком фолликуле имеются признаки гибели ооцита (сморщенная блестящая оболочка, уменьшенный объем цитоплазмы и кариопикноз), происходит гибель фолликулярных клеток и уменьшение объема фолликулярной жидкости. Атретический фолликул со временем прорастает соединительной тканью (белое тело).
- Желтое тело – Полость овулировавшего фолликула, заполненная лютинизированными гранулезными клетками и пронизанная капиллярами.

В работе использованы такие морфофункциональные показатели яичников как число фолликулов разной степени зрелости (примордиальные, первичные, вторичные, третичные, атретические фолликулы, Граафов пузырьк), число желтых тел.

В данной работе на каждом 11-ом срезе вычисляли примордиальные и первичные однослойные фолликулы. Методика заключалась в следующем: сумму чисел на каждом 11-ом срезе с использованием поправочного коэффициента $7/9$ умножали на коэффициент 11. Для подсчета первичных многослойных, вторичных и атретических, а также Граафовых пузырьков, использовали каждый 5-ый срез. Сумму чисел на каждом 5-ом срезе умножили на 5 (Mandl, 1950). Желтые тела фиксировали в срединном срезе.

2.4. Определение содержания кортикостерона в сыворотке крови

В качестве информации, способствующей более полному анализу состояния надпочечников, привлечен дополнительный материал, а именно содержание кортикостерона в сыворотке крови, необходимое для установления возможного развития

стресса в организме экспериментальных возрастных животных. Измерение уровня кортикостерона осуществляли А. А. Гостюхина и А. В. Моисеева.

Для получения сыворотки у декапитированных животных собирали кровь в чистую сухую пробирку, затем центрифугировали без охлаждения при 2000 об./мин в течение 15-и мин. Полученную сыворотку собирали в пробирки «Eppendorf» и замораживали.

Образцы сыворотки размораживали и центрифугировали при 1000 об./мин в течение 2-х мин. Образцы с гемолизированной сывороткой исключали из дальнейшего анализа.

Содержание исследуемого гормона в сыворотке крови после размораживания определяли с помощью твердофазного иммуноферментного «сэндвич» метода (ELISA) (Егоров, 1991; Круглов, 2010). Процедуру выполнения иммуноферментного анализа проводили по инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем («IBL», Германия). Перед использованием все реагенты прогревались до комнатной температуры. Каждый флакон с реагентом аккуратно перемешивался, избегая образования пены.

Иммуноферментный анализ проводили с использованием поликлональных антител кортикостерона, нанесенных на внутреннюю поверхность полистирола в микротитровальных ячейках. В ячейки микропланшета добавляли по 100 мкл исследуемой сыворотки крови, стандартов кортикостерона с известными концентрациями и контрольного раствора из набора. Затем в каждую лунку вносили по 100 мкл ферментного конъюгата и инкубировалось 16-20 ч при 2-8 °С. После трехкратной автоматической промывки буфером в каждую ячейку добавляли по 200 мкл раствора субстрата с красителем и инкубировали при комнатной температуре. Через 30 мин раскапывалось по 50 мкл «стоп-реагента». Измерения проводились с помощью планшетного фотометра StatFax 303 Plus, (Awarenea Technology Inc, США) при длине волны 450 нм. Концентрацию гормона вычисляли по калибровочной кривой из прилагаемого набора (Егоров, 1991; Круглов, 2010).

2.5. Статистическая обработка данных

Статистический анализ результатов выполнен с помощью пакета программ Statistica 8.0 (StatSoft, США). При обработке результатов проверяли группы на нормальность распределения исследуемого признака с помощью критерия Шапиро–Уилка. Рассчитаны следующие описательные статистики: среднее (\bar{x}), минимум (min) и максимум (max), стандартное отклонение (σ), стандартная ошибка среднего ($m_{\bar{x}}$), коэффициент вариации (Cv), уровень значимости (p). Сравнение независимых выборок проводили с использованием t -критерия Стьюдента или критерия Манна–Уитни в зависимости от

характера распределения вариационных рядов. При проверке статистических гипотез достоверным считали уровень значимости менее или равен 5% ($p \leq 0,05$).

2.6. Авторский вклад

Личный вклад автора включал участие в выведении и проведении вскрытия экспериментальных животных, проведение всех этапов гистологического анализа (фиксация органов, проводка в спиртах, с последующим заключением их в парафиновые блоки, изготовление и окрашивание срезов, заключение препаратов в монтирующую среду, морфометрические измерения), статистическую обработку, интерпретацию экспериментальных данных.

Содержание экспериментальных животных в виварии, инъекирование фармакологическим препаратом «Мексидол» и измерение уровня кортикостерона осуществляли А. А. Гостюхина и А. В. Моисеева. Результаты этих измерений любезно предоставлены авторами и использованы для интерпретации результатов гистологического анализа с целью получения наиболее полной картины.

3. Результаты и их обсуждение

3.1. Гистологическая характеристика надпочечников крыс в позднем онтогенезе под воздействием этилметилгидроксипиридина сукцината

Оценку морфологических особенностей надпочечников проводили с использованием ряда показателей: морфометрических (рисунки 7, 8), цитометрических и кариометрических (рисунок 9). Рассчитаны соотношения площадей мозгового и коркового веществ, зон коры надпочечника (клубочковая, пучковая, сетчатая), площадь цитоплазмы и объем ядер адренокортикоцитов, ядерно-цитоплазматическое отношение.

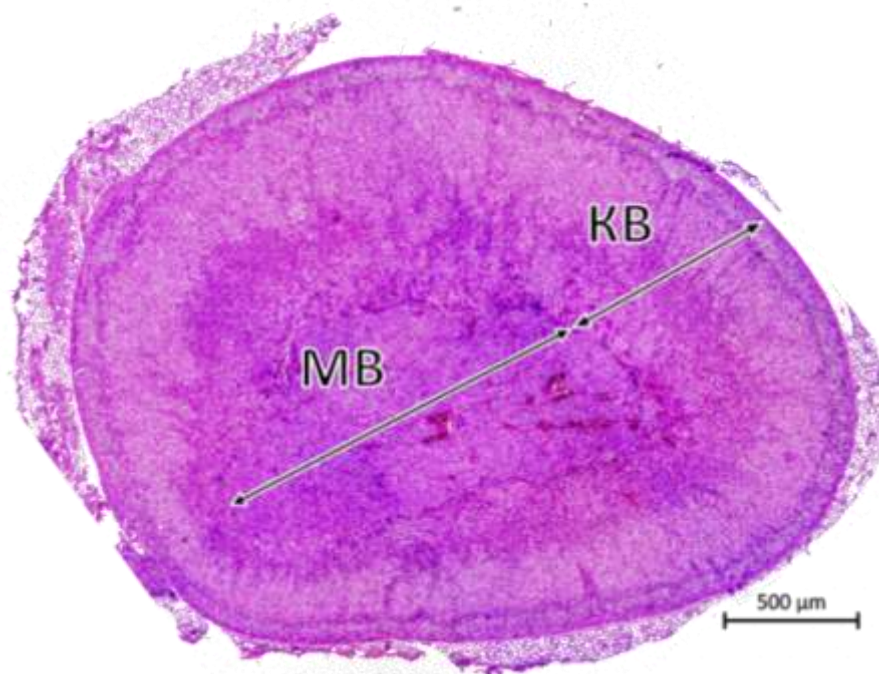


Рисунок 7 – Продольный срез надпочечника крыс линии «Wistar» (опытная группа).

Гематоксилин Майера – эозин. Фото автора

Примечание: MB – мозговое вещество, KB – Корковое вещество.

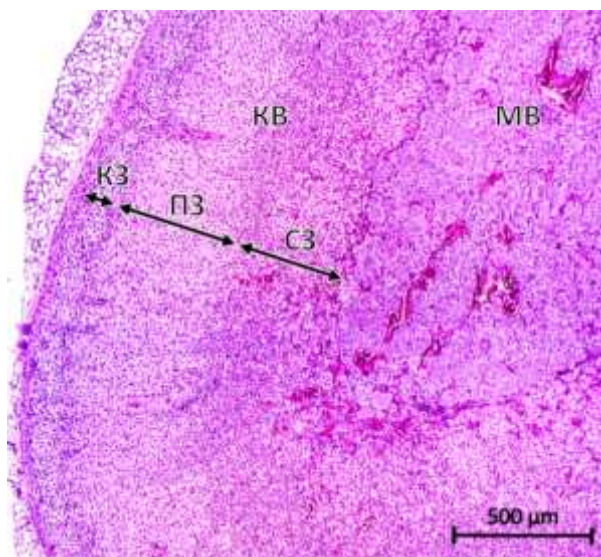


Рисунок 8 – Микроструктура коры надпочечника крыс линии «Wistar» (опытная группа).

Гематоксилин Майера – эозин. Фото автора

Примечание: МВ – мозговое вещество, КВ – корковое вещество, КЗ – клубочковая зона, ПЗ – пучковая зона, СЗ – сетчатая зона.

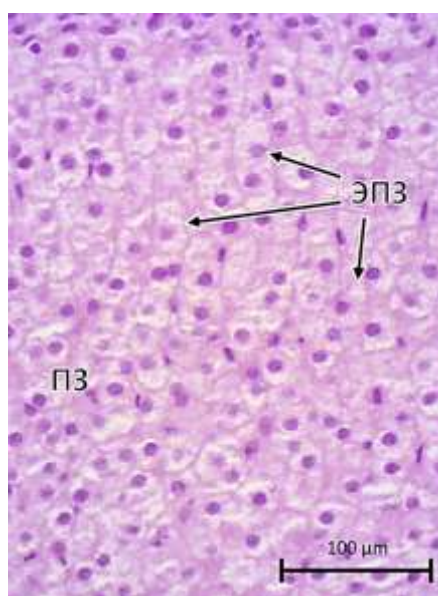


Рисунок 9 – Микроструктура пучковой зоны коры надпочечника крыс линии «Wistar»

(опытная группа). Гематоксилин Майера – эозин. Фото автора

Примечание: ПЗ – пучковая зона, ЭПЗ – эндокриноциты пучковой зоны.

Вышеперечисленные параметры выбраны в связи с тем, что изменение (абсолютных) размеров, как частей надпочечника, так и его основных структурных компонентов является объективным критерием оценки секреторной активности гормон-синтезирующих клеток (Беляев и др., 2017) (таблица 3).

Относительная площадь мозгового и коркового веществ. Животные экспериментальной группы по показателям относительной площади как мозгового, так и коркового веществ надпочечников не отличались от животных интактной группы (Тест Манна–Уитни: $Z = -0,44$ и $0,44$ соответственно; $p > 0,05$) (рисунок 10; таблица Г.1).

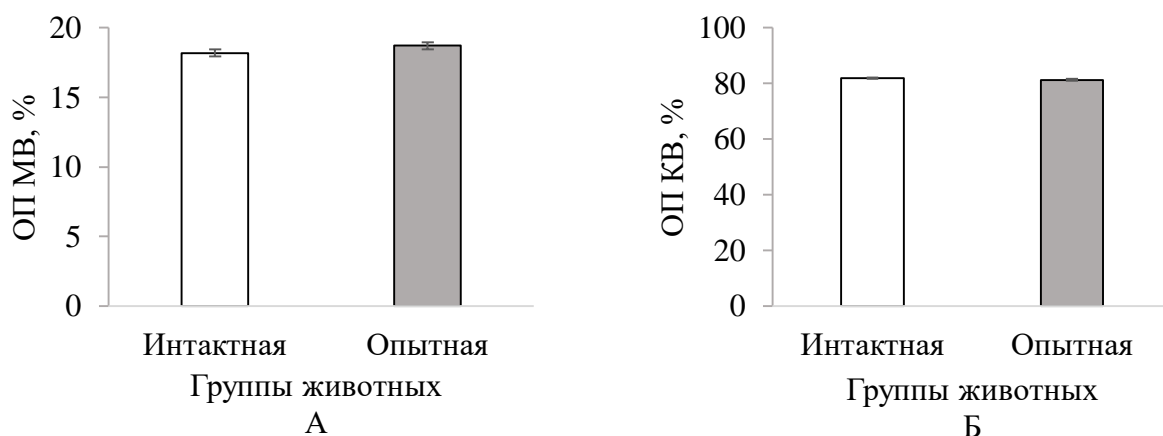


Рисунок 10 – Относительные площади мозгового вещества (А) и коркового вещества (Б) коры надпочечников крыс интактной и опытной групп

Относительная площадь клубочковой зоны. Как и в случае с предыдущим параметром, достоверных различий по размерам клубочковой зоны надпочечников между исследуемыми группами не выявлено (Тест Манна–Уитни: $Z = -1,18$; $p > 0,05$) (рисунок 11, таблица Г. 2.).

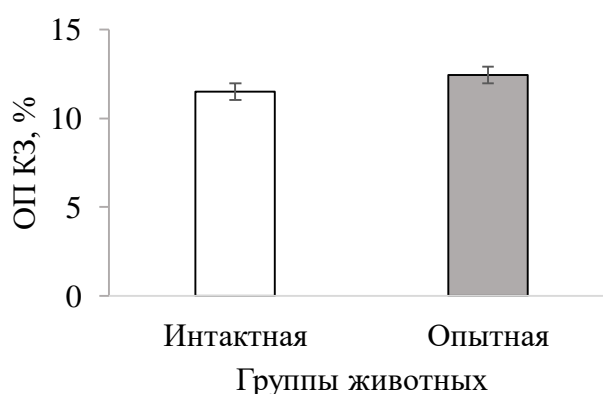


Рисунок 11 – Относительные площади клубочковой зоны коры надпочечников крыс интактной и опытной групп

Относительная площадь пучковой и сетчатой зон. Морфометрический анализ выявил разнонаправленные изменения показателей пучковой и сетчатой зон надпочечников у крыс исследуемых групп. У крыс интактной группы относительная площадь пучковой зоны оказалась больше (Тест Манна–Уитни: $Z = 2,44$; $p < 0,05$), тогда как относительная площадь сетчатой зоны, напротив, – меньше в сравнении с опытной группой (Тест Манна–Уитни: $Z = -2,00$; $p < 0,05$) (рисунок 12; таблица Г. 2).

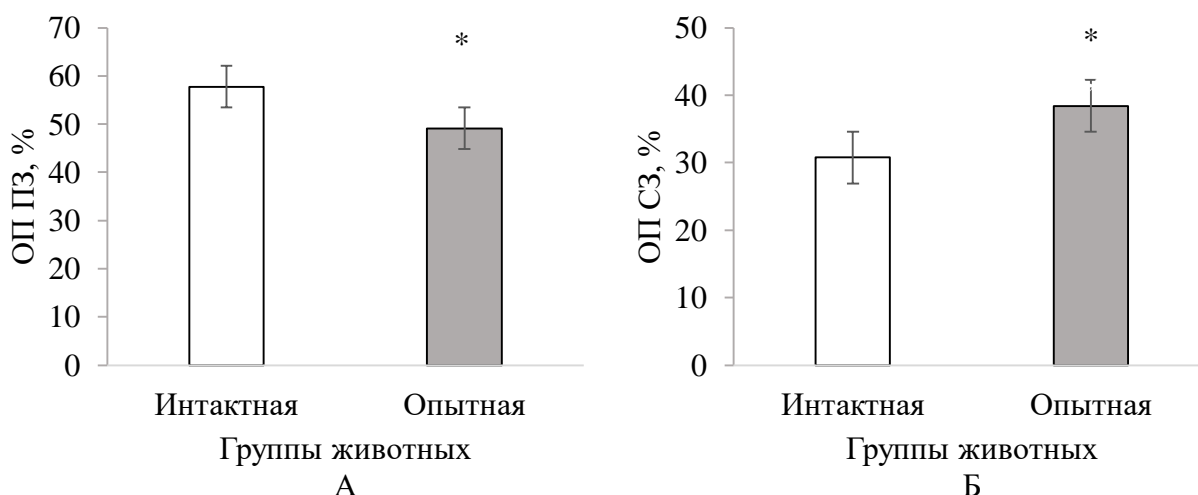


Рисунок 12 – Относительные площади пучковой зоны (А) и сетчатой зоны (Б) коры надпочечников крыс интактной и опытной групп

Примечание: * – $p < 0,05$ – уровень статистической значимости между интактной и опытной групп

Морфологические показатели адренокортикоцитов пучковой зоны. Данные морфометрии свидетельствуют о том, что в опытной группе, получавшей «Мексидол», происходит достоверное уменьшение площади адренокортикоцитов ($t_{st} = -3,60$; $p < 0,05$), площади цитоплазмы адренокортикоцитов ($t_{st} = -3,15$; $p < 0,05$), объема ($t_{st} = -9,80$; $p < 0,05$) и, соответственно, площади ядер адренокортикоцитов ($t_{st} = -5,66$; $p < 0,05$) надпочечников сравнению с аналогичными параметрами адренокортикоцитов надпочечников интактной группы (рисунок 13, 14; таблица Г. 3.).

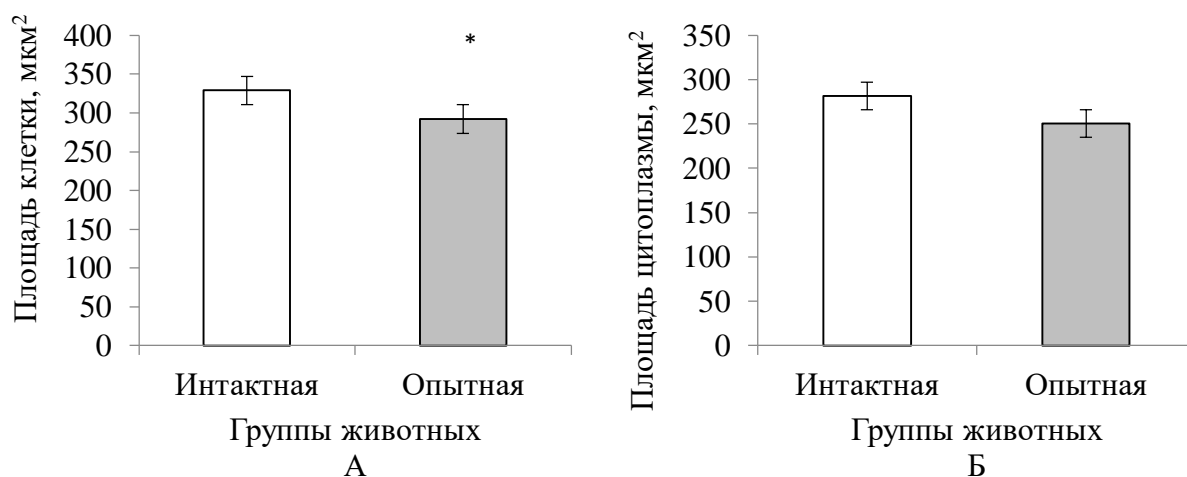


Рисунок 13 – Площади клетки (А) и цитоплазмы клетки (Б) пучковой зоны коры надпочечников крыс интактной и опытной групп

Примечание: * – $p < 0,05$ – уровень статистической значимости между интактной и опытной групп

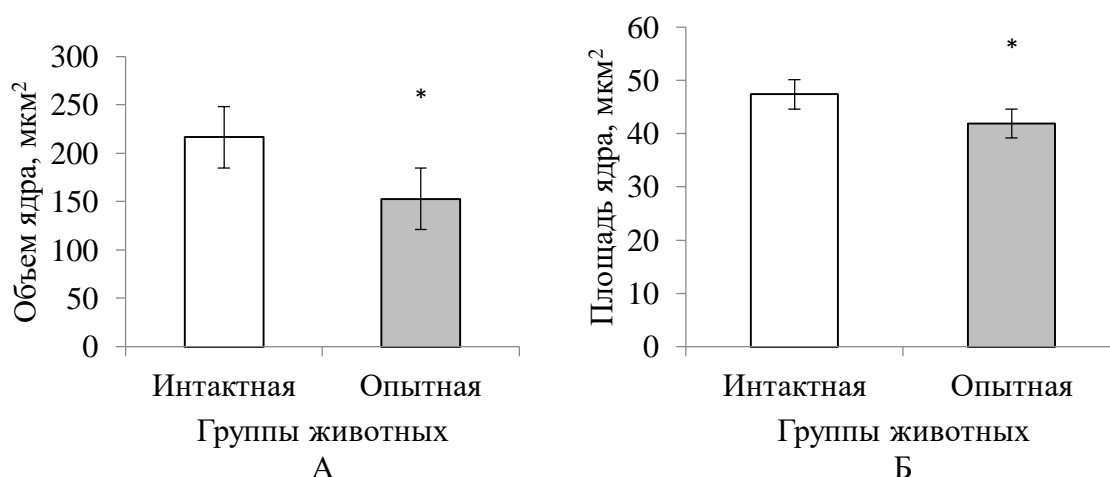


Рисунок 14 – Объем ядра клетки (А) и площадь ядра клетки (Б) пучковой зоны коры надпочечников крыс интактной и опытной групп

Примечание: * – $p < 0,05$ – уровень статистической значимости между интактной и опытной групп

Ядерно-цитоплазматическое отношение адренокортикоцитов пучковой зоны. Животные экспериментальной группы по показателю ядерно-цитоплазматического отношения адренокортикоцитов надпочечников не отличались от животных интактной группы ($t_{st} = -0,46$; $p > 0,05$) (рисунок 15; таблица Г. 3).

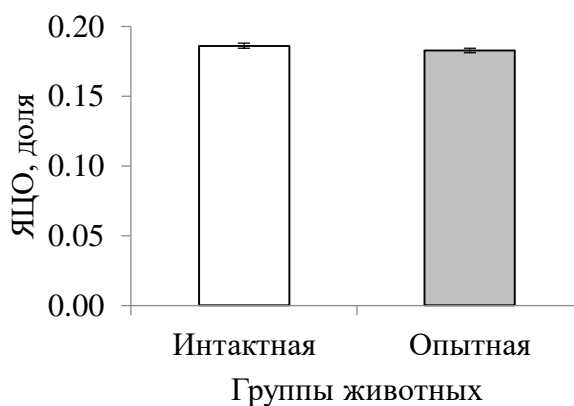


Рисунок 15 – Ядерно-цитоплазматическое отношение адренкортикоцитов пучковой зоны коры надпочечников крыс интактной и опытной групп

Уровень кортикостерона. Для более полного анализа полученных результатов по особенностям морфологии надпочечников в исследованных группах проведено их сравнение с уровнем кортикостерона, продуцируемого адренкортикоцитами, в сыворотке крови исследуемых животных. У крыс опытной группы, получавших «Мексидол» в виде инъекций, уровень кортикостерона был в 2,8 раз меньше по сравнению с аналогичным показателем интактных животных (Тест Манна-Уитни: $Z = 1,28$; $p > 0,05$) (рисунок 16; таблица Д.).

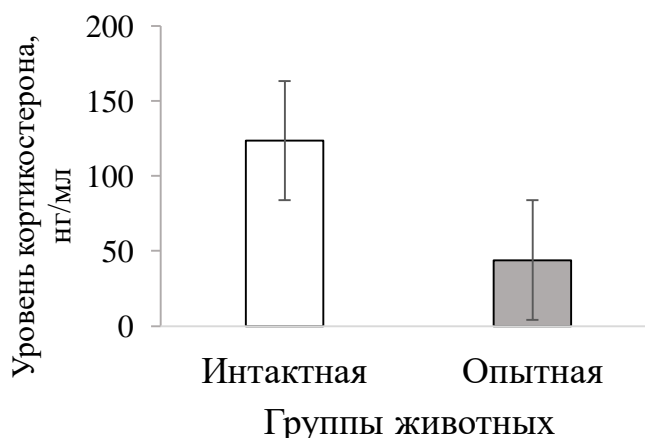


Рисунок 16 – Уровень кортикостерона (нг/мл) в сыворотке крови интактных и опытных крыс

Гипертрофия надпочечников, осуществляемая за счет увеличения паренхиматозной массы коркового вещества, преимущественно за счет пучковой зоны, занимает центральное место в изменениях, происходящих при хроническом стрессе (здесь, при

окислительном стрессе) на структурном уровне (Солодкова и др., 2012). Так, например, в работе инициалы Семенчука и др. (2018) выявлена связь между увеличением ширины пучковой зоны и увеличением площади и ядер адренокортикоцитов этой зоны, что может свидетельствовать об участии клеток в увеличении пучковой зоны коры надпочечников.

Бóльшие размеры сетчатой зоны в надпочечниках крыс опытной группы в сравнении с интактными животными могут быть связаны с изменением размеров клеток, трансформацией русла кровеносных сосудов, что может говорить об увеличении активности секреторных процессов в клетках данной зоны (Овчаренко и др., 2014; Беляев и др., 2017).

Известно, что преобразование размеров клеток и их структурных элементов указывает на изменение секреторной активности первых (Солодкова и др., 2012). При этом уменьшение объёма цитоплазмы связано с сокращением в ней количества гормон-продуцирующих ультраструктур, уменьшение объёма ядра – со снижением интенсивности экспрессии генов, что характерно для периода ухудшения секреторной активности клеток (Бузуева и др., 2007; Солодкова и др., 2012). На наличие аналогичных тенденций указывают цитоморфологические особенности адренокортикоцитов надпочечников возрастных крыс, получавших препарат «Мексидол», что не наблюдалось в интактной группе. Отсутствие значимых различий между группами по ядерно-цитоплазматическому отношению адренокортикоцитов (рисунок 15; таблица Г. 3.), вероятно, свидетельствует о пропорциональных изменениях как объёма цитоплазмы, так и объёма ядер клетки.

Общеизвестна огромная роль гормонов коры надпочечников в становлении и сохранении гомеостаза, а также их значение для адаптации организма при изменении состояния его внутренней и внешней среды. Кортикостерон является основным представителем гормонов группы глюкокортикоидов у крыс, и нарушение его синтеза оказывает глубокое влияние на приспособленность организма (Полина, 2009).

Известно, что по мере старения крыс, уровень секреции кортикостерона в кровь снижается. Эти данные согласуются со снижением относительной массы самих надпочечников. Существуют сведения о том, что изменение уровня гормонов в крови может отражать как варьирование скорости секреции, так и синтеза гормонов за счет модификации доступности холестерина к месту синтеза гормонов или за счет изменения активности ферментов, участвующих в синтезе (Мельниченко, 1997).

Меньший уровень кортикостерона в сыворотке крови интактных животных подтверждает полученные нами результаты морфологического анализа надпочечников. В опытной группе, получавшей препарат «Мексидол», отмечается меньшая концентрация

кортикостерона в плазме, меньшие объёмы цитоплазмы и ядра продуцирующих его адренкортикоцитов по сравнению с интактной группой. Всё это в целом указывает на снижение активности адренкортикоцитов, направленной на секрецию данного гормона. У интактных животных, адренкортикоциты которых продуцируют больше гормона, наблюдаются большие размеры ядер и цитоплазмы, и как следствие – больший объём всей пучковой зоны надпочечника в сравнении с опытной группой. При этом известно, что кортикостерон оказывает ингибирующее влияние на стероидогенез половых гормонов в сетчатой зоне коры надпочечников (Благосклонная и др., 2017), вероятно, это является причиной уменьшения её размеров в надпочечниках у интактных животных.

Таким образом, как на основании морфологических особенностей надпочечников, так и уровня кортикостерона, можно отметить меньшую активность данных желёз у животных, получавших препарат «Мексидол», в сравнении с интактной группой. Вероятно, наблюдаемые морфофизиологические изменения надпочечников при использовании фармакологической терапии связаны с уменьшением выраженности стресс-реакции у опытных животных, в том числе в результате подавления окислительных процессов в организме в целом при применении «Мексидола», обладающего антиоксидантными и стресс-протекторными свойствами (Воронина, 2016; Замощина и др., 2018).

3.2. Гистологическая характеристика яичников крыс в позднем онтогенезе под воздействием этилметилгидроксипиридина сукцината

Одной из важнейших характеристик, отражающих состояние яичника, является соотношение в нём типов фолликулов. Показано, что их соотношение – зависящая от возраста характеристика. В связи с этим для оценки состояния яичников в работе использован подсчёт числа фолликулов: примордиальных, первичных однослойных, первичных многослойных, вторичных многослойных и третичных (Граафовых пузырьков), а также атретических и желтых тел (Волков, 2014; Татарчук и др., 2015; Шкиль и др., 2016) (рис. 16).

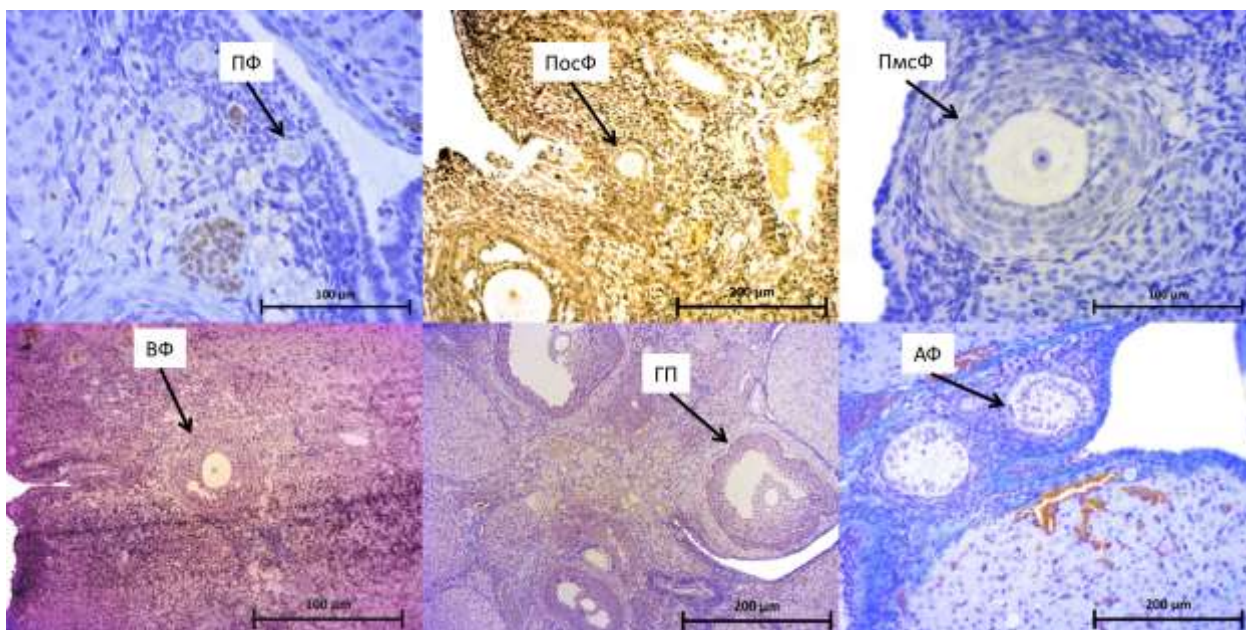


Рисунок 16 – Типы фолликулов яичника серых крыс (*Rattus norvegicus*). Окраска по Ван-Гизону и модифицированным азаном. Фото автора

Примечание: ПФ – примордиальный фолликул, ПосФ – первичный однослойный фолликул, ПмсФ – первичный многослойный фолликул, ВФ – вторичный фолликул, ГП – Граафов пузырек, АФ – атретический фолликул.

Влияние фармакологической терапии на морфологические показатели яичника. Животные экспериментальной группы по таким количественным показателям яичника, как примордиальные фолликулы ($t_{st} = -0,76; p > 0,05$), Граафовы пузырьки ($t_{st} = -0,40; p > 0,05$), атретические фолликулы ($t_{st} = 2,14; p > 0,05$) и желтые тела ($t_{st} = -1,00; p > 0,05$), статистически не отличались от животных интактной группы (рисунок 17; таблица Е).

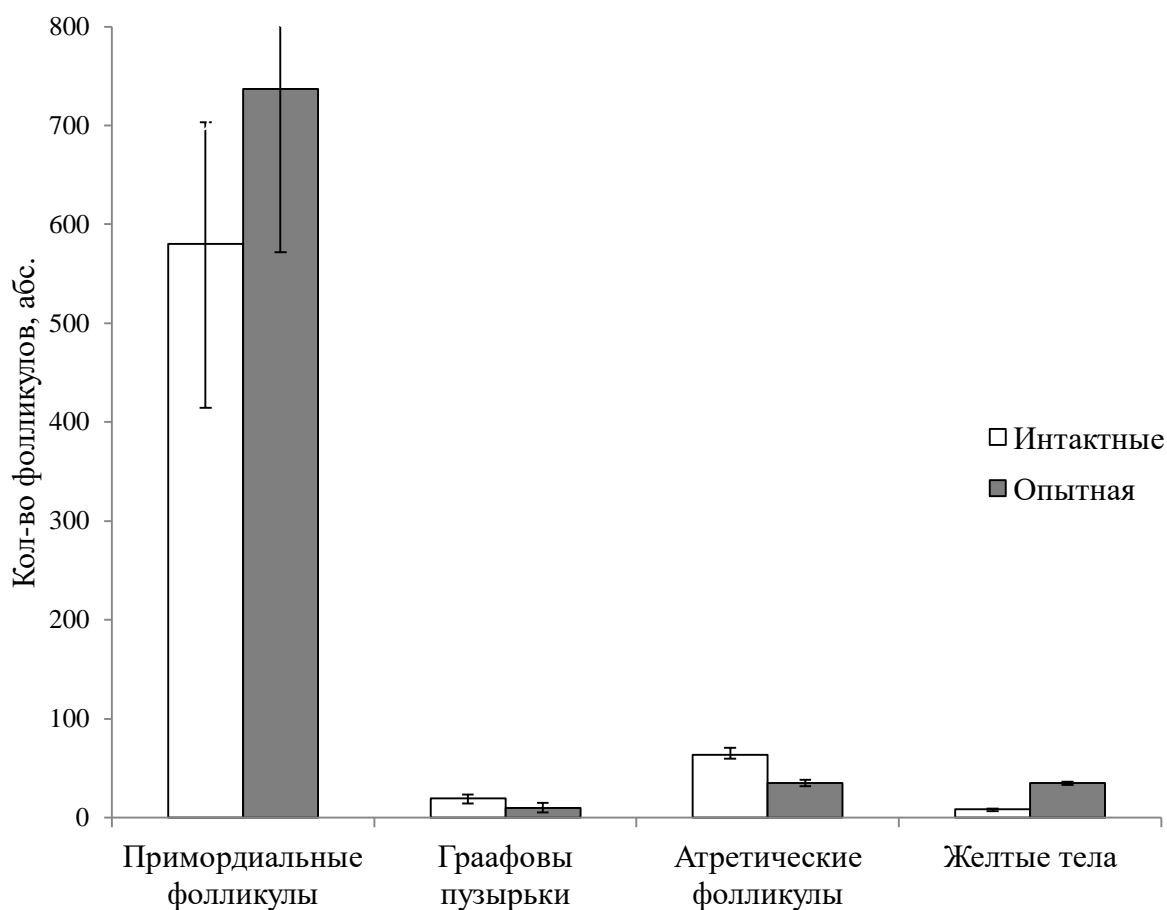


Рисунок 17 – Количество примордиальных фолликулов, Граафовых пузырьков, атретических фолликулов желтых тел (абс.) в яичниках возрастных крыс линии «Wistar» при применении этилметилгидроксипиридина сукцината (опытные) и без воздействия (интактные)

Примечание: данные параметры объединены в одной диаграмме, т. к их значения статистически незначимые.

Выявлено, что в опытной группе, получавшей «этилметилгидроксипиридина сукцинат», происходит достоверное увеличение числа первичных (I) однослойных ($t_{st} = -2,58; p < 0,05$), первичных (I) многослойных ($t_{st} = -3,14; p < 0,05$) и вторичных (II) многослойных ($t_{st} = -2,65; p < 0,05$) фолликулов яичников по сравнению с таковыми яичников интактной группы (рисунок 18; таблица Е.).

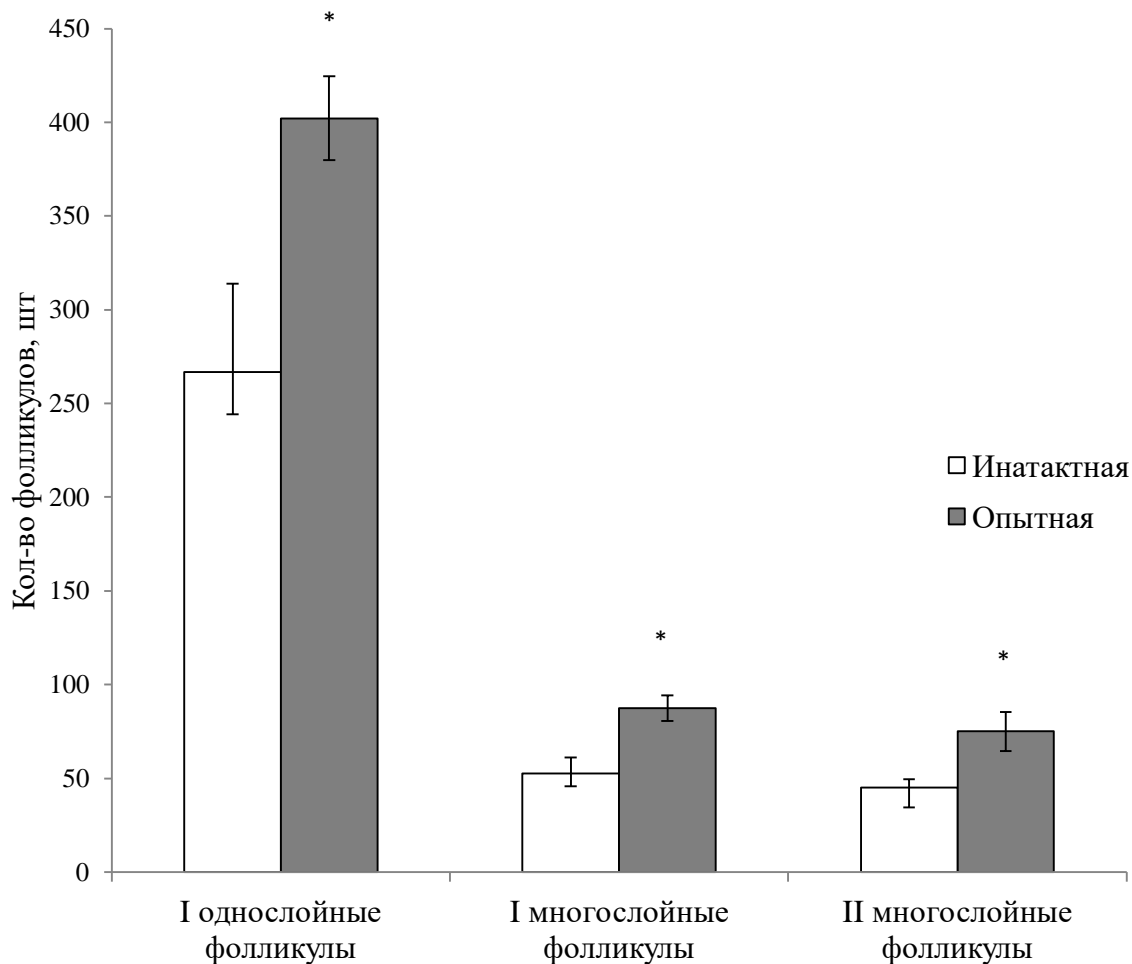


Рисунок 18 – Количество фолликулов разной степени зрелости яичников возрастных крыс линии «Wistar» при применении этилметилгидроксипиридина сукцината (опытные) и без воздействия (интактные).

Примечание: данные параметры объединены в одной диаграмме, т.к их значения статистически значимые; * – $p < 0,05$ – уровень статистической значимости между интактной и опытной групп

При анализе количественного соотношения фолликулов разной степени зрелости выявлены определенные особенности. У животных с фармакологической терапией и без воздействия доминируют примордиальные фолликулы, доля которых составляет 53,3% и 56%, соответственно. Примерно в 2 раза меньше первичных однослойных фолликулов. У опытных крыс их количество равно 29,1%, у интактных – 25,7%. Уровни процентного соотношения последующих групп фолликулов у исследуемых животных расходятся. В опытной группе следующими по численности являются первичные многослойные фолликулы, доля которых равна 6,3%, а в интактной группе – атретические фолликулы, с долей 6,1%. Четвертыми, по количеству в опытной группе являются вторичные многослойные с долей 5,4%, а у интактной группы – первичные однослойные (5%). У

опытной группы далее следуют желтые тела и атретические фолликулы с одинаковыми долями 2,5%, у интактных крыс – вторичные многослойные с долей 4,3%. Следующими как в опытной, так и в интактной группе по численности являются Граафовы пузырьки, на долю которых приходится 0,7% и 1,8%, соответственно. В группе животных без воздействия завершающей группой фолликулов являются желтые тела, численность которых измеряется в 0,8%.

Влияние проведенной фармакологической терапии, в данной ситуации, можно рассматривать с разных сторон. Это связано с тем, что этилметилгидроксипиридина сукцинат обладает неспецифичностью и, в большей мере, множественностью действий.

Первый предполагаемый путь действия препарата связан со способностью оказывать влияние на регуляцию растущих фолликулов (овариальный резерв организма).

Известно, что в процессе дифференцировки примордиальных фолликулов, его гранулезными клетками продуцируется антимюллеровский гормон (АМГ), также известный как ингибирующее вещество Мюллера. В его функции входит подавление роста соседних примордиальных фолликулов, а также уменьшение чувствительности растущих фолликулов к действию ФСГ. Его синтез продолжается до тех пор, пока фолликулы не достигнут стадии вторичного многослойного фолликула. Как только они дифференцируются в Граафовы пузырьки, синтез АМГ прекращается. При уменьшении количества антральных фолликулов с возрастом уровень АМГ в сыворотке крови также снижается. Существуют расхожие утверждения об источнике наибольшей продукции АМГ. Разногласия построены между растущими фолликулами и зрелыми (Граафовыми пузырьками) (Broekmans et al., 2009).

Эксперименты Боярского (2009) на грызунах, с выключенной функцией АМГ, показали, что у таких животных скорость дифференцировки примордиальных фолликулов в число растущих фолликулов увеличена, следовательно, АМГ может защищать примордиальные фолликулы от дифференцировки из покоящегося состояния (стадия примордиального фолликула) (Боярский, 2009). На наличие противоположной тенденции указывают количественные особенности яичников возрастных крыс, получавших препарат «Мексидол». Вероятно, большее количество растущих преантральных фолликулов у опытной группы связано с инактивацией синтеза АМГ.

С другой стороны, препарат этилметилгидроксипиридина сукцинат мог оказать влияние на механизм передачи гонадотропных гормонов. Например, повысить чувствительность растущих фолликулов на ФСГ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При гистологическом исследовании надпочечников крыс, получавших этилметилгидроксипиридина сукцинат, по сравнению с интактными, выявлена гипотрофия коркового вещества за счет уменьшения пучковой зоны. Такое изменение ширины пучковой зоны происходит за счет уменьшения площади ядер и самих адренкортикоцитов этой зоны. Сетчатая зона в надпочечниках крыс опытной группы в сравнении с интактными животными, отличается большими размерами. Уровень кортикостерона в сыворотке крови животных, получавшей препарат «Мексидол», меньше, по сравнению с интактной группой.

При гистологическом исследовании яичников крыс было установлено, что у крыс опытной группы количество растущих, а именно первичных однослойных, первичных многослойных и вторичных многослойных фолликул, больше в сравнении с интактной группой животных.

В связи с неспецифичностью и множественностью оказываемых действий этилметилгидроксипиридина сукцината наблюдаемые изменения надпочечников и яичников можно объяснить несколькими вариантами.

Во-первых, на фоне приема препарата, возможно, произошло изменение рецепторных комплексов мембран мозга, что, вероятно, привело к повышению качества передачи нейрогуморальных сигналов. Но поскольку не осуществлялся и не предвидится анализ состояния гипофиза, точно утверждать мы не можем.

Во-вторых, воздействие препарата на стресс-реализующую и репродуктивную системы может быть связано с непосредственным влиянием этилметилгидроксипиридина сукцината на мембранные комплексы клеток надпочечников и яичников.

Третья причина изменений надпочечника и яичника может быть связана с комплексным воздействием «Мексидола» на организменном уровне. Это, в свою очередь, могло бы повлиять на состояние исследуемых желез.

Помимо предполагаемых перечисленных причин наблюдаемых эффектов воздействия препарата существует ряд других.

ВЫВОДЫ

1. Анализ морфологических параметров надпочечников экспериментальных крыс показал статистически значимые различия, выраженные в уменьшении пучковой зоны и увеличении сетчатой зоны коры надпочечников опытной группы по сравнению с группой животных без воздействия ($p < 0,05$). Значимые различия по параметрам относительных площадей мозгового, коркового веществ и клубочковой зоны между исследуемыми группами животных не выявлены ($p > 0,05$).

2. По параметрам адренокортикоцитов были выявлены статистически значимые отличия по площади клеток, площади цитоплазмы клеток, площади и объему ядер клеток пучковой зоны, выраженные в уменьшении их размеров в опытной группе относительно интактной ($p < 0,05$). По параметру ядерно-цитоплазматического отношения статистически значимые различия не выявлены ($p > 0,05$).

3. Статистически значимые изменения морфологических параметров надпочечников животных опытной группы, проявляющиеся в уменьшении размеров пучковой и увеличении размеров сетчатой зон коры, соответствуют не статистически значимому уменьшению уровня кортикостерона в плазме крови в сравнении с интактной группой ($p > 0,05$).

4. Соотношение овариальных фолликулов выявил следующую тенденцию. В двух исследуемых группах более чем на половину приходится примордиальных фолликулов, также приблизительно четверть всех имеющихся фолликулов занимают первичные однослойные фолликулы. У животных опытной группы далее, в порядке уменьшения количества фолликулов, располагаются первичные и вторичные многослойные фолликулы, желтые и атретические тела, Граафовы пузырьки. У интактных животных – атретические, первичные и вторичные многослойные, Граафовы пузырьки и желтые тела. Анализ морфологических параметров яичника экспериментальных крыс показал статистически значимые различия, выраженные в большем количестве первичных однослойных, первичных многослойных и вторичных многослойных фолликулов опытной группы по сравнению с группой животных без воздействия ($p < 0,05$). Значимые различия по параметрам примордиальных, атретических фолликулов, Граафовых пузырьков и желтых тел между исследуемыми группами животных не выявлены ($p > 0,05$).

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Возрастные морфологические изменения органов женской половой системы / Ю. Д. Алексеев [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 4. – С. 51–51.
2. Анисимов, В. Н. Эволюция концепций в геронтологии / В. Н. Анисимов, М. В. Соловьев. – СПб.: Эскулап, 1999. – 130 с.
3. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения // СПб. Наука – 2008. – Т. 1. – 468 с.
4. Баранов В.С. Генетические аспекты старения / В.С. Баранов, Е.В. Баранова // Успехи геронтологии – 2007. – Т. 20, № 2. – С. 26–34.
5. Басенко С. Н. Взаимодействие яичников и надпочечников у крыс в регуляции адаптационного ответа на стресс: автореф. дис. канд. мед. наук: / С. Н. Басенко. – Ставрополь, 1999. – 189 с.
6. Морфофункциональная характеристика надпочечников самок крыс в условиях адаптации к интенсивным мышечным нагрузкам и приема сывороточных белков / Н. Г. Беляев [и др.] // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2017. – Т. 12, вып. 4. – С. 435–439.
7. Белик И. А. Гистологическое строение надпочечных желез интактных половозрелых крыс // Український медичний альманах. – 2011. – Т. 14, № 1. – С. 28–30.
8. Бессалова Е. Ю. Половые и сезонные отличия поведения крыс в «Открытом поле» // Мир медицины и биологии. – 2011. – Т. 7, № 4. – С. 12–16.
9. Виленчик М. М. Нестабильность ДНК и отделенные последствия воздействия облучения. – М. : Энергоатомиздат, 1987. – 192 с.
10. Волков В. П. Возрастная динамика количественных морфологических параметров ткани яичников // Инновации в науке. – 2014. – Т. 2, № 31. – С. 98–105.
11. Воронина Т. А. Антиоксидант «Мексидол». Основные нейропсихотропные эффекты и механизм действия // Психофармакология и биологическая наркология. – 2001. – Т. 1, № 1. – С. 2–12.
12. Воронина Т.А. «Мексидол»: спектр фармакологических эффектов // Журнал неврологии и психиатрии. – 2012. – Т. 12. – С. 86–90.
13. Воронина Т.А. Пионер антиоксидантной нейропротекции. 20 лет в клинической практике. // Русский медицинский журнал. – 2016. – Т. 24, вып. 7.– С. 434–438.

14. Гамбарян П. П. Крыса / П. П. Гамбарян, Н. М. Дукельская. – М. : Советская Наука, 1955. – 194 с.
15. Голиченков В. А. Эмбриология: учебник для университетов по биологическим специальностям / В. А. Голиченков, Е. А. Иванов, Е. Н. Никерясова. – М. : Академия, 2004. – 219 с.
16. Гунин А. Г. Гистология в схемах и таблицах: учебное пособие / А. Г. Гунин. – М. : Практическая медицина, 2016. – 224 с.
17. Горбатюк С. М. Возрастные стромально-паренхиматозные перестройки яичников белых крыс // Таврический медико-биологический вестник. – 2013. – Т. 16, № 1. – С. 71–73.
18. ГОСТ 34088-2017. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за сельскохозяйственными животными; введ. 2018–01–08. – М.: Стандартиформ, 2018. – 28 с.
19. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении / Донцов В. И. [и др.] // Труды института системного анализа российской академии наук. – 2006. – Т. 19. – С. 50–69.
20. Дёмина Л. Л. Морфофункциональные изменения в организме мелких млекопитающих в условиях техногенного воздействия (на примере Оренбургского газоперерабатывающего завода) / Л. Л. Дёмина, Д. А. Боков // Вестник Оренбургского государственного педагогического университета. Электронный научный журнал. – 2007. – № 2. – С. 30–35.
21. Думитру И. Физиология и патофизиология воспроизводства человека / И. Думитру, М. Ротару, И. Теодореску. – Бухарест : Медицинское издательство, 1981. – С. 211–215.
22. Теория и практика иммуноферментного анализа / А. М. Егоров [и др.]. – М. : Высшая школа, 1991. – 288 с.
23. Влияние «Мексидола» на физическую работоспособность и уровень лактата в крови крыс в условиях световых десинхронозов / Т.А. Замошина [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2018. – № 11. – С. 82–86.
24. Перспективы митохондриальной медицины / Зоров Д. Б. [и др.] // Биохимия. – 2013. – Т. 78, № 9. – С. 1251–1264.
25. Ультраструктура секреторных клеток надпочечников кроликов / Казимирко Н.В. [и др.] // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2012. – Т. 7, № 2. – С. 47–54.
26. Кожевников Ю. Н. О перекисном окислении липидов в норме и патологии (обзор) // Вопросы медицинской химии. – 1985. – Т. 31, № 5. – С. 2–7.

27. Колдышева Е.В. Морфологическая характеристика коры надпочечников крыс OXYS в онтогенезе // Бюллетень СО РАМН. – 2008. – № 6. – С. 131–138.
28. . Зависимость массы тела от возраста для беспородных белых и восьми линий лабораторных крыс: синтетические исследования данных из экспериментальных работ и питомников в аспекте связи с радиочувствительностью. Некоторые характеристики вида «крыса» / Котеров А. Н. [и др.] // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2018. – Т. 63, № 2. – С. 15–17.
29. Основы метода иммуноферментного анализа. [учеб. пособие для студентов лечебного факультета] / Круглов С. В., Малышев И. Ю. – ГОУ ВПО Московский Государственный Медико-Стоматологический ун-т, 2010. – 58 с.
30. Мартусевич А. К., Карузин К. А. Оксидативный стресс и его роль в формировании дизадаптации и патологии / А. К. Мартусевич, К. А. Карузин // Биорадикалы и антиоксиданты. – 2015. – Т. 2, № 2. – С. 5–18.
31. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А.Н. Миронов [и др.] / Ч. 1. М.: Гриф и К., 2012.– 944 с.
32. Наволоцкая Е. В. Октарфин–неопиоидный пептид опиоидного происхождения // Биоорганическая химия. – 2015. – Т. 41, № 5. – С. 524–524.
33. Новиков В. Е., Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки, и их фармакологическая регуляция / В. Е. Новиков, О. С. Левченкова, Е. В. Пожилова // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014. – Т. 12, № 4. – С. 13–21.
34. Перчик О. А. Влияние препаратов плаценты на морфофункциональное состояние органов и тканей старых крыс / О. А. Перчик, В. В. Волина // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2006. – Т.16, № 3. – С. 341–347.
35. Полина Ю. В. Влияние различных частотных режимов низкоинтенсивного электромагнитного излучения и стресса на морфофункциональное состояние надпочечников: автореф. дис. канд. мед. наук: / Ю. В. Полина. – Волгоград, 2009. – 19 с.
36. Розен В. Б. Основы эндокринологии / В. Б. Розен. – М. : Изд-во Московского университета, 1994. – 385 с.
37. Оценка эффективности «Мексидола» в лечении экспериментального гингивита (слепое контролируемое исследование) / В. А. Румянцев [и др.] // Верхневолжский медицинский журнал. – 2013. – Т. 11, № 1. – С. 21–24.
38. Серов В. Н. Гинекологическая эндокринология / В. Н. Серов, В. Н. Прилепская, Т. В. Овсянникова. – М : МЕДпресс-информ, 2004. – 528 с.

39. Скулачев В. П. Кислород в живой клетке: добро и зло // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – Т. 3. – С. 4–10.
40. Солодкова О. А. Влияние экстракта Кукумарии японской на структуру надпочечников белых крыс при холодовом стрессе / О. А. Солодкова, В. Г. Зенкина, В. С. Каредина // Фундаментальные исследования. – 2012. – Т. 2, № 8. – С. 419–423.
41. Морфологические особенности яичников крыс при экспериментальном D3-гиповитаминозе / Т. Ф. Татарчук [и др.] // Здоровье женщины. – 2015. – № 1. – С. 195–198.
42. Трегубова Н. В., Исмаилов И. С. Возрастные изменения прооксидантно-антиоксидантного баланса при оксидативном стрессе / Н. В. Трегубова, И. С. Исмаилов // Вестник АПК Ставрополя. – 2012. – № 3. – С. 142–148. Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система). Выпуск XVIII. / Сер. Библиотека Российского национального конгресса «Человека и лекарство» / отв. ред. А. Г. Чучалин. – М. : Видокс, 2017. – 848 с.
43. Фадеев В. В. Лабораторная диагностика надпочечниковой недостаточности / В. В. Фадеев, Г. А. Мельниченко // Проблемы эндокринологии. – 1997. – Т. 43, № 5. – С. 39–47.
44. Изучение эффекта стимуляции яичников крыс препаратами Оваринин и Фоллигон / Н. Н. Шкиль [и др.] // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2016. – № 1. – С. 51–58.
45. Шушкевич Н. И. Биохимия гормонов : учеб. пособие по мед. биохимии / Н. И. Шушкевич. – Владимир : Изд-во Владим. гос. ун-та, 2009. – 68 с.
46. Юссеф Х. Р. Возрастные изменения морфо-функциональных характеристик надпочечников и их органотипических культур / Х. Р. Юссеф, Т. П. Бондаренко // Вісник Харківського національного університету імені ВН Каразіна. Серія: Біологія. – 2007. – № 6. – С. 165–170.
47. Основы гистологической техники для зоологов: учебно-методическое пособие для биологических специальностей вузов [для студентов, обучающихся по направлению 06.04.01 Биология /авт.-сост.] В. В. Ярцев; М-во науки и высш. образования, Нац. исслед. Том. гос. ун-т, 2019. – 85 с.
48. Morphometric and histoarchitectural changes in the ovary of *Pteropus giganteus* (Brunnich) during various phases of reproductive cycle / Dorlikar A. V. [et al.]. // International Journal of Molecular Zoology. – 2013. – Vol. 3, N. 8. – P. 32–41.
49. Mandl A. M. Numbers of normal and atretic oocytes in unilaterally spayed rats / A. M. Mandl, S. Zuckerman // Journal of Endocrinology. – 1951. – Vol. 7, N. 2. – P. 112–119.

50. Pedersen T. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary / T. Pedersen, H. Peters // *Reproduction*. – 1968. – Vol. 17, N. 3. – P. 555–557.
51. Parker G. A. Atlas of histology of the juvenile rat / G. A. Parker, C. A. Picut. – Academic Press. – 2016. – 448 p.
52. Pattern of follicular growth and steroidogenesis in the ovary of aging cycling rats / J. J. Peluso [et al.] // *Experimental Aging Research*. – 1979. – Vol. 5, № 4. – P. 319–333.
53. Sengupta P. A scientific review of age determination for a laboratory rat: how old is it in comparison with human age // *Biomedicine International*. – 2011. – Vol. 2, № 2. – P. 81–89.
54. Fuchs E. Tree Shrews / E. Fuchs, S. Corbarch-Sohle // *The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals* / edited by R. C. Hubrecht, J. Kirkwood. – 8th Ed. – Singapore : John Wiley & Sons, 2010. – P. 262–275.
55. Komarek V. Synopsis of the organ anatomy / V. Komarek [et al.] // *The Laboratory Rat* / edited by G. J. Krinke. – Stein : Academic Press, 2000. – P. 283–319.
56. Hirokawa K. Characterization of age-associated kidney disease in Wistar rats // *Mechanisms of Ageing and Development*. – 1975. – Vol. 4. – P. 301–316.
57. Sharp P. The laboratory rat / P. Sharp, J. S. Villano. – CRC press. – 2012. – 399 p.
58. Treuting P. M. Comparative anatomy and histology: a mouse, rat, and human atlas / P. M. Treuting, S. M. Dintzis, K. S. Montine // Academic Press.–2017. – 543 p.
59. Cruz G. Ovarian function and reproductive senescence in the rat: role of ovarian sympathetic innervation / G. Cruz, D. Fernandois., A. H. Paredes // *Reproduction*. – 2017. – Vol. 153. – № 2. – P. 59-68.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Протокол гистологической проводки и парафиновой заливки образцов тканей

(по J. M. Exbrayat, 2013)

1. Обезвоживание:

- 70% этанол (I) – 8–24 ч
- 70% этанол (II) – 8–24 ч
- 96% этанол (I) – 8–24 ч
- 96% этанол (II) – 8–24 ч
- Абсолютный спирт (I) – 8–24 ч
- Абсолютный спирт (II) – 8–24 ч

2. Просветление:

- бутанол (I) – 8–24 ч
- бутанол (II) – 8–24 ч

3. Пропитывание парафином:

- парафин (I) – 4–8 ч
- парафин (II) – 4–8 ч

4. Заливка в блок

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Протокол окраски гистологических препаратов (по Д. Э. Коржевскому, 2010)

Гематоксилин Майера и эозин:

1. Удаление парафина и гидратация:
 - Циклогексан (I) – 10 мин
 - Циклогексан (II) – 10 мин
 - Абсолютный этанол – 5 мин
 - 96% этанол – 5 мин
 - 70% этанол – 2 мин
 - Вода дистиллированная
2. Гематоксилин Майера – 5 мин
3. Вода водопроводная – 5–10 мин
4. Эозин – 3–5 мин
5. Вода дистиллированная (промыть)
6. Дегидратация:
 - 70% этанол – кратковременное погружение
 - 96% этанол – 1 мин
 - Абсолютный этанол – 5 мин
 - Бутанол – 5 мин
 - Ксилол – 10 мин
7. Заключение в монтирующую среду

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Протокол окрашивания гистологических препаратов (по В.В. Ярцеву, 2019)

Окраска соединительной ткани по Ван-Гизону:

1. Удаление парафина и гидратация:

- Циклогексан (I) – 10 мин
- Циклогексан (II) – 10 мин
- Абсолютный этанол – 5 мин
- 96% этанол – 5 мин
- 70% этанол – 2 мин
- Дистиллированная вода

2. Окрашивание:

- Гематоксилин Грота – 5 мин
- Водопроводная вода – 5 мин
- Дистиллированная вода – окунуть
- Пикрофуксин по Ван-Гизону – 5 мин
- Дистиллированная вода – удалить избытки красителя
- Быстрая дегидратация, бутанол, циклогексан, монтирующая среда

Окраска соединительной ткани модифицированным азаном:

1. Удаление парафина и гидратация:

- Циклогексан (I) – 10 мин
- Циклогексан (II) – 10 мин
- Абсолютный этанол – 5 мин
- 96% этанол – 5 мин
- 70% этанол – 2 мин
- Дистиллированная вода

2. Окрашивание:

- Водопроводная вода – 5 мин
- Дистиллированная вода – окунуть
- Оранжевый Ж (фосфомолибденовая кислота) – 5 мин
- Дистиллированная вода – окунуть
- Анилиновый синий – 5 мин
- Дистиллированная вода – окунуть
- Быстрая дегидратация, бутанол, циклогексан, монтирующая среда

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Гистологические характеристики надпочечников возрастных крыс линии «Wistar» при применении препарата «Мексидол» и без воздействия

Таблица Г. 1 – Относительная площадь (%) мозгового и коркового веществ надпочечников крыс интактной и опытной групп

| Группы животных | Показатели, % | |
|----------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | ОПМВ | ОП КВ |
| Интактная $\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$ <i>min-max</i> | 18,18 ± 0,69 14,71 – 24,70 | 81,82 ± 0,69 75,30 – 85,29 |
| Опытная $\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$ <i>min-max</i> | 18,71 ± 0,84 13,97 – 26,73 | 81,29 ± 0,84 73,27 – 86,03 |
| Результат сравнения | Z = -0,44 p > 0,05 | Z = 0,44 p > 0,05 |

Таблица Г. 2 – Изменчивость параметров зон коры надпочечников крыс интактной и опытной групп

| Группы животных | Показатели, % | | |
|----------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | ОП КЗ | ОП ПЗ | ОП СЗ |
| Интактная $\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$ <i>min-max</i> | 11,51 ± 0,63 8,56 – 17,06 | 57,74 ± 2,00 45,30 – 69,86 | 30,76 ± 2,24 19,10 – 45,98 |
| Опытная $\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$ <i>min-max</i> | 12,45 ± 0,57 9,57 – 15,67 | 49,12 ± 2,52 35,19 – 69,91 | 38,42 ± 2,60 19,97 – 54,38 |
| Результат сравнения | Z = -1,18 p > 0,05 | Z = 2,44 p < 0,05 | Z = -2,00 p < 0,05 |

Таблица Г. 3. – Изменчивость цитометрических и кариометрических параметров пучковой зоны коры надпочечников крыс интактной и опытной групп

| Группы животных | Показатели | | | | |
|----------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| | Площадь клеток, мкм ² | Площадь ядер, мкм ² | Площадь цитоплазмы, мкм ² | ЯЦО, доли | Объем ядер, мкм ³ |
| Интактная $\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$ <i>min-max</i> | 328,97 ± 98,40 105,60 – 700,39 | 47,38 ± 8,90 28,49 – 81,13 | 281,59 ± 95,72 72,86 – 638,54 | 0,19 ± 0,07 0,06 – 0,53 | 216,50 ± 60,59 98,33 – 404,90 |
| Опытная $\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$ <i>min-max</i> | 292,24 ± 6,89 164,78 – 557,23 | 41,88 ± 0,70 27,03 – 71,63 | 250,36 ± 6,67 124,00 – 499,39 | 0,18 ± 0,00 0,07 – 0,41 | 152,68 ± 4,44 23,43 – 224,76 |
| Результат сравнения | $t_{st} = -3,60$ p < 0,05 | $t_{st} = -5,66$ p < 0,05 | $t_{st} = -3,15$ p < 0,05 | $t_{st} = -0,46$ p > 0,05 | $t_{st} = -9,80$ p < 0,05 |

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Изменение показателя крови крыс интактной и опытной групп

Таблица Д. – Уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс интактной и опытной групп

| Группы животных | Уровень кортикостерона, нг/мл |
|----------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Интактная $\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$ <i>min-max</i> | $123,6 \pm 46,74$ 14,20 – 288,60 |
| Опытная $\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$ <i>min-max</i> | $43,96 \pm 4,33$ 7,50 – 147 |
| Результат сравнения | $Z = 1,28$ $p > 0,05$ |

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Характеристика яичников возрастных крыс линии «Wistar» при применении
этилметилгидроксипиридина сукцината и без воздействия

Таблица Е – Количественное содержание фолликулов разной степени зрелости яичников
крыс интактной и опытной групп

| Показатели, шт | Группы животных | | Результат сравнения |
|---------------------------|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------|
| | Интактная $\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$ <i>min-max</i> | Опытная $\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$ <i>min-max</i> | |
| Примордиальные фолликулы | 580,3 ± 122,7 231,0–1018,1 | 737,2 ± 165,6 265,2–1232,0 | $t_{st} = -0,76$ $p > 0,05$ |
| I однослойные фолликулы | 266,6 ± 47,3 94,1–402,1 | 402,1 ± 22,4 350,8–470,5 | $t_{st} = -2,58$ $p < 0,05$ |
| I многослойные фолликулы | 52,5 ± 8,7 15,0–80,0 | 87,5 ± 6,9 70,0–115,0 | $t_{st} = -3,14$ $p < 0,05$ |
| II многослойные фолликулы | 45,0 ± 4,5 25,0–55,0 | 75,0 ± 10,4 45,0–115,0 | $t_{st} = -2,65$ $p < 0,05$ |
| Графовы пузырьки | 19,2 ± 4,0 5,0–35,0 | 21,7 ± 4,8 10,0–40,0 | $t_{st} = -0,40$ $p > 0,05$ |
| Атрегические фолликулы | 63,3 ± 7,4 45,0–95,0 | 45,8 ± 3,5 35,0–60,0 | $t_{st} = 2,14$ $p > 0,05$ |
| Желтые тела | 8,3 ± 1,1 5,0–13,0 | 10,3 ± 1,6 35,0–17,0 | $t_{st} = -1,00$ $p > 0,05$ |