

# Методологія наукових досліджень Scientific research methodology

Шановні колеги! У рубриці „Методологія наукових досліджень” редакція продовжує публікацію матеріалів, що пов’язані з найважливішими аспектами наукової і навчальної діяльності: організаційно-методичним забезпеченням наукових видань, загальними принципами статистичного, біометричного і математичного супроводження досліджень, а також оригінальними методичними підходами вітчизняних і зарубіжних морфологів.

О.А. Григор’єва  
К.С. Ковальчук



Запорізький державний  
медичний університет

Надійшла: 14.11.2018

Прийнята: 20.12.2018

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2018.4.116-121>

## ДО ПИТАННЯ ПРО КЛАСИФІКАЦІЮ ФОЛІКУЛІВ ЯЄЧНИКІВ ЩУРІВ

Hryhorieva O.A. , Kovalchuk K.S.  On the question of classification of rat’s ovarian follicles.  
Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia, Ukraine

**ABSTRACT. Background.** Ovaries, as part of the female reproductive system, play an important role in the normal and adequate functioning of the body. The reproductive system are sensitive to the effects of environmental factors. Among frequent causes of defection in ovarian structure and functions are factors of different backgrounds, and above all - the effect of these factors on the formation of the reproductive system during pregnancy. After all, the fetal period is one of the critical periods of the morphosis. During the pregnancy period female sex hormones are widely used, in particular, progesterone - a hormone of the corpus luteum, which performs a number of important functions and is essential for the normal pregnancy course. So the consequences of intrauterine affection of progesterone on morphogenesis and fetal ovarian functioning have not been sufficiently studied. One of the methods for the morphofunctional status of the ovaries assessment is to calculate and to determine the ratio of follicles at different stages of development. Most part of the publications considering the study of the structure of the follicles and their distribution occurred at the end of the twentieth century. As the basis of proposed classifications of follicles different parameters were taken - diameter of the follicle, the ratio of the diameter of the follicle to the number of follicular cells, the structure of the follicle. **Objective.** To determine the most convenient classification of rat ovarian follicles. **Methods.** Literature data was analyzed, including the International Histological nomenclature. **Results.** The classifications were characterized and the conclusions were drawn about their practical significance for studying the processes of folliculogenesis, especially after the action of various factors. **Conclusion.** The investigation of morphofunctional features of follicles according to various criteria helps to assess in more detail the changes in their structure and functioning and to identify possible pathological changes after the various factors impact, in particular – hormones.

**Key words:** ovary, white rats, follicles, classification, progesterone.

### Citation:

Hryhorieva OA, Kovalchuk KS. [On the question of classification of rat’s ovarian follicles]. Morphologia. 2018;12(4):116-21. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2018.4.116-121>

 Hryhorieva O.A. 0000-0002-6101-8322

 kovalchuk.ks@zsmu.zp.ua

© SI «Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine», «Morphologia»

### Вступ

Яєчник є важливою ланкою жіночої статеві системи, тому його морфофункціональний стан

грає велику роль для всього організму. В акушерсько-гінекологічній практиці часто застосовують жіночі статеві гормони, зокрема препарати

прогестерону. Прогестерон – жіночий статевий гормон, що виробляється жовтим тілом. Під час вагітності прогестерон виконує ряд важливих функцій для її підтримки – пригнічує реактивність імунної системи матері, щоб запобігти відторгненню плода, знижує збудливість міометрію [1, 2]. Але недостатньо інформації щодо наслідків впливу екзогенного прогестерону на плід під час вагітності, а саме - на жіночу репродуктивну систему, що формується. Певна кількість сучасних досліджень присвячені вивченню впливу жіночих статевих гормонів на яєчники шляхом експериментального введення препаратів лабораторним тваринам. Оскільки яєчники щурів та людини мають дуже багато спільного у будові, то білі щури є зручним об'єктом вивчення [3-5].

Підрахунок та розподіл фолікулів яєчників по класам є одним із методів оцінки морфофункціонального статусу органу внаслідок впливу факторів довкілля та прийому лікарських препаратів [6]. Однак немає єдиної думки щодо класифікації фолікулів, оскільки розподіляють їх по різних параметрах.

**Мета дослідження:** проаналізувати літературні джерела, визначити та запропонувати найбільш зручну класифікацію фолікулів у щурів.

#### **Матеріали та методи.**

Огляд літератури проводився за допомогою електронних баз даних. Наступні пошукові терміни були використані у різних комбінаціях українською та латиною: «Яєчники щурів», «Фолікули яєчників», «Класифікація фолікулів яєчників». Було проаналізовано 23 наукові публікації, в тому числі й Міжнародна гістологічна номенклатура. Також були включені дані, отримані в результаті власних морфологічних досліджень – яєчники потомства щурів інтактної та експериментальної груп на 21-шу, 30-ту, 45-ту, 60-ту та 90-ту добу життя. Яєчники експериментальної групи тварин були отримані від самиць, які отримували масляний розчин прогестерону внутрішньом'язово із 15-ої по 18-ту добу вагітності.

#### **Результати та їх обговорення**

Міжнародна гістологічна номенклатура передбачає розподіл фолікулів на примордіальні, первинні, вторинні (порожнинні), а також третинні (граафові) фолікули (табл. 1). Примордіальний фолікул має овоцит, оточений одним шаром плоских епітеліальних клітин, його діаметр близько 15 – 25 мкм. Первинні фолікули мають більший діаметр, однак головною відмінністю між примордіальними і первинними фолікулами є форма фолікулярних клітин. Вони стають кубічними, і оточують овоцит одним або кількома шарами. Вторинні (преантральні) фолікули характеризуються добре вираженою прозорою оболонкою. Овоцит оточений кількома шарами фолікулярних клітин кубічної форми. У товщі фолікулярних клітин починає формуватися порожнина, що заповнена фолікулярною рідиною. Та-

кож може бути кілька порожнин, не з'єднаних між собою. Зрілий, третинний (граафів) фолікул має повністю сформовану порожнину із фолікулярною рідиною, в якій знаходиться яйцеклітина [7, 8].

Т. Pedersen та Н. Peters (1968) розробили класифікацію фолікулів, виходячи із кількісних критеріїв їх оцінки: 1) розмір яйцеклітини на різних етапах розвитку фолікулу; 2) розмір фолікулу, що визначається певною кількістю фолікулярних клітин; 3) морфологію фолікула [9]. Всі фолікули розподілені на три групи – малі, середні та великі (табл. 1). Вони в свою чергу розподіляються на типи згідно кількості фолікулярних клітин, які підраховуються на найбільшому поперечному зрізі фолікула. Фолікули малих розмірів включають 1, 2 та 3а типи. 1 тип фолікулів представляє собою неактивні овоцити, що не мають оточуючих фолікулярних клітин. Малі фолікули типу 2 мають овоцит, оточений 2-3 фолікулоцитами у вигляді несущільного кільця. У 3а типі налічується від 4 до 20 фолікулярних клітин. Тип 3b, 4 та 5а відносяться до фолікулів середніх розмірів. 3b тип налічує 21-60 гранульозних клітин відповідно. 4 тип фолікулів має 2 шари гранульозних клітин (від 61 до 100 клітин), але не має видимої порожнини. 5а тип є проміжною стадією між фолікулами середнього та великого розміру. У таких фолікулів нараховується від 101 до 200 клітин, які розташовані у три шари. Група фолікулів великих розмірів включає 5b, 6 та 7 типи. Для типу 5b характерний повністю сформований овоцит, оточений великою кількістю шарів фолікулярних клітин (від 201 до 400). Фолікули 6 типу (ранні антральні фолікули) мають кілька порожнин, заповнених фолікулярною рідиною. Шари фолікулярних клітин нараховують від 401 до 600. У фолікулах типу 7 формується кумулюс, а кілька порожнин утворюють єдину порожнину фолікула з рідиною, фолікул оточений більше, ніж 600 гранульозними клітинами. 8 тип (преовуляторний фолікул) має добре сформовану порожнину із рідиною та добре виражений кумулюс [6, 10-14]. Але для дослідження яєчників щура ця класифікація не досить придатна, оскільки кількість та розмір фолікулярних клітин у щурів пов'язаний із масою тіла і будуть змінюватись в залежності від неї, на відміну від яєчників миші [15]. Класифікація, запропонована Pedersen Т. та Peters Н., є громіздкою та не досить зручною для вивчення розподілу та динаміки фолікулів. Оскільки підрахунок загальної кількості фолікулярних клітин є досить кропіткою роботою та може мати похибку через суб'єктивний характер оцінювання.

Ф. Gaytan, С. Morales та ін. (1996), запропонували як основний критерій розподілу фолікулів їх діаметр. Його визначали за допомогою двох взаємно перпендикулярних ліній, які проходили через центр овоцита фолікула. Також

враховувалась морфологія фолікулярних клітин [16, 17]. Основними перевагами розподілу фолікулів за діаметром є: швидкість і точність вимірювання даного параметру; показники діаметру відповідного класу фолікулів корелюють із кількістю фолікулярних клітин [15].

Згідно даної класифікації фолікули малі (діаметром до 275 мкм) та великі (діаметр більше 275 мкм) (табл.1). В свою чергу малі фолікули включали в себе п'ять класів: примордіальні – навколо овоцита у вигляді кільця один ряд сплюснутих фолікулярних клітин; одношарові первинні – яйцеклітина також була оточена кільцем фолікулярних клітин, однак серед сплюснутих клітин зустрічаються клітини кубічної форми. Їх кількість варіюється від однієї до повністю кубічного шару клітин. Подальші класи багатшарові: клас А – має 1 – 3 шари фолікулярних клітин, діаметр сягає до 75 мкм; діаметр фолікулів класу В від 76 до 150 мкм; клас С – від 151 до 274 мкм. Великі ж фолікули розподіляються згідно класифікації Османа наступним чином: клас 1 – діаметр 275 – 350 мкм; клас 2 включає фолікули

діаметром від 351 до 400 мкм; клас 3 – від 401 до 450 мкм; клас 4 та клас 5 – від 451 до 575 мкм та більше 575 мкм відповідно [17-20].

Використовують класифікацію, згідно якої фолікули розподілені як примордіальні, зростаючі та атретичні (табл.1). В основу даної класифікації покладено морфологію фолікулів. Примордіальні фолікули мають овоцит, що оточений одним шаром сплюснутих попередників фолікулярних (прегранульозних) клітин. До групи зростаючих фолікулів відносяться первинні, вторинні, везикулярні та третинні. У первинних фолікулах яйцеклітина оточена одним шаром кубічних та сплюснутих фолікулярних клітин. Вторинні характеризуються тим, що навколо овоцита знаходяться два та більше шарів фолікулярних клітин, є сформований шар тека-клітин та наявна zona pellucida. Везикулярні фолікули у шарі фолікулярних клітин мають декілька порожнин, заповнених фолікулярною рідиною. Щодо третинних (або антральних) фолікулів, то вони мають повністю сформовану фолікулярну порожнину та кумулюс [1, 21, 22] (табл.1).

Таблиця 1

Класифікація фолікулів та критерії їх розподілу

Автор	Критерії	Типи (групи) фолікулів	Примітка
Міжнародна гістологічна номенклатура (2010)	Будова фолікула	Примордіальні, первинні, вторинні (преантральні) та третинні (антральні) фолікули	Не є зручною для вивчення яєчників гризунів
Pedersen T., Peters H. (1968)	1) розмір яйцеклітини на різних етапах розвитку фолікула; 2) розмір фолікула, що визначається певною кількістю фолікулярних клітин; 3) загальний вигляд фолікула	Малі, середні та великі. Малі - 1, 2 та 3а; середні - 3b, 4 та 5а; великі - 5b, 6 та 7; тип 8 – преовуляторний фолікул	Дана класифікація розроблена для гризунів, але для вивчення розподілу фолікулів щурів вона не є придатною
Gaytan F., Morales C., Osman P. (2007)	Діаметр фолікула - виміряли за допомогою двох взаємно перпендикулярних ліній, які проходили через центр овоцита.	Фолікули малі ( $\leq 275$ мкм) та великі ( $\geq 275$ мкм). Малі фолікули включали в себе п'ять класів: примордіальні, одношарові первинні, багатшарові ( клас А - $\leq 75$ мкм; клас В - від 76 до 150 мкм; клас С – від 151 до 274 мкм. Великі фолікули: клас 1 – діаметр 275 – 350 мкм; клас 2 включає фолікули діаметром від 351 до 400 мкм; клас 3 – від 401 до 450 мкм; клас 4 та клас 5 – від 451 до 575 мкм та більше 575 мкм	Є досить показовою відносно розподілу, динаміки росту фолікулів, при вивченні проліфераційної активності фолікулярних клітин
D. Dixon, R. Alison, (2014); A. B. Bernal, (2010).	Будова фолікула	Примордіальні, зростаючі та атретичні. До зростаючих відносять: первинні, вторинні, везикулярні та третинні	Часто використовується в дослідженнях, є простою та зручною

Під час дослідження наслідків внутрішньо-утробного впливу прогестерону на яєчники потомства шурів на 45-ту, 60-ту та 90-ту життя було вивчено розподіл та співвідношення фолікулів згідно класифікації їх на примордіальні, первинні, вторинні, везикулярні та третинні [23]. Вибір даної класифікації пояснюється тим, що при під-

рахунку та ідентифікації фолікулів на зрізах, один і той же фолікул можна віднести до різних класів (при товщині зрізу 4,5 мкм), оскільки зріз проходить на різній товщині структур (рис. 1). Тому вимірювання та класифікування фолікулів згідно діаметру в цьому випадку не є зручним і може призвести до помилок.

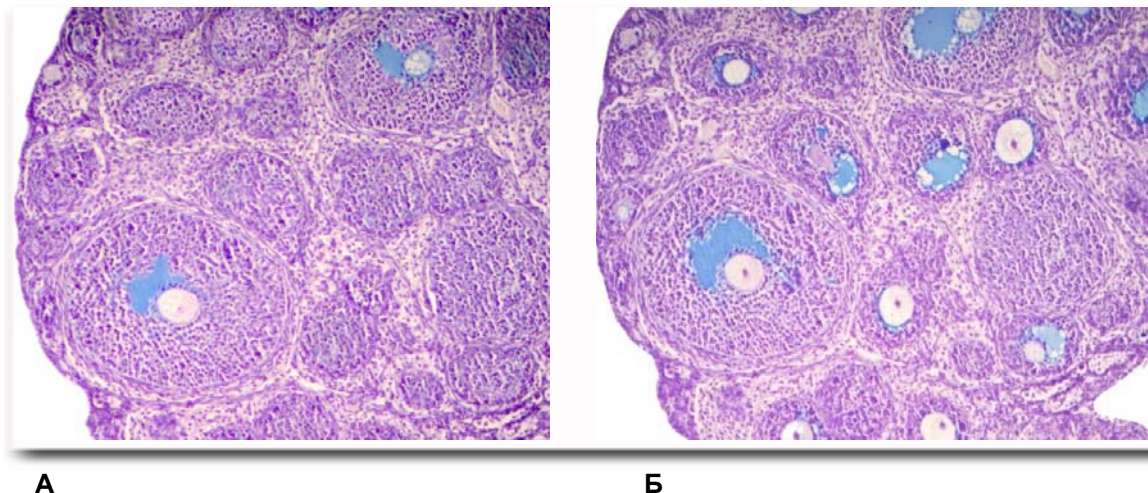


Рис. 1. Вигляд фолікулів яєчника експериментального щура на 21-шу добу життя на різних серійних зрізах (а, б). Забарвлення альціановим синім та гематоксиліном.  $\times 100$ .

На наш погляд, розподіл фолікулів на примордіальні, первинні, вторинні, везикулярні та третинні є зручним при дослідженні впливу внутрішньоутробного впливу прогестерону. Починаючи із 21-ої доби життя, зі збільшенням строку спостереження, до 90-ої доби включно зменшується пул примордіальних фолікулів у обох досліджуваних групах тварин, однак у експериментальних тварин дана тенденція більше виражена. Протягом усього строку спостереження в обох групах були виявлені первинні, вторинні та везикулярні фолікули, але зміни у їх співвідношенні були більш виражені у експериментальній групі. На 90-ту добу життя спостерігаються третинні фолікули як у експериментальних, так і у інтакт-

них тварин. При використанні даної класифікації можна простежити залучення фолікулів у процес росту та диференціювання, а також співвідношення різних стадій у певний період життя.

#### Підсумок

Більша частина робіт, присвячених вивченню фолікулів яєчників, а саме їх класифікації, припадає на кінець ХХ століття. Із практичної точки зору, найбільш зручною та показовою є класифікація, згідно якої фолікули розподіляються на примордіальні, первинні, вторинні, везикулярні та третинні, а не класифіковані згідно показників діаметру. Оскільки, на різних зрізах одного яєчника один і той же фолікул може бути ідентифікований і як малий, і як великий.

#### Літературні джерела References

1. Boychuk AV, Nikitina IM, Sukharev AB, Kalashnikov NV, Babar TV. [Possibilities of the treatment of preterm labor of multiple pregnancy using sublingual forms of micronized progesterone]. Actual problems of pediatry, obstetrics and gynecology. 2018;1:41-7. Ukrainian. DOI 10.11603/24116-4944.2018.1.8625
2. Grekova SP, Vodjanyk MO, Chernyshov VP. [The effect of progesterone and estradiol on the effect of costimulation of proliferation by proinflammatory cytokines]. Fiziologichnyj Zhurnal. 2002;48(4):63-9. Ukrainian

3. Kolmakova Yu B, Uchakina RV, Ryzhavsky BYa. [The effect of progesterone introduction of newborn rats in indices of brain, gonads and adrenal development]. Far East Medical Journal. 2010;1:94-8. Russian.
4. Shkil NN, Sokolov MY, Smolyaninov YI, Belyaeva NY. [Studying the effect of ovarian stimulation in rats by the drugs Ovarinin and Folligon]. Siberian Herald of Agricultural Science. 2016;1:51-8. Russian.
5. Zenkina VG, Karedina VS, Solodkova OA, Slutskaya TN, Yufereva AN. [Ovary morphology in

androgenized rats when taking cucumaria-containing extract]. Pacific medical journal. 2007;4:70-2. Russian.

6. Bessalova YeYu. [Physiologic and structural methods of evaluating the morphofunctional status of the ovaries of mammals]. Clinical anatomy and operative surgery. 2006;5(3):85-90. Russian.

7. Lutsik AD, Ivanova AY, Kabak KS, Chaikovskiy YuB et al. [Histologiya lyudyny]. Kyiv: Knygaplus; 2003. 592 p. Ukrainian.

8. Lutsik AD, Chaikovskiy YuB et al. [Histologichna terminologiya. Mizhnarodna terminologiya z cytologiyi ta histologiyi lyudyny]. Kyiv: Medytsyna; 2010. 304 p. Ukrainian.

9. Pedersen T, Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. J ReprodFertil. 1968;17:555-7. PMID: 5715685

10. Hirshfield AN, De Santi AM. Patterns of ovarian cell proliferation in rats during the embryonic period and the first three weeks postpartum. Biol Reprod. 1995;53(5): 1208-21. PMID:8527527

11. Kezele P, Skinner MK. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. Endocrinology. 2003;144(8):3329-37.

12. Mazaud S, Guyot R, Guigon CJ, Coudouel N, Le Magueresse-Battistoni B, Magre S. Basal membrane remodeling during follicle histogenesis in the rat ovary: contribution of proteinases of the MMP and PA families. Dev Biol. 2005;277(2):403-16. DOI:10.1016/j.ydbio.2004.10.001

13. Picut CA, Dixon D, Simons ML, Stump DG, Parker GA, Remick AK. Postnatal ovary development in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. Toxicol Pathol. 2015;43(3):343-53. DOI: 10.1177/0192623314544380.

14. Yoshida M, Sanbuisyo A, Hisada S, Takahashi M, Ohno Y, Nishikawa A. Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. J Toxicol Sci. 2009;34(1):189 – 97. PMID: 19265285.

15. Hirshfield AN, Midgley AR. Morphological analysis of follicular development in the rat. Biology

of reproduction. 1978;19:597-605.

16. Cheng-kang X, Yun-he Zh. Apoptosis of rat's ovarian follicle cells induced by triptolide in vivo. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2010;4(6):422-30.

17. Gaytán F, Morales C, Bellido C, Aguilar E and Sanchez-Criado JE. Proliferative activity in the different ovarian compartments in cycling rats estimated by the 5-bromodeoxyuridine technique. Biol Reprod. 1996;54:1356-65.

18. Duggal PS, Van Der Hoek KH, Milner CR, Ryan NK, Armstrong DT, Magoffin DA, Norman RJ. The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. Endocrinology. 2000;141(6):1971–6. DOI: 10.1210/endo.141.6.7509

19. Osman P. Rate and course of atresia during follicular development in the adult cyclic rat. J Reprod Fertil. 1985;73(1):261-70. PMID: 4038517

20. Takagi K, Yamada T, Miki Y, Umegaki T, Nishimura M, Sasaki J. Histological observation of the development of follicles and follicular atresia in immature rat ovaries. Acta Med Okayama. 2007;61(5):283–9. DOI: 10.18926/AMO/32892

21. Bernal AB, Vickers MH, Hampton MB, Poynton RA, Sloboda DM. Maternal undernutrition significantly impacts ovarian follicle number and increases ovarian oxidative stress in adult rat offspring. PLoSOne. 2010;5(12):e15558. DOI: 10.1371/journal.pone.0015558.

22. Dixon D, Alison R, Bach U, Colman K, Foley GL, Harleman JH, Haworth R, Herbert R, Heuser A, Long G, Mirsky M, Regan K, Van Esch E, Westwood FR, Vidal J, Yoshida M. Non-proliferative and proliferative lesions of the rat and mouse female reproductive system. J Toxicol Pathol. 2014;27(3-4):1S-107S. DOI: 0.1293/tox.27.1S.

23. Hryhorieva OA, Kovalchuk KS. [Features of the ovarian internal structure of the offspring of rats after the progesterone administration during pregnancy]. Bulletin of scientific research. 2018;2:125-8. Ukrainian. DOI 10.11603/2415-8798.2018.2.9001

### **Григор'єва О.А., Ковальчук К.С. До питання про класифікацію фолікулів яєчників щурів.**

**РЕФЕРАТ. Актуальність.** Яєчники як частина жіночої репродуктивної системи грають важливу роль у нормальному та повноцінному функціонуванні організму. Репродуктивна система є дуже чутливою до дії факторів довкілля. Частими причинами порушення у будові та функції яєчників виступають чинники різного походження, а надто – дія та вплив цих чинників на формування репродуктивної системи під час вагітності. Адже внутрішньоутробний період є одним із критичних періодів розвитку організму. Широко застосовуються під час вагітності жіночі статеві гормони, зокрема прогестерон – гормон жовтого тіла, який виконує ряд важливих функцій і є необхідним для нормального перебігу вагітності. Однак наслідки внутрішньоутробного впливу прогестерону на морфогенез та функціонування яєчників плода не досить вивчені. Одним із методів оцінки морфофункціонального статусу яєчників є підрахунок та визначення співвідношення фолікулів на різних стадіях розвитку. Більша частина робіт, присвячених вивченню будови фолікулів та їх розподілу прийшла на кінець ХХ століття. В основу запропонованих класифікацій фолікулів було взято різні параметри – діаметр фолікула, співвідношення діаметра фоліку-

ла та кількість фолікулярних клітин, будова фолікула. **Мета.** Визначення найзручнішої класифікації фолікулів щурів. **Методи.** Було проаналізовано літературні дані, включаючи також Міжнародну гістологічну номенклатуру. **Результати.** Всі класифікації було охарактеризовано та зроблено висновки щодо їх практичного значення при вивченні процесів фолікулогенезу, особливо після дії різних чинників. **Підсумок.** Вивчення морфофункціональних особливостей фолікулів за різними критеріями допомагає більш детально оцінити зміни у їх будові та функціонуванні та виявити можливі патологічні зміни після дії чинників різної природи, зокрема гормонів.

**Ключові слова:** яєчник, білі щури, фолікули, класифікація, прогестерон.

**Григорьева Е.А., Ковальчук Е.С. К вопросу о классификации фолликулов яичников крыс.**

**РЕФЕРАТ. Актуальность.** Яичники как часть женской репродуктивной системы играют важную роль в нормальном и полноценном функционировании организма. Репродуктивная система очень чувствительна к действию факторов окружающей среды. Частыми причинами нарушения в строении и функции яичников выступают факторы различного происхождения, а в особенности – действие и влияние этих факторов на формирование репродуктивной системы во время беременности. Ведь внутриутробный период является одним из критических периодов развития организма. Широко применяются во время беременности женские половые гормоны, в частности прогестерон – гормон желтого тела, который выполняет ряд важных функций и является необходимым для нормального протекания беременности. Однако последствия внутриутробного воздействия прогестерона на морфогенез и функционирование яичников плода недостаточно изучены. Одним из методов оценки морфофункционального статуса яичников является подсчет и определение соотношения фолликулов на разных стадиях развития. Большая часть работ, посвященных изучению строения фолликулов и их распределения пришлось на конец XX века. В основу предложенных классификаций фолликулов были взяты различные параметры – диаметр фолликула, соотношение диаметра фолликула к количеству фолликулярных клеток, строение фолликула. **Цель.** Определение самой удобной классификации фолликулов крыс. **Методы.** Были проанализированы литературные данные, включая Международную гистологическую номенклатуру. **Результаты.** Все классификации были охарактеризованы и сделаны выводы относительно их практического значения при изучении процессов фолликулогенеза, особенно после действия различных факторов. **Заключение.** Изучение фолликулов по различным критериям помогает более детально оценить изменения в их строении и функционировании и выявить возможные патологические изменения после действия факторов разной природы, в частности гормонов.

**Ключевые слова:** яичник, белые крысы, фолликулы, классификация, прогестерон.