

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

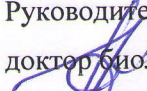
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТОМСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)

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. Воробьев

« 26 » мая 2020 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА БАКАЛАВРА

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НАДПОЧЕЧНИКОВ
И ЯИЧНИКОВ КРЫС В ПОЗДНЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ ПОД
ВОЗДЕЙСТВИЕМ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

по основной образовательной программе подготовки бакалавров

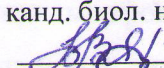
направление подготовки

06.03.01 – БИОЛОГИЯ

Степаненко Дарья Андреевна

Руководитель ВКР

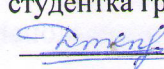
канд. биол. наук, доцент

 В. В. Ярцев

« 26 » мая 2020 г.

Автор работы

студентка группы № 01602

 Д. А. Степаненко

Томск – 2020

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

«29» 10 2020 г.

ЗАДАНИЕ

По подготовке ВКР бакалавра

Студентке Степаненко Дарье Андреевне группы 01602

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

2. Срок сдачи студентом выполненной ВКР:

а) на кафедре – 26 мая 2020 г.

б) в ГЭК – 21 июня 2020 г.

3. Исходные данные к работе: целью работы является изучение гистологических характеристик надпочечников и яичников крыс линии Wistar поздних этапов онтогенеза при использовании клеточной терапии.

Задачи: 1) Провести сравнительную оценку морфологических параметров надпочечников крыс поздних этапов онтогенеза при использовании клеточной терапии и без воздействия; 2) Оценить состояние адренокортикоцитов надпочечников животных на поздних этапах онтогенеза при использовании клеточной терапии и без воздействия; 3) Сопоставить полученные гистологические данные с уровнем кортикостерона в плазме крови животных на поздних этапах онтогенеза при использовании клеточной терапии и без воздействия; 4) Оценить состояние яичников крыс поздних этапов онтогенеза при использовании клеточной 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 клеточной терапии, гистологическая характеристика яичников крыс в позднем онтогенезе под воздействием клеточной терапии, выводы, список используемой литературы, приложения.

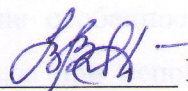
5. Указать предприятие, организацию по заданию которого выполняется работа: Национальный исследовательский Томский государственный университет.

6. Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей): 13 рисунков, 6 таблиц.

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

Руководитель ВКР

канд. биол. наук, доцент



В. В. Ярцев

Задание принял к исполнению «30» 10. 2019 г.



Д. А. Степаненко

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа 51 с., 6 таб., 13 рис., 4 прил., 47 источников.

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НАДПОЧЕЧНИКОВ И ЯИЧНИКОВ КРЫС В ПОЗДНЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Объект исследования – надпочечник и яичник крысы линии Wistar, предмет исследования – их гистологическая особенность при использовании клеточной терапии.

Цель: изучение гистологических характеристик надпочечников и яичников крыс линии Wistar поздних этапов онтогенеза при использовании клеточной терапии.

В процессе работы исследованы гистологические особенности надпочечников и яичников крыс линии Wistar поздних этапов онтогенеза при использовании клеточной терапии.

Проведенное морфологическое исследование надпочечников показало, что у старых крыс, получавших клеточную терапию, происходят значимые морфофункциональные изменения структуры адреналовой железы. После трёхкратного введения инъекции мезенхимальных стволовых клеток костного мозга наблюдается уменьшение площади пучковой зоны и уменьшение ядер клеток этой зоны, увеличение площади сетчатой зоны. При этом, морфофункциональных изменений в яичнике крыс, получавших клеточную терапию, не происходит.

Причины могут быть достаточно разными, но поскольку клетки не были помечены и введение не было адресным, контроль их локализации в организме вызывает затруднения, и, мы не можем точно утверждать какие причины возможны.

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
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. Механизм действия окислительного стресса при возрастных изменениях	11
1.4. Применение клеточной терапии при патологиях различных органов.....	12
1.5. Строение, функции и возрастные изменения надпочечников крыс	13
1.5.1. Анатомия надпочечников.....	14
1.5.2. Микроскопическое строение надпочечника.....	15
1.5.3. Возрастные изменения надпочечников	16
1.6. Строение, функции и возрастные изменения яичников крыс	17
1.6.1. Анатомия яичников.....	17
1.6.2. Микроскопическое строение яичника	17
1.6.3. Функции яичников и их регуляция	19
1.6.4. Овариальный цикл яичников	21
1.6.5. Возрастные изменения яичников	22
2. Материалы и методы	23
2.1. Характеристика тест-объекта.....	23
2.2. Схема эксперимента.....	24
2.3. Выделение ядродержащих клеток костного мозга	24
2.4. Получение культуры клеток костного мозга.....	25
2.5. Гистологические методы исследования	25
2.6. Определение содержания кортикостерона в сыворотке крови	28
2.7. Статистическая обработка данных.....	28
3. Результаты и их обсуждение.....	30

3.1. Гистологическая характеристика надпочечников крыс в позднем онтогенезе под воздействием клеточной терапии**Ошибка! Закладка не определена.**

3.1.1. Влияние клеточной терапии на морфологические показатели надпочечника**Ошибка! Закладка не определена.**

3.1.2. Влияние клеточной терапии на цитологические показатели надпочечника**Ошибка! Закладка не определена.**

3.2. Уровень кортикостерона**Ошибка! Закладка не определена.**

3.3. Гистологическая характеристика яичников крыс в позднем онтогенезе под воздействием клеточной терапии**Ошибка! Закладка не определена.**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ40

ВЫВОДЫ.....41

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....42

ПРИЛОЖЕНИЕ А46

ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....47

ПРИЛОЖЕНИЕ В49

ПРИЛОЖЕНИЕ Г.....51

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время существует две основных группы теорий старения – программное (генетическое) и теории клеточного повреждения или ошибок, среди последних стоит теория старения свободных радикалов Хармана–Эмануэля, которая практически одновременно с открытием мелатонина получила свое распространение, а чуть позже и подтверждение (Кишкун, 2008). Было обнаружено, что продолжительность жизни животных отрицательно коррелирует с уровнем основного метаболизма и аутоокисляемостью тканей, а одним из способов защиты клеток от действия активных форм кислорода является повышение или восстановление активности антиоксидантных ферментов, в том числе и в результате их синтеза *de novo* (Хижкин, 2010).

С возрастом в тканях организма человека повышается содержание продуктов окислительного повреждения различных структур клеток. Повреждение макромолекул, вызванные активными формами кислорода, приводят к мутациям, нестабильности генома в целом, и развитию ряда сцепленных с возрастом болезней: опухоли, возрастной иммуносупрессии, дисфункции мозга, катаракте и др. В процессе жизни организм постоянно подвергается воздействиям факторов внешней среды, при этом активируются свободнорадикальные процессы. На это реагирует система адаптаций, синтезируя глюкокортикоиды. Долговременное воздействие глюкокортикоидов на нейроны гипоталамуса приводит к повышению гипоталамического порога чувствительности к регуляторным сигналам. Постоянно повышенные уровни глюкокортикоидов и снижение чувствительности гипоталамуса к ним, являются одним из основных механизмов нормального старения (Кишкун, 2008).

Гипоталамус, как один из центров управления процессами жизнедеятельности на уровне всего организма, участвует в том числе и в регуляции репродуктивной функции. Снижение последней является проявлением естественного старения человека и животных.

У женщин прекращение овариальной функции характеризуется переходом от регулярного менструального цикла к менопаузе, которой предшествует период нерегулярных циклов (Анисимов, 2008). Наиболее распространенными последствиями менопаузы являются дисбаланс вегетативной нервной системы, психологические изменения и физиологические изменения органов мишеней из-за перестройки обмена веществ. Характерные проявления менопаузы заключаются в возникновении остеопороза, снижении содержания гликогена, с последующим уменьшением числа лактобактерий в кишечнике; в ответ на изменение гормонального статуса происходит атрофирование

матки и маточных труб, образуются фолликулярные кисты и атретические тела в яичниках, происходит истончение кожи. Снижение уровня эстрогенов также может привести к увеличению случаев цистита, дизурии, неинфекционного уретрита и т.д. Такие нарушения у женщин обычно начинают проявляться в возрасте 37–45 лет и вместе с этим приносить им дискомфорт.

Всё это свидетельствует о необходимости коррекции свободнорадикальных процессов в тканях, приводящих к окислительному стрессу. Коррекцию осуществляют антиоксидантами различной химической природы: ферментами, фенолами, полифенолами, флаваноидами и многими другими соединениями (Мартусевич, 2015). Поскольку мезенхимальные стволовые клетки способны взаимодействовать с клетками поврежденных тканей, и оказывать трофический и антиапоптотический эффекты на них, целесообразно проведение работ, для выяснения эффективности мезенхимальных клеток в этой области (Шахпазян, 2012).

В литературе встречаются единичные работы, посвященные экспериментальному исследованию влияния стволовых клеток костного мозга на функционирование адаптивной и репродуктивной систем у самок грызунов (Ghadami, 2012; Богданенко и др., 2015; Басенко, 1999).

Исходя из вышесказанного, целью настоящей работы является изучение гистологических характеристик надпочечников и яичников крыс линии Wistar поздних этапов онтогенеза при использовании клеточной терапии.

В соответствии с поставленной целью, решались следующие задачи:

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

Объектом исследования является надпочечник и яичник крыс линии «Wistar», предметом исследования – изменение их морфологических параметров при воздействии клеточной терапии.

1. Литературный обзор

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

Серая крыса (*Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769)) – один из видов рода крыс, относящийся к отряду грызунов (Sengupta, 2013). Данный вид был выведен в лабораторную практику в качестве модельного объекта в 1906 году. С этого периода по настоящее время выведено более 60 лабораторных линий данного вида, как пигментированных, так и альбиносных типов. Лабораторные линии отличаются от диких особей физиологическими особенностями. Например, у лабораторных крыс отсутствует сезонность репродуктивного цикла, они имеют более раннюю половую зрелость, лучшую плодовитость и более короткую продолжительность жизни, чем у особей, живущих в естественных условиях.

Кратко описать особенности онтогенеза лабораторных крыс можно следующим образом: быстро развиваются в ювенильном периоде, становятся половозрелыми примерно в возрасте 6 недель, а максимальный срок их жизни составляет около 2–3,5 лет (в среднем 3 года) (Sengupta, 2013). При подробном рассмотрении постэмбрионального этапа онтогенеза крыс выделяют несколько фаз развития (Sengupta, 2013): молочное вскармливание (отлучение от матери), половое созревание (пубертатный период), репродуктивное старение, фаза возрастных изменений.

Молочное вскармливание (отлучение от матери) – это первая фаза постнатального периода онтогенеза крыс, в которую новорождённые особи питаются материнским молоком. Уникальная связь между самками и их детёнышами безвозвратно нарушается во время отлучения от груди, что включает в себя перестройку пищеварительного поведения: будучи взрослыми, они самостоятельно выбирают и принимают твердую пищу. Процесс постепенного перехода детёныша *R. norvegicus* на взрослую диету (твёрдую пищу) и прекращения подачи молока его матери начинается примерно на 18-й день. Время, потраченное на кормление грудью, начинает уменьшаться, а время, затрачиваемое на прием твердой пищи, увеличиваться. Примерно к 34-ому дню молодые уже не сосут, и отлучение от груди практически завершено. Средний возраст отъема для лабораторных крыс – 3 недели (21 день).

Период полового созревания – вторая фаза жизни крыс, когда впервые становится возможным размножение, т.е. когда формируются зрелые половые продукты /начинается активный гаметогенез. Самки претерпевают эту фазу на 32–34 день после рождения, в то

время как у самцов половая зрелость наступает позже – на 45–48 день. Крысы достигают половой зрелости в среднем возрасте 50 дней после рождения. Самки крыс демонстрируют регулярные циклы до начала следующей фазы развития.

Репродуктивное старение – является третьей фазой развития серых крыс. У самок это происходит в возрасте от 15 до 20 месяцев. Способность к спариванию, являющаяся результатом физиологических изменений, снижается при старении. У большинства стареющих самок грызунов наблюдаются периоды постоянного эструса (постоянной сексуальной восприимчивости), которые связаны с тоническим кровяным титром эстрогена и низким уровнем прогестерона. Поскольку тоническая секреция эстрогена стимулирует ороговение вагинального эпителия, это состояние также называют постоянным вагинальным ороговением. Это наиболее распространенное состояние ацикличности у лабораторных крыс.

Фаза *активных возрастных изменений* – после фазы репродуктивного старения самки крыс живут в среднем в течение 485 дней.

1.2. Возрастные изменения крыс линии Wistar

В настоящее время крысы Wistar постепенно становятся одними из самых используемых лабораторных животных в мире (Sengupta, 2013). Благодаря множеству проведенных экспериментов, прояснились некоторые подробности о физиологических изменениях организма крысы связанных с возрастом.

В различных работах показано, что с возрастом двигательная активность крыс линии Wistar повышается (Губайдуллина, 2016). Приближаясь к половозрелому возрасту, она становится максимальной, после чего начинаются дегенеративные физиологические изменения. При этом ориентировочно-исследовательская активность старых животных характеризуется проявлением страха и повышенной тревожностью.

Возраст вносит значительные изменения в вариабельность кровообращения (Бабийчук, 2012). В стареющем организме крысы процесс модулирования ритма сердца с помощью нервных структур заменяется менее специфическим и избирательным гуморальным регулированием, т.е. происходит переход с вегетативного или рефлекторного уровня регуляции на более медленный – гуморально-метаболический.

Естественный процесс старения сопутствует дегенерации иммунной системы (Мороз, 2009, 2010). Так, возрастные изменения тимуса и селезёнки сопровождаются разрастанием соединительной ткани, тем самым уменьшая долю, приходящуюся на

функциональную ткань. Эти процессы в свою очередь вызывают большую восприимчивость организма крысы к инфекциям.

В пищеварительной системе крыс также постепенно нарастают регрессивные изменения: замедляется опорожнение желудка от жидкости; уменьшается масса стула, что связано с изменением сократимости гладких мышц толстой кишки; понижается способность печени к детоксикации, связанная с изменением характера её метаболизма (Smits, Lefebvre, 1996; Давыдов и др., 2005).

Многочисленные эксперименты, проведенные в этой области, ответили на многие вопросы, интересующие геронтологов, но пока ученое сообщество не в состоянии прийти к единому мнению о причинах физиологического старения.

1.3. Механизм действия окислительного стресса при возрастных изменениях

В настоящее время существует две основных группы теорий старения – программное (генетическое) и теории клеточного повреждения или ошибок, среди последних стоит теория старения свободных радикалов Хармана – Эмануэля (Кишкун, 2008). Было обнаружено, что продолжительность жизни животных отрицательно коррелирует с уровнем основного метаболизма и аутоокисляемостью тканей (Хижкин, 2010).

Одним из базовых компонентов обмена веществ является окислительный метаболизм, который в свою очередь составляют свободнорадикальные процессы и деятельность антиоксидантных систем (Мартусевич, 2015). Данная совокупность реакций определяется уровнем различных биорадикалов: перекисью водорода, семихинонами, супероксид-анион радикалом, гидроксильным радикалом, радикалами липидов, радикалами антиоксидантов, фотоиндуцируемыми биорадикалами и активными формами азота. Источниками генерации биорадикалов могут выступать фагоциты, эндотелиальные клетки, нейроны и хромофоры. Образовываться биорадикалы могут также в цепях переноса электронов, в процессе липопероксидации и при действии ядов, токсических соединений и некоторых лекарственных препаратов. Антиоксиданты делятся на 2 группы: гидрофильные и липофильные. К первым относятся аскорбат, глутатион и флавоноиды, а ко вторым – убихинон, токоферол, витамин А и каротиноиды.

С возрастом под влиянием выше перечисленных факторов происходит значительное увеличение уровня биорадикалов, что приводит к разбалансировке прооксидантно-антиоксидантной системы, что, в свою очередь, способствует развитию возрастных

изменений организма (Мартусевич, 2015). Указанное сочетание метаболических сдвигов принято называть окислительным стрессом.

На молекулярно-клеточном уровне окислительный стресс характеризуется трансформациями нуклеиновых кислот, липидных и протеиновых макромолекул, изменением свойств биомембран, и как следствие, дисфункцией клеток (Мартусевич, 2015). На тканевом же уровне это проявляется в форме воспалительной реакции, нейродегенеративных изменений, онкогенеза и т.д.

Роль окислительного стресса в формировании патологий организма человека и животных относительно велика (Мартусевич, 2015). Ассоциированы с развитием окислительного стресса следующие заболевания: сахарный диабет, катарактогенез, гепатопатии, аутоиммунная патология, патология суставов, атеросклероз, инсульт, инфаркт, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и онкопатология. В общей сложности в патогенезе более ста заболеваний организма человека и животных принимает участие окислительный стресс.

1.4. Применение клеточной терапии при патологиях различных органов

Развивающимся направлением клеточной медицины является использование мезенхимальных стволовых клеток, способных к остеогенной, хондрогенной, адипогенной и миогенной дифференцировке, и участвующих таким образом в улучшении состояния повреждённых тканей (Шахпазян, 2012).

Источники получения мезенхимальных стволовых клеток делят на взрослые и неонотальные (Шахпазян, 2012). К первым относят костный мозг, периферическую кровь, жировую ткань, и все ткани, имеющие соединительный компонент, ко вторым относят пуповинную кровь, амниотическую жидкость, плаценту, плодные оболочки, пупочный канатик, Вартонов студень.

Важнейшим свойством мезенхимальных стволовых клеток, является способность взаимодействовать с другими клетками как *in vitro*, так и *in vivo*, которая реализуется за счет непосредственных клеточных контактов и посредством продукции паракринных факторов (Шахпазян, 2012). При взаимодействии с клетками тканей организма выделяют следующие эффекты: иммуномодулирующий и противовоспалительный эффект, благодаря взаимодействию с клетками иммунной системы; трофический и антиапоптотический эффект, благодаря взаимодействию с клетками повреждённых тканей; улучшение васкуляризации тканей, стимулируя ангиогенез; обеспечение гемопоэза, формируя строму для гемопоэтических предшественников.

Мировой опыт клинического использования мезенхимальных стволовых клеток представлен многими трансплантациями при различных заболеваниях (Иванов, 2009). В Великобритании в 2007 г. разработана методика воссоздания ткани, выполняющей роль сердечного клапана. Кроме этого, в 2007 г. проведены клинические испытания лечения болезней периферических артерий («Indiana Center»). Кроме того, применение мезенхимальных стволовых клеток эффективно при мышечной дистрофии Дюшена. Данное заболевание является наследственным, и заключается в компенсации деградированных мышечных волокон мышечными фибриллами. При введении стволовых клеток часть мигрирует в скелетные мышцы, где сливается с миофибриллами. Применение мезенхимальных стволовых клеток при лечении сахарного диабета первого и второго типов наблюдается стойкий положительный эффект. При трансплантации СК костного мозга в поджелудочную железу они трансформируются в бета-клетки, продуцирующие инсулин, что ведет к отказу от инсулинотерапии и приема сахароснижающих препаратов (Компания «Реметэкс», испытания под руководством ученых РАМН). Другими исследователями в Нью-Йорке в 2007 г. выделен белок – антиоксидант SS31, проникающий в островковые клетки и укрепляющий мембраны митохондрий, сохраняющий их поляризацию и предотвращающий апоптоз клеток. Мезенхимальные стволовые клетки участвуют в лечении артрозов и остеохондрозов. Действие клеток при этих состояниях основано на улучшении питания пораженных суставов и тканей позвоночника, обмена веществ в позвонках и во всем организме. Это обеспечивает активацию восстановительных процессов в пораженных тканях (Иванов, 2009).

1.5. Строение, функции и возрастные изменения надпочечников крыс

Одно из общих свойств живых организмов – способность к адаптации, которая заключается в обеспечении самосохранения и самоподдержания живой системы в меняющихся условиях внешней среды путём метаболических изменений в организме (Розен, 1994). Комплекс реакций, направленный на создание устойчивости (резистентности) организма к любому фактору, обозначается как общий (генерализованный) адаптационный синдром, в динамике которого прослеживается 3 стадии. Первая – реакция тревоги, характеризующаяся активной мобилизацией адаптационных процессов на всякое смещение гомеостаза (первичный шок). В это время устойчивость организма к воздействиям быстро возрастает. Вторая – стадия резистентности. В ней устанавливается повышенная сопротивляемость организма ко всем

факторам стресса, независимо от того, какой фактор вызвал первичный шок. Третья – стадия истощения, возникающая в момент ослабления защитно-приспособительных механизмов организма. Она характеризуется снижением резистентности организма к различным видам стрессовых воздействий (вторичный шок).

Известно, что одним из важнейших организаторов реализации общего адаптационного синдрома в организме позвоночных животных при различных формах стресса является гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система (Розен, 1994). Так, при любых достаточно сильных (не обязательно экстремальных) воздействиях на организм всегда отмечается усиление секреции кортиколиберина гипоталамусом, кортикотропина гипофизом и глюкокортикоидов корой надпочечников. В случае, когда стресс слишком сильный или длительный, отмечается истощение защитно-приспособительных механизмов, и на этом фоне развиваются многие патологические процессы.

1.5.1. Анатомия надпочечников

Надпочечники крысы представляют собой парные эндокринные железы пирамидальной формы желтоватого цвета (Сапин и др., 2012). Они располагаются забрюшинно в толще околопочечной жировой клетчатки, примыкая к краниальной части каждой почки (рисунок 1).

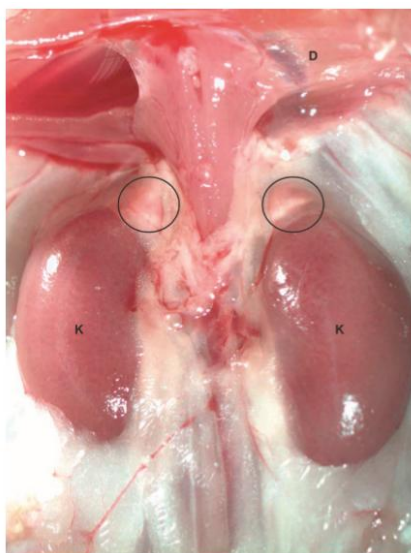


Рисунок 1 – Топография надпочечников крысы линии Wistar. Фото вскрытого животного после удаления печени, селезенки, поджелудочной железы и желудочно-кишечного тракта (по Treuting et al., 2017). Положение надпочечников обозначено круглым маркером

Примечание: К – почка, D – диафрагма.

Кровоснабжение железы осуществляется благодаря проникновению внутрь надпочечника верхней, средней и нижней надпочечниковых артерий, которые представляют собой соответственно ветви нижней диафрагмальной артерии, аорты и почечной артерии (Килесса, 2010). Иннервация осуществляется главным образом волокнами чревных нервов. Эти нервы образуют надпочечниковое сплетение, которое анастомозирует с почечным и солнечным сплетениями, а также с ганглиями последнего.

1.5.2. Микроскопическое строение надпочечника

Надпочечник, как орган, который развивается из разных зародышевых слоев, состоит из двух функционально различающихся тканей: мозгового и коркового веществ.

Каждая часть синтезирует свой класс гормонов. Так, для мозгового вещества характерен синтез катехоламинов, а для коркового вещества – кортикостероидных гормонов (Сапин и др., 2012). Функции катехоламинов во многом совпадают с эффектами возбуждения симпатических нервных волокон за счет сложного взаимодействия с α - и β -адренорецепторами отдаленных органов мишеней. Кортикостероидные гормоны надпочечника крыс участвуют в регуляции углеводного, белкового, липидного и водно-солевого обменов, а также в регуляции активности репродуктивной системы (Килесса, 2010).

На основе особенностей клеток паренхимы, корковое вещество делится на три концентрических зоны, располагающихся извне внутрь железы: клубочковую, пучковую и сетчатую зоны (Janjua, Khan, 1992).

Снаружи органа расположена капсула, которая вместе с сосудами представляет стромальную основу железы. Она состоит из пучков коллагеновых и эластичных волокон, нескольких слоев фиброцитов и гладкомышечных клеток, идущих параллельно наружной поверхности железы (Сапин и др., 2012; Сидоренко и др., 2013). От капсулы радиально вглубь органа отходят пучки соединительнотканых волокон, которые вплетаются в оболочку центральной вены и её ветвей. Эти пучки связаны между собой такими же косо и поперечно направленными перемычками, формируя ячеистую основу, в сотах которых располагаются группы адренокортикоцитов коркового и мозгового веществ (Сапин и др., 2012).

Под капсулой расположена клубочковая зона. Её клетки организованы в группы, поддерживаемые трабекулами соединительной ткани, что в совокупности имеет вид клубочков. В клубочковой зоне синтезируются минералкортикоиды, которые оказывают

избирательное действие на поддержание постоянства системного водно-солевого, кислотно-основного обмена и системного артериального давления. Минералокортикоиды выполняют одну из основных жизненно необходимых задач, задерживая в организме натрий и поддерживая физиологическую осмолярность внутренней среды (Сапин и др., 2012).

За клубочковой зоной следует пучковая, клетки которой являются одними из самых крупных в железе и располагаются в виде длинных клеточных пучков (тяжей). Эти структуры направлены перпендикулярно к поверхности органа и сопровождаются кровеносными капиллярами (Сапин и др., 2012).

Сетчатая зона – самый глубокий слой коры, окружающий мозговое вещество (Килесса, 2010). Клетки этого слоя, располагаясь в виде нерегулярных полос, содержат капельки липоидов и пигмент, распределённый по всей вероятности, – липофусцин. Клетки сетчатой зоны имеют тёмную окраску.

В центре надпочечника находится мозговое вещество (Сапин и др., 2012). Его клетки цилиндрической, кубической или полигональной формы, но под влиянием фиксирующих реактивов они приобретают овальную или звездчатую форму. Группами до шести клеток, расположенными без определенной ориентации, они плотно окружены с внешней стороны капиллярами и сосудистыми синусоидами, они находятся в соединительнотканых ячейках стромы. Клетки этой зоны в основном синтезируют три гормона: адреналин, норадреналин и дофамин.

1.5.3. Возрастные изменения надпочечников

В настоящее время имеется ограниченное число работ, посвященных анализу возрастных изменений надпочечников. В одной из них показано, что в капсуле вместо клеточных элементов начинают преобладать волокна, синтезируемые фибробластами (Zaki et al., 2018) Различные слои коры надпочечника также подвергаются изменениям, включая уменьшение толщины сетчатой и относительное увеличение толщины наружных кортикальных зон. Кроме того, отмечается частичная утрата параллельности клеточных тяжей пучковой зоны (Колдышева, 2008).

1.6. Строение, функции и возрастные изменения яичников крыс

1.6.1. Анатомия яичников

Яичники крыс представляют собой парные железы сферической формы, которые расположены около каудальных полюсов почек и прикреплены к дорзальной стенке брюшной полости (Treuting et al., 2017) (рисунок 2).

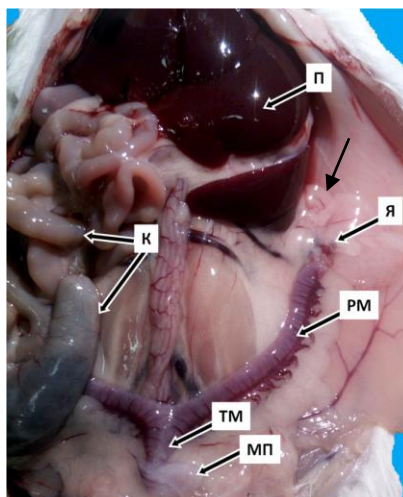


Рисунок 2 – Топография яичников крысы линии Wistar. Фото автора

Примечание: К – кишечник, МП – мочевой пузырь, П – печень, РМ – рог матки, ТМ – тело матки, Я – яичник.

Размер яичника у крыс составляет около 5–7 мм (Bukovsky, 2011). Данная железа заключена в прозрачную эластичную бурсу, которая отделяет перивариальное пространство от брюшной полости, за исключением небольшого канала, через который в яичник проникают кровеносные сосуды и нервы (ворота яичника). Снаружи капсулу окружает жировая ткань, которая формирует наибольшее скопление рядом с воротами. Поверхность яичника гладкая, но с момента наступления половой зрелости становится шероховатой.

1.6.2. Микроскопическое строение яичника

Внешняя и внутренняя поверхности бursы покрыты мезотелием, также в её состав входят кровеносные сосуды, нервы и волокна гладких мышц (Treuting et al., 2017)

(рисунок 3). Поверхность яичника покрыта эпителием, в состав которого входят кубические и столбчатые клетки.

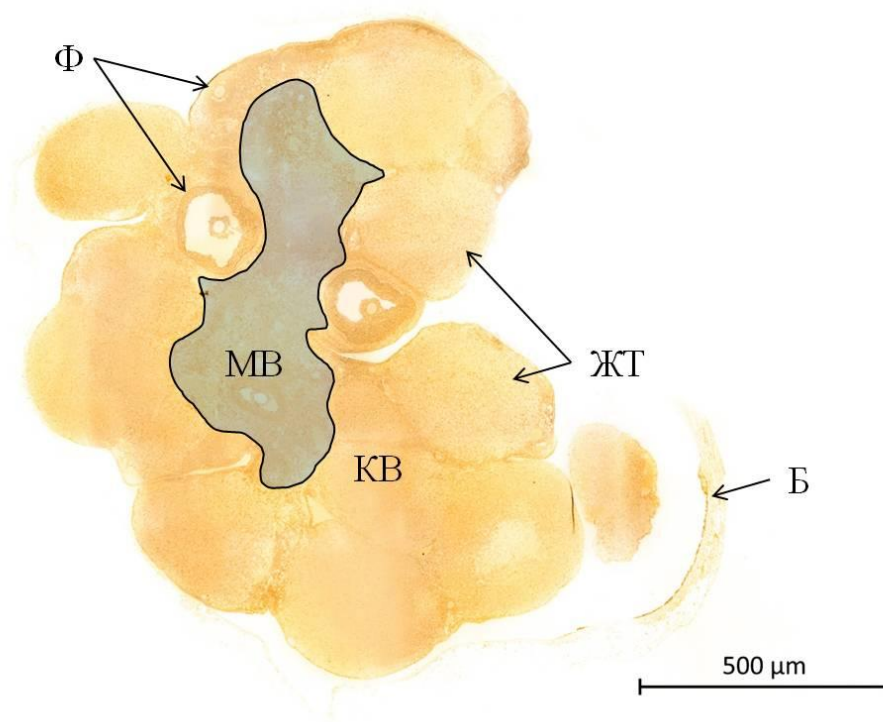


Рисунок 3 – Срез яичника крысы линии Wistar. Окраска соединительной ткани по Ван-Гизону. Фото автора

Примечание: Б – бурса, MB – мозговое вещество, KB – корковое вещество, Ф – фолликулы (разной зрелости), ЖТ – желтое тело.

Яичник состоит из двух структурно различающихся частей: периферической, представляющей собой корковое вещество и центральной – мозговое вещество (Treuting et al., 2017). Кора – более компактная часть яичника относительно мозгового вещества и состоит из фолликулов разных стадий развития и желтых тел, кровеносных сосудов и стромы, которая является каркасом для расположения этих компонентов. Фолликулы в этой зоне расположены плотно. Мозговое вещество образовано волокнистой соединительной тканью, интерстициальными клетками и кровеносными сосудами, плотность которых здесь больше, чем в коре. В мозговом веществе фолликулы расположены более рыхло в сравнении с корой (Parker, Picut, 2016). Созревание фолликулов иногда ориентировано в виде линейного массива, выходящего из ворот к корковой поверхности.

Фолликулы представляют собой основные герминативные элементы яичника, образованные ооцитом I порядка, окруженным фолликулярными клетками (Гунин, 2017). В зависимости от степени зрелости различают следующие виды фолликулов (Гунин, 2017):

- примордиальные фолликулы – самые незрелые, имеются в большом количестве, располагаются, в основном в поверхностных отделах, состоят из ооцита I порядка, окруженного одним слоем плоских фолликулярных клеток;
- первичный фолликул, который только что вступил в рост, состоит из ооцита I порядка, окруженного одним (I однослойный) или несколькими (I многослойный) слоями кубических фолликулярных клеток;
- вторичный фолликул (II многослойный) – это более зрелая форма по сравнению с первичным фолликулом, состоит из ооцита I порядка, окруженного несколькими слоями фолликулярных клеток, между которыми образуются полости, заполненные фолликулярной жидкостью;
- третичный фолликул имеет в центре полость, заполненную жидкостью, а ооцит I порядка и фолликулярные клетки располагаются у стенки фолликула, фолликулярные клетки со всех сторон покрывают ооцит I порядка, имеется сформированная тека;
- зрелый фолликул – это готовый к овуляции фолликул, принципиально имеет такое же строение, что и третичный фолликул, только большего размера;
- атретический фолликул – фолликул, подвергающийся обратному развитию или атрезии, в нём 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 и трансформируется в белое тело.

1.6.3. Функции яичников и их регуляция

Яичник выполняет две различные функции: герминативную, участвуя в образовании половых клеток, и эндокринную, синтезируя стероидные гормоны (Черток, Зенкина, 2015). Существуют различные механизмы регуляции этих процессов. Так, управление функциями женской репродуктивной системы осуществляется центральной нервной системой с участием желёз внутренней секреции по иерархическому принципу:

надгипоталамические структуры – гипоталамус – гипофиз – яичник. Кроме того, в регуляции принимают участие клеточные механизмы, реализуемые в тканях яичника, и механизмы, основанные на таких сигнальных молекулах как газотрансмиттеры.

В основе первого механизма лежит работа нейронов надгипоталамических структур головного мозга, а именно – сводчатой извилины гиппокампа и миндалевидного тела, куда поступает информация о состоянии внешней и внутренней среды организма (Черток, Зенкина, 2015). Акцепторами внутреннего сигнала являются специфические рецепторы нейронов к стероидным гормонам яичника, такие как андрогены, прогестероны и эстрогены. Акцепторами сигналов изменения факторов внешней среды выступают нейроны головного мозга, ответной реакцией которых является синтез и секреция нейротрансмиттеров и нейропептидов. Они оказывают влияние на продукцию и выделение таких гормонов ядрами гипоталамуса, как либерины и статины, а также гипофиза – фолликулстимулирующий гормон (ФСГ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ). Последние два гормона стимулируют в яичнике рост фолликулов, образование андрогенов в тека-клетках, регулируют синтез прогестерона в лютеинизированных клетках жёлтого тела и участвуют в ряде других процессов, связанных с генеративной и эндокринной функциями яичника.

В регуляторных механизмах участвуют следующие структуры яичника: фолликулярный эпителий, интерстициальные клетки внутренней теки и стромы, клетки атретического и жёлтого тела (Черток, Зенкина, 2015). При этом интерстициальные клетки стромы, внутренней теки растущих фолликулов и атретических тел в настоящее время рассматривают как эндокринные, которые производят весь спектр половых гормонов: прогестерон, эстрогены и андрогены. Так, например, тека продуцирует предшественников эстрогенов, а дальнейшее превращение в эстрогены происходит в фолликулярных клетках. Кроме того, помимо гормонов соматическими и половыми клетками синтезируются различные интраовариальные факторы регуляции фолликулогенеза и овуляции, например, мейоз-регулирующие факторы, факторы, регулирующие пролиферацию ооцитов и соматических клеток яичника, факторы, обладающие онкогенным эффектом в эстрогензависимых тканях и другие (Боровая и др., 2010).

В роли газотрансмиттеров выступают такие соединения как оксид азота (NO), сероводород (H₂S), монооксид углерода (CO) (Черток, Зенкина, 2015). Эти вещества схожи с классическими медиаторами, но в отличие от последних у газотрансмиттеров нет специфических рецепторов на постсинаптической мембране, они выделяются из любого участка клетки и могут передавать сигнал в обратном направлении, не накапливаются в синаптических пузырьках и не освобождаются экзоцитозом. Механизм передачи сигнала

основывается на прямом молекулярном взаимодействии и химической модификации внутриклеточных протеинов, что изменяет метаболизм клетки.

1.6.4. Овариальный цикл яичников

Серая крыса относится к полиэстричным животным (Бессалова, 2006). Её эстральный цикл делится на 4 стадии: предтечка (проэструс), течка (эструс), послетечка (метаэструс), стадия покоя – интервал между циклами (диэструс). Овариальный цикл самки крысы представляет собой периодические изменения тканей яичников, в которых отмечается рост и созревание фолликула, выделение из фолликула яйцеклетки посредством процесса овуляции, развитие и регрессия жёлтого тела (Думитру, 1981).

Возрастная периодизация репродуктивной системы белых крыс включает следующие основные этапы: 1-е сутки жизни – в яичниках происходит первое мейотическое деление ооцитов и формирование примордиальных фолликулов; 30-е сутки – в яичниках впервые появляются полостные фолликулы; 60-е сутки – период полового созревания; 90-е сутки – появляется первая течка (овуляция); 180-е сутки – расцвет репродуктивной функции; 360-е сутки – период зрелости, предшествующий старческому увяданию; более 400 суток – угасание половой функции (Бессалова, 2006).

На основании функциональных и морфологических изменений в яичнике овариальный цикл можно разделить на 3 фазы: фолликулярную, овуляторную и лютеиновую (Хеффнер, 2003). Индуцируют циклические изменения в яичнике гонадотропины гипофиза.

Фолликулярная фаза характеризуется следующими последовательными событиями: активация покоящихся фолликулов, развитие из них первичных одно- и многослойных фолликулов, переход преантральных фолликулов во вторичные фолликулы с одной полостью, селекция из числа последних доминантных фолликулов (Хеффнер, 2003). В начале этой фазы увеличение ФСГ индуцирует пролиферацию клеток фолликулов и увеличение на их мембранах рецепторов к ЛГ. Активность ароматазы возрастает, что приводит к образованию эстрогенов из андрогенов. В середине и в конце фазы продолжается синтез эстрогенов и ингибина В. Действие этих гормонов приводит к торможению продукции ФСГ и увеличению секреции ЛГ.

В середине овариального цикла происходит овуляция (Боровая и др., 2010). Этот процесс характеризуется определёнными событиями, происходящими с доминантными фолликулами: овоциты возобновляют мейоз, становятся компактными, париетальная стенка фолликула становится тоньше в месте презумптивной стигмы, ткани яичника над

фолликулом становятся податливыми разрыву. В этот период наблюдается пик эстрогенов, что стимулирует секрецию ЛГ (Хеффнер, 2003). С момента выброса ЛГ повышается содержание прогестерона и простагландинов, что в конечном итоге и вызывает овуляцию фолликулов.

После овуляции фолликулов на их месте образуются жёлтые тела (Хеффнер, 2003). Если беременность не наступает, то желтые тела спонтанно регрессируют, и начинается развитие новых фолликулов для следующего цикла. Этими эндокринными железами секретируется большое количество таких гормонов как прогестерон, эстроген и ингибин, которые попадают в системный кровоток, затормаживая секрецию ЛГ.

1.6.5. Возрастные изменения яичников

Очевидно, что репродуктивная система самок крыс, как и другие системы, подвергается возрастным изменениям. Например, это может выражаться в количестве герминативных элементов яичника – фолликулов. Полагают, что стимулом для инициации роста примордиальных фолликулов является величина общей популяции этих фолликулов в яичнике (Боровая и др., 2010). К приближению стадии позднего онтогенеза резерв примордиальных фолликулов снижается до критической отметки, и инициация роста примордиальных фолликулов нарушается. Наряду с этим яичники у самок крыс 18-ти месяцев и старше становятся атрофичными и отличаются по морфологии от яичников половозрелых крыс относительным уменьшением числа примордиальных фолликулов, фолликулов на разной стадии нормального развития или атрезии и свежих жёлтых тел, а также разрастанием фиброзной ткани (Волков, 2014). Яичники возрастных крыс могут также характеризоваться группами случайно расположенных интерстициальных клеток и многочисленных фагоцитарных клеток с цитоплазмой, заполненной желтоватым липофусциноподобным пигментом (Burek, 1978). Кровеносные сосуды яичника возрастных крыс характеризуются увеличением диаметра просвета сосудов, а также утолщением их стенки (Алексеев, 2016).

2. Материалы и методы

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

Линия Wistar, выведена в 1906 г. тремя исследователями: физиологом Генри Дональдсоном, научным руководителем Милтоном Дж. Гринманом и генетическим исследователем и эмбриологом Хелен Дин Кинг в институте Вистар в Филадельфии (Пенсильвания) (Bonnie, 1993). Линия получена в результате тесного инбридинга крыс внутри одной популяции *Rattus norvegicus* и непрерывного отбора желаемых признаков. достигнута генетическая однородность экспериментальных моделей т.е. получены «стандартные» животные, с анатомическими, генетическими и биометрическими характеристиками измеряемые в пределах известного диапазона вариаций. Линию Wistar продолжают использовать в настоящее время в качестве модельных объектов в широком спектре научных и медицинских дисциплин, включая неврологию, исследования питания, поведенческую психологию, геронтологию и другие дисциплины.

Данное исследование проведено на самках крыс линии Wistar массой 250–300 г, в возрасте 18-месяцев ($n = 12$). Животные содержались в стандартных условиях вивария филиала «ТНИИКиФ» СибФНКЦ ФМБА России по 6 особей в клетке при естественном освещении, на стандартном рационе и свободным доступом к воде и корму. Круглосуточно в виварии поддерживалась относительная влажность 50–65 % и температура воздуха 20–25 °C. 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

Длительность эксперимента составила 24 дня.

Для исследований животных разделили на две экспериментальные группы: интактная и опытная.

- интактная группа ($n = 6$) – крысы, которые не подвергались никаким экспериментальным воздействиям
- опытная группа ($n = 6$) – животные, которым трёхкратно внутримышечно инъецировали суспензию мезенхимальных клеток (2,5 мл) в количестве 1×10^6 .

Инъецирование выполнил младший научный сотрудник филиала ТНИИКиФ СибФНК ФМБА России С. А. Межерицкий. После завершения эксперимента всех животных выводили одномоментным декапитированием под CO_2 -наркозом.

2.3. Выделение ядросодержащих клеток костного мозга

Для того что бы получить как можно больше информации о клетках ткани, разработаны способы выделения отдельных её клеток и разделения их по типам (Альбертс и др., 2012). Эти приемы позволяют получить относительно однородные популяции клеток, которые можно анализировать либо напрямую, либо после значительного увеличения их количества за счёт пролиферации в культуре.

Выделение мезенхимальных клеток костного мозга выполнено С.А. Межерицким.

В настоящей работе в качестве доноров стволовых клеток выступали половозрелые самцы крыс линии Wistar. Животных выводили одномоментным декапитированием под CO_2 -наркозом. Для выделения костного мозга иглу шприца вводили поочередно в медиальный и латеральный мышечки дистального эпифиза бедренной кости и вымывали костный мозг 5 мл охлажденной культуральной среды DMEM в стерильную пробирку. Полученный материал ресуспендировали путем многократного пропускания через иглу (без образования пены). Затем клеточную суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 500 об./мин. Надосадочную жидкость заменяли 2 мл полной культуральной среды, содержащей 85% среды DMEM/F12 («ПанЭко», Россия); 10% сыворотки крови эмбрионов коров («ПанЭко», Россия); 280 мг/л L-глутамин («ПанЭко», Россия); 8 мг/л смеси пенициллин/стрептомицин («Sigma», США). Оценку жизнеспособности полученных клеток костного мозга выполняли с помощью красителя трипанового синего (ISO 10993-5), который не способен проникать через цитоплазму живых клеток (Шахов и др., 2004).

Для этого смешивали равные объемы суспензии клеток костного мозга и 0,16–0,20% трипанового синего, приготовленного на физиологическом растворе. Далее клетки инкубировались 10 мин при 37 °С, помещались в камеру Горяева, где производили подсчет в процентах неокрашенных клеток от общего количества клеточных элементов.

2.4. Получение культуры клеток костного мозга

Выращенные в культуре клетки представляют собой более однородную популяцию для извлечения материала, нежели интактная ткань (Альбертс и др., 2012). В подходящих условиях ядродержащие клетки костного мозга могут расти, делиться и дифференцироваться. При этом клетки можно непрерывно исследовать под микроскопом или анализировать их биохимическими методами.

Культивирование мезенхимальных клеток костного мозга выполнено С. А. Межеричким.

Методика культивирования заключалась в следующем: суспензию отмытых клеток костного мозга переносили в специальные флаконы, приливая 5–7 мл культуральной среды. Клетки выращивали в течение 7 дней в атмосфере, содержащей 5% углекислого газа при температуре 37 °С и 100% влажности. Контроль формирования на дне флакона колоний адгезированных клеток осуществляли с помощью микроскопа Optika XDS-2SFL («Optika Microscopes», Италия) в режиме 20- и 40-кратного увеличения. Каждые 3-е суток производили замену питательной среды с целью элиминации не прикрепившихся клеток. На 6–7-е сутки образовывался 60–70% монослой. На 12–14-е сутки культивирования формировался 95–100% монослой стволовых клеток.

После завершения культивирования питательную среду удаляли. Монослой клеток снимали с адгезионной поверхности флаконов, инкубируя в течении 7–10 мин при 37 °С в присутствии 5–7 мл 0,25% раствора трипсина («ПанЭко», РФ). Полученную клеточную суспензию переносили в пробирки и центрифугировали в течение 10 мин при 500 об./мин. После данной процедуры вновь определяли жизнеспособность клеток по методике, описанной в подразделе 2.3.

2.5. Гистологические методы исследования

После выведения и взятия крови, с целью забора органов производилось вскрытие животных по стандартной методике (Коптяева, 2018). Для вскрытия брюшной полости делали разрез мышечной стенки от нижней части брюха вдоль средней линии тела,

отгибая пинцетом и закрепляя припаравальными иглами, участок брюшной стенки. Далее приподнимая пинцетом и отделяя от окружающих тканей извлекали левый надпочечник и левый яичник, и помещали в ёмкость с фиксатором.

Гистологическую обработку органов проводили стандартными методами (Ярцев, 2019). После фиксации в 10% растворе формалина органы обезвоживали в растворах этанола возрастающей крепости (70%, 95%, 98%), просветляли в бутаноле и проводили заливку в парафин (приложение А). Срезы толщиной 5 мкм, изготавливали на ротационном микротоме RMD-3000 («МТPoint», Россия). После изготовления срезы переносили на предметные стёкла с белок-глицериновым покрытием. Для исследования надпочечников использовали срезы только с их центральной части, яичник нарезали полностью. Окраску срезов надпочечников осуществляли гематоксилином Майера и эозином (Ярцев, 2019) (приложение Б). Окраску срезов яичников осуществляли двумя методами: образцы стёкол с нечётными номерами окрашивали по Ван-Гизону, образцы стёкол с чётными номерами – модифицированным азаном (приложение Б) (Ярцев, 2019). Окрашенные препараты заключали в синтетическую монтирующую среду. После того как монтирующая среда застыла препараты считались готовыми для дальнейшего анализа. Всего изготовлено 63 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 морфофункционального состояния надпочечников разными авторами используется широкий спектр показателей (Janjua, 1992; Прошина, 2006; Калашникова, 2007; Волков, 2014а; Колдышева, 2018; Zaki, 2018). Показано, что наиболее информативными показателями являются ширина коры надпочечника, объёмные и поверхностные плотности адренокортикоцитов, их ядер и синусоидов разных зон коры адреналовой железы, по которым можно судить об активации стрессовой реакции надпочечниками. Для морфологической характеристики надпочечников у экспериментальных животных нами выбраны следующие параметры: относительная площадь мозгового (ОП МВ) и коркового веществ (ОП КВ), относительная площадь клубочковой (ОП КЗ), пучковой (ОП ПЗ) и сетчатой зон (ОП СЗ), площадь ($S_{\text{я}}$) и объём ядер ($V_{\text{я}}$), площадь цитоплазмы ($S_{\text{ц}}$) и самих адренокортикоцитов ($S_{\text{кл}}$) в пучковой зоне коркового вещества, для оценки которых получены следующие показатели (таблица 1).

Таблица 1 – Используемые морфометрические показатели надпочечников

Первичные (измеренные) показатели	
Площадь надпочечника, мкм ²	$S_{\text{общ}}$
Площадь мозгового вещества мкм ²	$S_{\text{МВ}}$
Площадь пучковой и сетчатой зон и мозгового вещества, мкм ²	$S_{(\text{ПЗ}+\text{СЗ}+\text{МВ})}$
Общая площадь сетчатой зоны и мозгового вещества, мкм ²	$S_{(\text{СЗ}+\text{МВ})}$
Площадь ядер адренокортикоцитов, мкм ²	$S_{\text{я}}$
Площадь адренокортикоцитов, мкм ²	$S_{\text{кл}}$
Максимальный диаметр ядра, мкм	$D_{\text{max я}}$
Минимальный диаметр ядра, мкм	$D_{\text{min я}}$
Вторичные (рассчитанные) показатели	
Площадь клубочковой зоны, мкм ²	$S_{\text{КЗ}} = S_{\text{общ}} - S_{(\text{ПЗ}+\text{СЗ}+\text{МВ})}$
Площадь пучковой зоны, мкм ²	$S_{\text{ПЗ}} = S_{(\text{ПЗ}+\text{СЗ}+\text{МВ})} - S_{(\text{СЗ}+\text{МВ})}$
Площадь сетчатой зоны, мкм ²	$S_{\text{СЗ}} = S_{(\text{СЗ}+\text{МВ})} - S_{\text{МВ}}$
Площадь коркового вещества, мкм ²	$S_{\text{КВ}} = S_{\text{КЗ}} + S_{\text{ПЗ}} + S_{\text{СЗ}}$
Относительная площадь коркового вещества, %	$\text{ОП КВ} = (S_{\text{КВ}}/S_{\text{общ}}) \times 100$
Относительная площадь мозгового вещества, %	$\text{ОП МВ} = (S_{\text{МВ}}/S_{\text{общ}}) \times 100$
Относительная площадь клубочковой зоны, %	$\text{ОП КЗ} = (S_{\text{КЗ}}/S_{\text{общ}}) \times 100$
Относительная площадь пучковой зоны, %	$\text{ОП ПЗ} = (S_{\text{ПЗ}}/S_{\text{общ}}) \times 100$
Относительная площадь сетчатой зоны, %	$\text{ОП СЗ} = (S_{\text{СЗ}}/S_{\text{общ}}) \times 100$
Площадь цитоплазмы адренокортикоцитов, мкм	$S_{\text{ц}} = S_{\text{кл}} - S_{\text{я}}$
Ядерно-цитоплазматическое отношение	$\text{ЯЦО} = S_{\text{я}}/S_{\text{ц}}$
Объём ядер адренокортикоцитов, мкм ³	$V_{\text{я}} = 3,14/6 \times D_{\text{max я}} \times D_{\text{min я}}^2$

Для оценки морфофункционального состояния яичников разными авторами используется широкий спектр показателей (Mandl and Zuckerman, 1951; Jones, 1960; Зенкина, 2007; Волков, 2014б; Алексеев, 2016). В настоящей работе в качестве параметров, описывающих состояние яичника, использовали количество и соотношение разных герминативных элементов органа, поскольку по количественной динамике данных структур яичника можно объективно судить о репродуктивной активности органа (Mandl, 1950). На срезах подсчитывали количество примордиальных, первичных однослойных и многослойных, а также число зрелых фолликулов и желтых тел. Подсчеты проводились по всей поверхности среза. При их подсчёте учитывались лишь те фолликулы, в которых срезы овоцитов содержали ядра.

Примордиальные и первичные однослойные фолликулы подсчитывали по специальному подходу (Mandl, 1950): на каждом 11-ом срезе, складывали эти значения, получившуюся сумму умножали на поправочный коэффициент 7/9, а после получившееся значение умножали на 11. На каждом 5-ом срезе подсчитывали от первичного двухслойного фолликула до антрального, складывали значения и получившуюся сумму умножали на 5. Жёлтые тела подсчитывались в срединном срезе органа. Также в настоящей работе вычислялся коэффициент вызревания фолликулов – процент различных структур по отношению к суммарному числу всех изучаемых объектов.

2.6. Определение содержания кортикостерона в сыворотке крови

Для более полной интерпритации результатов гистологического анализа надпочечной железы привлечён дополнительный материал – содержание кортикостерона в крови, которое позволит установить возможное развитие стресса в организме экспериментальных животных. Измерение уровня кортикостерона осуществляли А. А. Гостюхина и А. В. Моисеева. Полученные результаты любезно предоставлены авторами.

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

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, нанесённых 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 инкубировали 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 («Awareneaa Technology Inc», США) при длине волны 450 нм. Концентрацию гормона вычисляли по калибровочной кривой из прилагаемого набора (Егоров, 1991; Круглов, 2010).

2.7. 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 теста Манна–Уитни в зависимости от характера распределения вариационных рядов. При проверке статистических гипотез достоверным считали уровень значимости менее 5% ($p < 0,05$).

3. Результаты и их обсуждение

Раздел «Результаты и их обсуждение» (стр. 30–39) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Раздел «Результаты и их обсуждение» (стр. 30–39) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Раздел «Результаты и их обсуждение» (стр. 30–39) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Раздел «Результаты и их обсуждение» (стр. 30–39) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Раздел «Результаты и их обсуждение» (стр. 30–39) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Раздел «Результаты и их обсуждение» (стр. 30–39) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Раздел «Результаты и их обсуждение» (стр. 30–39) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Раздел «Результаты и их обсуждение» (стр. 30–39) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Раздел «Результаты и их обсуждение» (стр. 30–39) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Раздел «Результаты и их обсуждение» (стр. 30–39) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Заключение содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

ВЫВОДЫ

Выводы содержат результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъяты из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Возрастные морфологические изменения органов женской половой системы [Электронный ресурс] / Алексеев Ю. Д. [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 4. – Электрон. версия печат. публ. – URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24951> (дата обращения: 19.06.2020).
2. Молекулярная биология клетки / Б. Альбертс. [и др.]. – М.–Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», Институт компьютерных исследований. 2012. – 2000 с.
3. Бабийчук Л. В. Влияние гемопозитических стволовых клеток кордовой крови на состояние вегетативной регуляции сердечного ритма у крыс разного возраста / Л. В. Бабийчук, В. Г. Бабийчук, В. В. Мамонтов // Проблемы старения и долголетия – 2012. – Т. 21, № 1. – С. 14–23.
4. Басенко С. Н. Взаимодействие яичников и надпочечников у крыс в регуляции адаптационного ответа на стресс: автореф. дис. канд. мед. наук / С. Н. Басенко. – Ставропольский государственный университет, 1999. – 189 с.
5. Бессалова Е. Ю. Физиологические и структурные методы оценки морфофункционального статуса яичников млекопитающих // Клінічна анатомія та оперативна хірургія, – 2006. – Т. 5, № 3. – С. 85–90.
6. Боровая Т. Г. Интраовариальные регуляторы фолликулогенеза / Т. Г. Боровая, Н. В. Шевлягина, Л. В. Диденко // Успехи физиологических наук – 2010. – Т. 41, № 1. – С. 58–74.
7. Волков В. П. Новый подход к оценке морфофункционального состояния эндокринных желёз [Электронный ресурс] // Universum : медицина и фармакология : электрон. научн. журн. – 2014. – № 9 (10). URL: <http://7universum.com/ru/med/archive/item/1589> (дата обращения: 19.06.2020).
8. Волков В. П. Возрастная динамика количественных морфологических параметров ткани яичников // Инновации в науке. – 2014. – № 31-2. – С. 98–105.
9. ГОСТ 34088-2017. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за сельскохозяйственными животными; введ. 2018–01–08. – М.: Стандартинформ, 2018. – 28 с.
10. Губайдуллина И. З. Особенности двигательной активности крыс различных возрастных групп // Вестник магистратуры. – 2016. – Т.1, № 3 (54). – С. 15–16.

11. Гунин А. Г. Гистология в таблицах и схемах : учебное пособие / А. Г. Гунин. – М. : Практическая медицина, 2017. – 288 с.
12. Давыдов В. В. Состояние адениловой системы в печени взрослых и старых крыс при иммобилизационном стрессе / В. В. Давыдов, И. В. Захарченко, В. Г. Овсянников // Биомедицинская химия. – 2005. – Т. 51, – № 5. – С. 522–526.
13. Физиология и патофизиология воспроизводства человека / И. Думитру [и др.] – Бухарест: Медицина, 1981. – 846 с.
14. Морфология яичников андрогенизированных крыс на фоне приема экстракта из кукумарии / В. Г. Зенкина [и др.] // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2007. – № 4. – С. 40–72.
15. Клиническое использование стволовых клеток / Д. В. Иванов [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2009. – Т. 16, – № 4. – С. 31–33.
16. Радиальная морфометрия эндокриноцитов как способ оценки их функциональной активности / С. А. Калашникова [и др.] // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2007. – № 3. – С. 50–51.
17. Килесса В. В. Глюкокортикоиды // Таврический медико-биологический вестник. – 2010. – Т. 13, – № 3 (51). – С. 228–235.
18. Кишкун А. А. Биологический возраст и старение : возможности определения и пути коррекции : Рук. для врачей / А. А. Кишкун. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 292 с.
19. Колдышева Е.В. Морфологическая характеристика коры надпочечников крыс ОХYS в онтогенезе // Бюллетень СО РАМН. – 2008. – № 6. – С. 131–138.
20. Методика вскрытия и извлечения органов лабораторных животных (крысы) / К. Е. Коптяева [и др.] // Лабораторные животные для научных исследований – 2018. – №. 2. – С. 71–92.
21. Мартусевич А. К. 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.
22. Мороз Г. А. Строение тимуса интактных крыс-самцов линии Вистар разного возраста // Мир медицины и биологии. – 2009. – Т. 5, – № 3-2. – С. 48–52.
23. Мороз Г. А., Озерова Н. Ю. Структурная организация селезенки интактных крыс-самцов линии Вистар 2-х, 6-ти и 12-ти месячного возраста // Таврический медико-биологический вестник. – 2010. – Т. 13, – № 4 (52). – С. 111–114.
24. Прошина Ю. В. Структура аденогипофиза и надпочечников при тяжелой черепно-мозговой травме // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. – 2006. – № 3. – С. 24–28.

25. Розен В. Б. Основы эндокринологии: учебник / В. Б. Розен. – 3-изд., перераб. и доп. – М. : Изд-во МГУ, 1994. – 384 с. : ил.
26. Современные представления о строении и функциях надпочечников / М. Р Сапин [и др.] // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2012. – № 1. – С. 14–20.
27. Сидоренко О. С. Ниши стволовых/прогениторных клеток надпочечников (краткий обзор литературы) / О. С. Сидоренко, Г. А. Божок, Т. П. Бондаренко // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – Т. 2, – № 1. – С. 26–30.
28. Хеффнер Л. Г. Половая система в норме и патологии / Л. Г. Хеффнер ; пер. с англ. А. Г. Гунина – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2003. – 128 с.
29. Влияние постоянного освещения на антиоксидантную систему крыс зависит от возраста животных / Е. А. Хижкин [и др.] // Труды Карельского научного центра Российской академии наук. – 2010. – № 2. – С. 62–67.
30. Черток В. М. Регуляция функций яичников: участие газовых транзиттеров NO, CO и H₂S / В. М. Черток, В. Г. Зенкина // Успехи физиологических наук, – 2015. – Т. 46, – № 4. – С. 74–89.
31. Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей / В. П. Шахов [и др.]. – Под ред. В.В. Новицкого, В.П. Шахова, И.А. Хлусова, Г.Ц. Дамбаева.– Томск : STT, 2004. – 386 с.
32. Шахпазян Н. К. Мезенхимальные стволовые клетки из различных тканей человека: биологические свойства, оценка качества и безопасности для клинического применения / Н. К. Шахпазян, Т. А. Астрелина, М. В. Яковлева // Гены и клетки. – 2012. – Т. 7, – № 1. – С. 23–33.
33. 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.
34. Bonnie T. The wistar rat as a right choice: establishing mammalian standards and the ideal of a standardized mammal // Journal of the History of Biology. – 1993. – Vol. 26, – № 2. – P. 329–349.
35. Bukovsky A. Ovarian stem cell niche and follicular renewal in mammals // The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology. – 2011. – Vol. 294, – № 8. – P. 1284–1306.
36. Burek J. D. Pathology of aging rats: a morphological and experimental study of the age-associated lesions in aging BN/Bi, WAG/Rij, and (WAG X BN) F1 rats / J. D. Burek. – CRC Press, 1978. – 230 p.

37. Sympathetic pharmacological denervation in ageing rats: effects on ovulatory response and follicular population / R. Chávez-Genaro [et al.] // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2007. – Vol. 19, – №. 8. – P. 954–960
38. Janjua M. Z. Age related changes in the rat adrenal cortex / M. Z. Janjua, M. Y. Khan // *The Journal of the Pakistan Medical Association*. – 1992. – Vol. 42, – № 4. – P. 89–94.
39. Jones E. C. The relationships between age, numbers of oocytes and fertility in virgin and multiparous mice / E. C. Jones, P. L. Krohn // *Journal of Endocrinology*. – 1961. – Vol. 21, – № 4. – P. 469–495.
40. Mandl A. M. Numbers of normal and atretic oocytes in unilaterally spayed rats / A. M. Mandl, S. Zuckerman // *Journal of Endocrinology*. – 1951. – Vol. 7, – № 2. – P. 112–119.
41. Parker G. A. *Atlas of Histology of the Juvenile Rat* / G. A. Parker, C. A. Picut. – Academic Press, 2016. – 448 p.
42. Parrott J. A. Skinner M. K. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis / J. A. Parrott, M. K Skinner // *Endocrinology*. – 1999. – Vol. 140, – №. 9. – P. 4262–4271.
43. Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human's // *International Journal of Preventive Medicine*. – 2013. – Vol. 4, – № 6. – P. 624–630.
44. Sharp P. *The Laboratory Rat* / P. Sharp, J. S. Villano. – CRC Press, 2012. – 399 p.
45. Smits G. J., Lefebvre R. A. Influence of aging on gastric emptying of liquids, small intestine transit, and fecal output in rats // *Experimental Gerontology*. – 1996. – Vol. 31, – № 5. – P. 589–596.
46. 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.
47. Stress-induced changes in the aged-rat adrenal cortex. Histological and histomorphometric study / S. M. Zaki [et al] // *Folia Morphologica*, 2018. – Vol. 77, – № 4. – P. 629–641.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Протокол гистологической проводки и парафиновой заливки образцов (по В.В. Ярцеву, 2019)

Для надпочечников крысы:

- 1 Обезвоживание:
 - Этанол 70% (I): 48 ч
 - Этанол 70% (II): 24 ч
 - Этанол 96% (I): 20 ч
 - Этанол 96% (II): 2 ч
 - Этанол абсолютный (I): 2 ч
 - Этанол абсолютный (II): 4 ч 10 мин
- 2 Просветление:
 - Бутанол (I): 19 ч 50 мин
 - Бутанол (II): 44 ч 35 мин
- 3 Пропитывание парафином:
 - парафин (I): 3 ч
 - парафин (II): 3 ч

Для яичников крысы:

- 4 Обезвоживание:
 - Этанол 70% (I): 5 ч
 - Этанол 70% (II): 19 ч
 - Этанол 96% (I): 5 ч
 - Этанол 96% (II): 18,5 ч
 - Этанол абсолютный (I): 4 ч
 - Этанол абсолютный (II): 4 ч
- 5 Просветление:
 - Бутанол (I): 22 ч 30 мин
 - Бутанол (II): 18 ч
- 6 Пропитывание парафином:
 - парафин (I): 4 ч
 - парафин (II): 4 ч

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

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

Обзорное окрашивание гематоксилином Майера и эозином:

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 Майера – 5 мин
 - Водопроводная вода – 5–10 мин
 - Дистиллированная вода – окунут
 - Спиртовой р-р эозина – 0,5–5 мин
 - Дистиллированная вода – окунуть
3. Дегидратация:
 - 70% этанол – кратковременное погружение
 - 96% этанол – 1 мин
 - Абсолютный этанол – 3 мин
 - Бутанол – 10 мин
 - Ксилол – 10 мин
4. Заключение в монтирующую среду

Окрашивание 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
3. Дегидратация:
- 70% этанол – кратковременное погружение
 - 96% этанол – 1 мин
 - Абсолютный этанол – 3 мин
 - Бутанол – 10 мин
 - Ксилол – 10 мин
4. Заключение в монтирующую среду

Окрашивание 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
3. Дегидратация:
- 70% этанол – кратковременное погружение
 - 96% этанол – 1 мин
 - Абсолютный этанол – 3 мин
 - Бутанол – 10 мин
 - Ксилол – 10 мин
4. Заключение в монтирующую среду

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Приложение В (стр. 49–50) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъяты из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Приложение В (стр. 49–50) содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъят из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Приложение Г содержит результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъяты из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2. «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: Степаненко Дарья Андреевна

Проверяющий: Степаненко Ольга Андреевна (stepanenko.darya555@gmail.com / ID: 6928611)

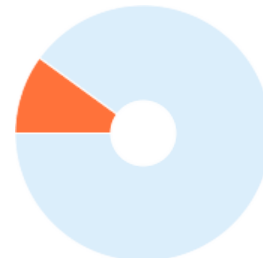
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат»- <http://users.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 8
Начало загрузки: 18.06.2020 20:10:40
Длительность загрузки: 00:00:01
Имя исходного файла: ВКР Степаненко Д.А.txt
Название документа: ВКР Степаненко Д.А
Размер текста: 1 кБ
Символов в тексте: 82372
Слов в тексте: 9637
Число предложений: 656

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)
Начало проверки: 18.06.2020 20:10:42
Длительность проверки: 00:00:04
Корректировка от 18.06.2020 20:19:44
Комментарии: не указано
Модули поиска: Модуль поиска Интернет



ЗАИМСТВОВАНИЯ

10,05%

САМОЦИТИРОВАНИЯ

0%

ЦИТИРОВАНИЯ

0%

ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

89,95%

Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.

Самоцитирования — доля фрагментов текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа, по отношению к общему объему документа.

Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.

Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.

Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.

Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.

Заимствования, самоцитирования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска
[01]	1,63%	https://esu.citis.ru/dissertation/C93QHVVU09002RL1TETKYYSZ	https://esu.citis.ru	20 Мар 2018	Модуль поиска Интернет
[02]	1,34%	Гистоморфология яичников.	http://studopedia.net	14 Ноя 2015	Модуль поиска Интернет
[03]	0%	Гистоморфология яичников	http://mydocx.ru	08 Июл 2016	Модуль поиска Интернет

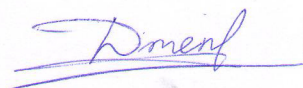
Еще источников: 17

Еще заимствований: 7,09%

Руководителю ООП по
направлению 06.03.01 Биология ТГУ
доктору биол. наук Д. С. Воробьеву
от студента 4 курса Д. А. Степаненко

СЛУЖЕБНАЯ ЗАПИСКА

Прошу разрешить размещение текста моей выпускной квалификационной работы бакалавра «Гистологическая характеристика надпочечников и яичников крыс в позднем онтогенезе под воздействием клеточной терапии», выполненной на базе кафедры зоологии позвоночных и экологии БИ ТГУ (научный руководитель – доцент В. В. Ярцев), в Электронной библиотеке (репозитории) ТГУ с изъятием следующих разделов, поскольку они содержат неопубликованные данные: «3. Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Приложение В», «Приложение Г».



Д. А. Степаненко



ДИРЕКТОР БИ
Воробьев Д.С.