

Розділ 3

АКУШЕРСТВО, ГІНЕКОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ РОЗМНОЖЕННЯ ТВАРИН

УДК: 619:616-018:618.11:636.7

РЕЗУЛЬТАТИ ГІСТОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ЯЄЧНИКІВ НЕПЛІДНИХ САМОК СОБАК

Давиденко Н. Г., аспірант, natalyadavidenko@ukr.net
Сумський національний аграрний університет, м. Суми

Анотація. Було досліджено тканини яєчників у неплідних та здорових тварин в різні періоди статевого циклу. При мікроскопії гістологічних препаратів проводили підрахунок кількості інтерстиціальних (текальних) клітин, примордіальних, первинних, вторинних, третинних фолікулів, атретичних тіл та фолікулів, досліджували морфологію жовтих тіл.

При гістологічному дослідженні яєчників неплідних самок собак, ми спостерігали певні зміни фолікулогенезу, що проявлялися утворенням великої кількості атрофічних фолікулів та атрофічних тіл. Виявлена нами затримка лютеолізу у дослідних тварин свідчить про порушення процесів розвитку та дегенерації не тільки фолікулів, а й жовтих тіл в яєчниках неплідних самок собак.

Ключові слова: неплідність самок собак, патологія яєчників, гістологія, інтерстиціальні клітини, примордіальний фолікул, первинний фолікул, вторинний фолікул, третинний фолікул, жовте тіло, атретичний фолікул.

Актуальність проблеми. Не слабшає цікавість до проблем діагностики дисфункції статеві системи у самок собак серед ветеринарних спеціалістів. Вітчизняні вчені безперервно вивчають аспекти етіології, патогенезу, клінічної діагностики та шляхів подолання неплідності у самок собак [1, с. 96].

Дослідження базуються на отриманні знань про морфофункціональну характеристику яєчників та матки, гормональних, біохімічних та імунологічних особливостях статеві функції у самок собак. До уваги вчених потрапляють такі критерії, як особливості фолікулогенезу у самок собак, частота фолікулярних хвиль, кількість ооцитів в фолікулах, зрілість яйцеклітини в момент розриву фолікула [5]. Канадська організація приводить статистику, що у 34 % самок собак виникнення дисфункції яєчників, тобто у третини випадків, пов'язане з порушенням фолікулогенезу [4].

Статевий цикл собак має ряд відмінних рис, взаємопов'язаних з видовою специфічністю статевого циклу, зокрема тривалий преовуляторний період, з високим рівнем концентрації прогестерону в сироватці крові [2, с. 1]. Крім того, процес дозрівання фолікула супроводжується поліовуляцією, та овуляцією яйцеклітини до стадії дозрівання [3, с. 25]. Умовною нормою для собак є явища, фатальні з точки зору біології розвитку. Особливості статеві циклічності у собак ускладнюють процес діагностики патологій яєчника [1, с. 96].

Зростання фолікулів контролюється гіпоталамусом, гіпофізом і самими структурами яєчників [4, с. 6]. Початкові стадії фолікулогенезу забезпечуються внутрішніми регуляторними механізмами. Значну роль в фолікулогенезі відіграє естрадіол [3, с. 25]. При патології яєчників високу концентрацію естрадіолу в крові підтримує гіперплазована гранульоза фолікулярних кіст [4, с. 7].

Таким чином, гіперплазована гранульоза фолікулярних кіст є постійним джерелом естрогенів, які стимулюють ріст і розвиток фолікулів. Циклічний вплив гіпоталамо-гіпофізарної системи на функціонування яєчника порушується. Циклічна функція яєчників стає опосередкованою від впливу центральної системи, що призводить до формування нових хвиль росту фолікулів з подальшим їх кістозним переродженням [5, с. 3-6].

При повноцінному статевому циклі, овуляція відбувається завдяки преовуляторному піку естрогенів. У разі кістозного переродження яєчника, морфологічні зміни структури зовнішньої теки є чинником, що порушує процес розриву фолікула за рахунок заміщення еластичною сполучнотканинною оболонки фіброзними структурами. Дані перетворення в структурі зовнішньої теки призводять до гіперплазії естрогенактовної гранульози і постійного наростання концентрації естрогенів в крові [1, с. 99-100].

Мета. Метою нашого дослідження було дослідити гістологічну структуру яєчників у неплідних самок собак.

Матеріал і методи дослідження. Нами було досліджено тканини яєчників у хворих та здорових тварин в різні періоди статевого циклу. Для цього було сформовано 4 групи тварин. Перша група самок складалася з двох самок з дисфункцією яєчників, що супроводжувалася порушеннями статевого циклу, зокрема гіпоестрією. Друга група складалася з 4-ьох самок собак, що мали кістозну гіперплазію ендометрію. Третя група складалася з 2-ох самок, що мали лютеїнові кісти. Четверта група складалася із п'яти клінічно здорових тварин.

Для гістологічного дослідження відбирали фрагменти паренхіми з середньої частини яєчників. Відібраний матеріал фіксували в 10 %-ному розчині нейтрального формаліну за кімнатної температури протягом 2-3 днів, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації та заключали в парафін за загальноприйнятою методикою (Меркулов Г.А., 1969). Зрізи товщиною 12–15 мкм одержували на мікротомі Fasser 325, фарбували гематоксиліном й еозином. Мікроскопію гістозрізів проводили за допомогою біокулярного мікроскопа "Micros" за збільшення 10x10, 10x40, 10x100. При мікроскопії проводили підрахунок кількості інтерстиціальних (текальних) клітин, примордіальних, первинних, вторинних, третинних фолікулів, атретичних тіл та фолікулів, досліджували морфологію жовтих тіл.

Для підрахунку кількості інтерстиціальних клітин проводили мікроскопію гістологічного препарату при збільшенні 10x100, використовуючи імерсійне масло. Орієнтували препарат так, щоб білкова оболонка та метозелій були вгорі. Знаходили лівий верхній край препарату і підраховували кількість інтерстиціальних клітин в 20-ти полях мікроскопу під білковою оболонкою, окремо в кожному полі мікроскопу. Після цього підраховували середнє значення кількості інтерстиціальних клітин в одному полі мікроскопу.

Після завершення підрахунку інтерстиціальних клітин в зовнішній частині коркової зони, знову знаходили лівий верхній край препарату і відступали від нього два поля зору мікроскопу вниз. Підраховували кількість інтерстиціальних клітин у 20-ти полях зору мікроскопу внутрішньої частини коркової зони яєчника, щоразу опускаючись від білкової оболонки яєчника на два поля зору вниз. Налаштування різкості проводили один раз на початку підрахунку кожного поля зору, не коректували в процесі підрахунку мікрогвинтом, щоб кількість клітин в полі зору залишалася незмінною, оскільки, в гістологічних зрізах міститься декілька шарів клітин і, змінюючи різкість, в поле зору будуть потрапляти нові клітини. Умовно розділивши поле зору на чотири квадрати, підраховували починаючи з верхнього лівого квадрата, за годинниковою стрілкою. При диференціації інтерстиціальних клітин враховували стандарти для якісної оцінки форми структурних складових об'єкта вивчення. Ядра інтерстиціальних клітин мають округлу форму та більш насичений синій колір у порівнянні з фібробластами і відповідають індексу 0,75-0,95 за стандартами сферичності (Griffiths G., 1970).

Кількість примордіальних та первинних фолікулів підраховували при збільшенні мікроскопу 10x40, не використовуючи імерсію. Підраховували їх кількість спочатку в 20-ти полях зору мікроскопу зовнішньої частини кори яєчників, потім в 20-ти полях зору внутрішньої частини коркової зони яєчників. Методика підрахунку аналогічна підрахунку інтерстиціальних клітин.

Кількість вторинних та третинних фолікулів підраховували при збільшенні мікроскопу 10x10. При такому збільшенні в поле зору потрапляла майже вся коркова зона яєчника, тому, після того як знайшли лівий верхній край препарату, рахували кількість вторинних та третинних фолікулів вздовж білкової оболонки в 20-ти полях зору, не переміщаючись нижче. Після цього визначали їх середнє значення.

Кількість атретичних фолікулів, що утворюються при атрезії первинних фолікулів, підраховували при збільшенні мікроскопу 10x40. При цьому, знаходили верхній лівий край препарату і підраховували, послідовно в 20-ти полях зору, під білковою оболонкою, кількість атретичних фолікулів. Потім, за формулою, визначали середню їх кількість.

Кількість атретичних тіл, що утворюються при атрезії вторинних та третинних фолікулів підраховували при збільшенні мікроскопу 10x10. Методика підрахунку така ж сама, як при підрахунку вторинних та третинних фолікулів.

Результати дослідження. Отримані дані кількості структурних об'єктів в тканинах яєчників дослідних тварин порівнювали з кількістю структурних об'єктів в тканинах яєчників клінічно здорових самок собак в аналогічний період статевого циклу. В різні періоди ми спостерігали відповідні зміни тканини яєчників у самок. Отримані результати гістологічних досліджень представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Результати гістологічного дослідження яєчників (n=13)

Гістологічні структури	I група	II група	III група	IV група		
				Анеструс	Метеструс	Кінець метеструсу - початок анеструсу
Примордіальні фолікули в зовнішньому шарі коркової зони	0,21±0,1 3***	3,15±0,8	0,51±0,2 2***	17,7±1,96	11,4±1,87	7,3±1,23
Примордіальні фолікули у внутрішньому шарі коркової зони	0,51±0,2 2	2,2±0,99	3,3±0,76 **	3,8±1,9	1,76±0,68	0,56±0,22
Первинні фолікули у зовнішньому шарі коркової зони	0,91±0,3 8	1,7±0,28	0,21±0,1 3***	1,1±0,57	0,51±0,7	2,1±0,3
Первинні фолікули у внутрішньому шарі коркової зони	0,21±0,1 3	0,26±0,1 4	0,21±0,2	0,51±0,22	0,06±0,05	0,26±0,1
Вторинні фолікули	2,7±1,27	1,55±0,3 9	0,31±0,2 1	0,51±0,4	0,46±0,28	0,96±0,34
Третинні фолікули	0,71±0,4 2	0,81±0,3 7	0,71±0,4 7	0	0,36±0,11	0,66±0,37
Атретичні фолікули	10,2±1,8 ***	6,7±0,73	1,1±0,37	0,41±0,22	3,35±0,32	0,86±0,25
Атретичні тіла	5,2±1,17	14,9±2,0	9,4±2,5	2,0±0,6	2,3±0,4	5,5±1,2
Кількість інтерстиціальних клітин в зовнішньому шарі коркової зони	153,75±17,9	93,55±7,3	95,95±8,7	69,0±10,94	84,9±6,48	86,5±7,5
Кількість інтерстиц. клітин у внутр. шарі коркової зони	111,05±9,6	68,48±10,6	109,9±12,7	79,8±4,56	62,15±7,02	61,98±8,5

Примітка. * – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001 в порівнянні з клінічно здоровими

Кількість первинних та примордіальних фолікулів у тварин всіх дослідних груп значно зменшена, в порівнянні з їх кількістю в яєчниках контрольної групи тварин.

У самок першої групи в зовнішній частині коркової зони яєчника, кількість примордіальних фолікулів була меншою в 84,3 рази у порівнянні з контрольною групою, у самок другої групи вона була меншою в 3,6 разів (p<0,001), у самок третьої групи їх кількість була меншою в 2,2 рази (p<0,001). Кількість первинних фолікулів в зовнішній частині коркової речовини, безпосередньо під білковою оболонкою, у яєчниках першої групи самок була зменшена в 1,2 рази, у порівнянні з контрольною групою, у яєчниках тварин третьої групи їх кількість була зменшена в 10 разів (p<0,001). Кількість первинних фолікулів у самок другої дослідної групи в порівнянні з контрольною групою була, навпаки, збільшеною в 3,3 рази. Це може бути пов'язане з тим, що в період метеструсу, в який досліджували тканину яєчника, у самок другої контрольної групи в яєчниках майже всю коркову зону займали жовті тіла, що мали дуже великі розміри.

Кількість вторинних та третинних фолікулів у самок всіх дослідних груп, окрім третьої, в різній мірі була збільшена в порівнянні з самками контрольної групи в аналогічний період статевого циклу. У самок третьої групи кількість вторинних фолікулів була зменшеною.

Кількість фолікулів, що знаходяться в процесі атрезії, у тварин всіх дослідних груп суттєво збільшена в порівнянні з контрольною групою. Найменші відхилення від норми ми спостерігаємо в самок третьої дослідної групи.

Кількість інтерстиціальних клітин у яєчниках самок всіх дослідних груп збільшена у порівнянні з нормальними тканинами. Це пояснюється більшою кількістю атретичних фолікулів та

атретичних тіл, які є джерелом розростань інтерстиціальних клітин в яєчниках дослідних самок собак.

Жовті тіла були в препаратах яєчниках всіх дослідних самок собак. У самок першої групи їх кількість та розміри були зменшені, капсула була потоньшеною, поміж лютеоцитів спостерігалися розростання сполучної тканини. Така морфологія жовтих тіл була і в контрольній групі самок в період анеструсу. У тварин другої дослідної групи жовті тіла були невеликих розмірів, капсула містила велику кількість колагенових волокон, однак, в певних місцях вони були розташовані не щільно та містили підвищену кількість фіброblastів. В цитоплазмі лютеоцитів були присутні вакуолі. Від капсули жовтого тіла видно розростання сполучної тканини всередину залози. Слід зазначити, що ознак дегенерації жовтого тіла у самок другої групи, у порівнянні з аналогічним періодом статевого циклу, у клінічно здорових тварин було менше.

У тварин третьої дослідної групи жовті тіла займали майже всю паренхіму яєчника, вони були заповнені лютеїновими клітинами з вакуолізованою цитоплазмою, містили багато судин, щільну товсту капсулу. Жовті тіла були без ознак дегенерації, що не характерно для початку анеструсу.

Таким чином, у тварин першої та другої груп, ми спостерігали суттєво збільшену кількість інтерстиціальних клітин, атрофічних фолікулів та атрофічних тіл. Слід звернути увагу, що гістологічні зміни яєчників у самок першої та другої груп схожі, хоча клінічні прояви патології статевої системи були різні. Гістологічні зміни самок першої дослідної групи були сильніше виражені. У самок третьої групи ми спостерігали затримку лютеолізу.

Висновки

При гістологічному дослідженні яєчників неплідних самок собак, ми спостерігали певні зміни фолікулогенезу, що проявлялися утворенням великої кількості атрофічних фолікулів та атрофічних тіл. Виявлена нами затримка лютеолізу у дослідних тварин свідчить про порушення процесів розвитку та дегенерації не тільки фолікулів, а й жовтих тіл в яєчниках неплідних самок собак.

Отримані нами дані вказують на необхідність вивчення структурних змін яєчників в умовах впливу інших залоз ендокринної системи, в першу чергу гіпофізу, а також, в умовах впливу різних екзогенних чинників, для подальшого вивчення патогенезу та етіології дисфункції яєчників неплідних самок собак.

Література

1. Дмитриева, Т.О. Особенности фолликулогенеза у сук при полноценных и неполноценных половых циклах [Текст] / Т.О. Дмитриева, А.Ю. Потапова // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2014. - №4. - С. 96-100.
2. Симпсон, Дж. Руководство по репродукции и неонатологии собак и кошек [Текст] / Дж. Симпсон, Г. Ингланд, М. Харви; пер. с англ. Е.Н. Смелова. – М. : Софион. – 2005. – 280 с.
3. Changes in the number of follicles and of oocytes in ovaries of prepubertal, peripubertal and mature bitches / K. McDougall, M.A. Hay, K.L. Goodrowe [et al] // *Reprod Fertil Suppl.*- 1997. - №51. – P. 25-31.
4. Folliculogenesis, ovulation and endocrine control of oocytes and embryos in the dog / K. Reynaud, A. Fontbonne, M. Saint-Dizier [et al] // *Reprod Domest Anim.* – 2012. - №47 - P. 6-9.
5. Immunohistochemical evaluation of canine ovarian cysts / Y. Akihara, Y Shimoyama, K. Kawasako [et al] // *J Vet Med Sci.* - 2007. - № 69. - P. 3-7.

РЕЗУЛЬТАТЫ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ЯИЧНИКОВ БЕСПЛОДНЫХ САМОК СОБАК

Давиденко Н.Г., аспирант, natalyadavidenko@ukr.net

Сумской национальной аграрный университет, г. Сумы

Аннотация. Было исследовано ткани яичников бесплодных и клинически здоровых животных в различные периоды полового цикла. При микроскопии гистологических препаратов считали количество интерстициальных (текальных) клеток, примордиальных, первичных, вторичных, третичных фолликулов, атретических тел и атрезирующих фолликулов, исследовали морфологию желтых тел.

При гистологическом исследовании яичников бесплодных самок собак, мы наблюдали некоторые изменения фолликулогенеза, проявлявшиеся образованием большого количества атрезирующих фолликулов и атретических тел. Обнаруженная нами задержка лютеолиза у опытных животных, свидетельствует не только о нарушении процессов развития и дегенерации фолликулов, но и желтых тел в яичниках бесплодных самок собак.

Ключевые слова: бесплодие самок собак, патология яичников, гистология, интерстициальные клетки, примордиальный фолликул, первичный фолликул, вторичный фолликул, третичный фолликул, жёлтое тело, атрезирующий фолликул.

RESULTS OF HISTOLOGICAL EXAMINATION OF OVARIES OF INFERTILE FEMALE DOGS

Davydenko NG, graduate student, natalyadavidenko@ukr.net

Sumy National Agrarian University, Sumy.

Summary. The interest in the diagnosis of dysfunction of the reproductive system in female dogs among veterinary specialists does not diminish. Scientists are continuously studying aspects of etiology, pathogenesis, clinical diagnosis and ways to overcome infertility in female dogs.

The purpose of our study was to investigate the histological structure of ovaries in infertile female dogs.

Ovarian tissue was studied in patients and healthy animals in different periods of the sexual cycle.

For this purpose, four groups of animals were formed. The first group of females consisted of two females with ovarian dysfunction, which was accompanied by violations of the sexual cycle. The second group consisted of 4 female dogs who had cystic endometrial hyperplasia. The third group consisted of 2 females who had luteal cysts. The fourth group consisted of five clinically healthy animals.

For histological examination, fragments of parenchyma from the middle part of the ovaries were selected. The selected material was fixed in 10% neutral formalin solution at room temperature for 2-3 days, dehydrated in alcohols of increasing concentration, and made in paraffin according to the generally accepted method (Merkulov GA, 1969). Cuttings in the thickness of 12-15 microns were obtained on a Fasser 325 microtome, stained with hematoxylin and eosin. Microscopy of gistology slides was performed using a binocular microscope for an increase of 10x10, 10x40, 10x100. Microscopy was used to calculate the number of interstitial cells, primordial, primary, secondary, tertiary follicles, atretic bodies and follicles in 20 different fields of view of the microscope, and examined the morphology of the corpus luteum.

The number of primary and primordial follicles in animals of all experimental groups was significantly reduced, compared with their number in the ovaries of the control group.

The number of primary follicles in females of the second experimental group was increased by 3.3 times, in comparison with the control group. This may be due to the fact that the ovarian of the females of the second control group tissue was examined during metestrus. The cortical area of ovaries was occupied by corpora luteum in the during this period of sexual cycle in experimental dog females. They were very large in size.

The number of secondary and tertiary follicles in females of all experimental groups, except for the third, was, to varying degrees, increased in comparison with control group females in the same period of the sexual cycle. In females of the third group, the number of secondary follicles was reduced.

The number of follicles in the process of atresia in animals of all experimental groups was increased compared to the control group. We observed the smallest deviation from the norm in females of the third experimental group.

The number of interstitial cells in the ovaries of females in all experimental groups was increased in comparison with normal tissues. This is due to the greater number of atretic follicles and atretic bodies that are the source of interstitial counts in the ovaries of experimental female dogs.

In animals of the third experimental group, corpora luteum occupied almost all the parenchyma of the ovary. They were filled with luteal cells with a vacuolated cytoplasm, containing many vessels, a dense thick capsule. The corpora luteum were without signs of degeneration, which is not typical for anestrus.

Thus, we observed a significant increase in the number of interstitial cells and atrophic follicles in animals of the first and second groups. It should be noted that the histological changes in the ovaries in the females of the first and second groups are similar, although the clinical manifestations of the pathology of the reproductive system were different. Histological changes in the females of the first experimental group were more pronounced. We observed a delay of the luteal regression in females of the third group.

These features indicate some changes in folliculogenesis of infertile female dogs, manifested by the formation of a large number of atrophic follicles and atrophic bodies. Our studies of luteolysis in experimental animals indicate a violation of the processes of development and degeneration of not only follicles, but also the corpus luteum, in the ovaries of infertile female dogs.

Key words: dog infertility, ovarian pathology, histology, interstitial cells, primordial follicle, primary follicles, secondary follicle, tertiary follicle, corpus luteum, atretic follicle.