

## АНОТАЦІЯ

*Тимакова О. О.* Морфофункціональні зміни у прищитоподібних залозах за умов впливу несприятливих факторів (солі важких металів). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія. – Сумський державний університет, Суми, 2021.

Сумський державний університет, Суми, 2021.

Забруднення біосфери поллютантами являє собою глобальну небезпеку, яка збільшується з кожним роком. Зростання антропогенних факторів та техногенного забруднення призводить до поширення та накопичення токсикантів в екосистемі.

Хімічні елементи різними шляхами і в різних дозах потрапляють в організм людини, завдаючи йому і шкоду, і користь. Їх міграція в екосистемах відбувається за участю організмів, повітря, води, колоїдних розчинів і внаслідок техногенних процесів.

З екотоксикологічної точки зору іони важких металів не зникають з біологічного колообігу, їх токсичність не зменшується, а навпаки, зі збільшенням концентрації, зростає. Патофізіологічна дія ксенобіотиків залежить від: концентрації, шляху взаємодії та хімічного виду (комбінації), терміну експозиції в організмі та здатності до біоаккумуляції.

Важкі метали вважаються найбільш небезпечними з точки зору екології, токсикології та гігієни, завдяки їх здатності до акумулювання в організмі, спричинюючи тим самим порушення метаболічних і фізіологічних процесів на тканинному та клітинному рівнях.

Однією з важливих ендокринологічних проблем сьогодення, як в Україні, так і в інших країнах світу є захворювання, які пов'язані з морфологічними змінами у прищитоподібних залозах та порушенням кальцієвого гомеостазу.

Захворювання, які пов'язані з морфологічними розладами та дисфункцією цих залоз, за поширеністю посідають третє місце після цукрового діабету та тиреоїдної патології.

Вивчення та розуміння причин розвитку морфологічних розладів та дисфункції прищитоподібних залоз є складним процесом. Тому дисертаційна робота спрямована на встановлення особливості морфологічних перебудов та механізмів регулювання їх у прищитоподібних залозах за умов впливу несприятливих факторів, а саме комбінації солей важких металів. Окремо досліджено відновлювальні можливості залоз при відміні поллютантів. Для детального вивчення та аналізу механізму дії важких металів було сформовано дизайн біологічного дослідження, який включав у себе використання 48 безпородних статевозрілих щурів – самців. Тварини були розподілені на 3 групи з метою вивчення комбінованого впливу поллютантів та у період відновлення після їх відміни: 1 - контрольна група; 2 - щури, які отримували суміш солей важких металів з питною водою, що притаманна забрудненню деяких регіонів України, а насамперед Сумської області. Піддослідні тварини постійно отримували питний розчин, який містив: цинк ( $ZnSO_4 \times 7H_2O$ ) – 5 мг/л, мідь ( $CuSO_4 \times 5H_2O$ ) – 1 мг/л, залізо ( $FeSO_4$ ) – 10 мг/л, марганець ( $MnSO_4 \times 5H_2O$ ) – 0,1 мг/л, свинець ( $Pb(NO_3)_2$ ) – 0,1 мг/л, хром ( $K_2Cr_2O_7$ ) – 0,1 мг/л; 3 група – період відновлення, ці щури отримували звичайну питну воду після відміни важких металів.

З метою вивчення морфологічних особливостей будови прищитоподібних залоз та функціональної їх активності піддослідні тварини виводились з експерименту на 30-ту, 90-ту, 120-ту та 180-ту доби.

За допомогою сукупності методів дослідження: гістологічних, морфометричних, імуногістохімічних, біохімічних, імуноферментних та статистичного аналізу цифрових показників було досягнуто вирішення поставлено мети. Також взаємозв'язок між досліджуваними показниками оцінювали згідно з критерієм кореляції Пірсона ( $r$ ). Результати вважали

статистично достовірними, коли ступінь ймовірності був більше 95 % ( $p < 0,05$ ).

Морфометрія отриманих препаратів проводилася після фотографування з використанням мікроскопу «Carl Zeiss Primo Star» (Німеччина) (бінокляр  $\times 10$ , об'єктиви  $\times 10$ ,  $\times 40$ ) та цифровою камерою «Zeiss Axio Cam ERc 5s» (Німеччина), а також програмним пакетом виходу системи зображення та обчислення «ZEN 2 (blue edition)» (Німеччина).

У літературних джерелах існують наукові роботи, де описані патологічні стани прищитоподібних залоз, які пов'язані з впливом деяких мікроелементів та різних речовин, але відсутні відомості про комплексну дію комбінації солей важких металів (міді, цинку, заліза, хрому, марганцю та свинцю) на досліджувані залози.

Упродовж виконання дослідження нами було отримано дані стосовно зміни лінійних показників площі залоз, клітин та ядер паратироцитів, розміру стромального компоненту та щільності розподілення клітин при надлишковому споживанні комбінації солей важких металів. У процесі підвищеного надходження комбінації солей важких металів до організму щурів упродовж 1 та 3 місяців експерименту прояв токсичної дії полютантів відмічався на різних рівнях морфологічної організації прищитоподібних залоз. У паренхімі спостерігалась дисконкомплексація та дезорганізація епітеліальних трабекул. У паратироцитах відбувався розвиток гідропічної дистрофії у двох напрямках: набряк та утворення внутрішньоцитоплазматичних вакуолей. При застосуванні додаткових методів забарвлення гістологічних препаратів органа (за Ван-Гізеном та за Малорі) виявлялися реактивні перебудови у стромальному компоненті, що характеризувалися розростанням сполучної тканини. Також більш виразні морфологічні зміни відмічались у мікроциркуляторному руслі залоз, а саме розширення просвіту дрібних судин, явища застою.

Морфометрично виявлено термін залежного коливання показників: розмір стромальних компонентів, площі залоз, паратироцитів та ядер

клітин. Площа залоз збільшувалась за рахунок розростання стромальних компонентів упродовж усього експерименту. Пік зростання припадав на 90 добу інтоксикації. Площа паратироцитів зростала за рахунок дистрофічних змін та набряку у період інтоксикації. Найбільш виразні зміни відмічався на 30 добу дослідження. Ядерно-цитоплазматичний індекс у клітинах упродовж усього терміну спостереження демонстрував зростання та становив більше одиниці.

Уперше вивчено та описано характер компенсаторно-приспосувальних процесів та відновлення залоз при відміні полютантів, де спостерігалось незначне зменшення інтенсивності структурних модифікацій та відбувалась зміна клітинного складу паренхіми органа.

Токсична дія важких металів на організм щурів спричиняла дисфункцію прищитоподібних залоз, а саме пригнічення секреції паратгормону та його регуляторів. Коливання біохімічних та імуноферментних показників, у сироватці крові тварин упродовж всього терміну дослідження вказували на порушення гомеостазу кальцію в організмі, а саме, відмічалось зростання відсотку позаклітинного кальцію, лужної фосфатази та кальцитоніну. На 90 добу експерименту спостерігався максимальний показник рівня кальцитоніну у сироватці крові щурів, що може свідчити про важкість морфофункціональних змін у ендокринних залозах і не тільки.

Отримані результати підтверджено достовірною статистичною відмінністю показників та наявністю кореляційних закономірностей між ними. Отже, надлишкове надходження важких металів призводить до морфологічних змін у залозах, де спостерігалось прямопропорційне збільшення площі прищитоподібних залоз та площі клітин, при одночасному зменшенні щільності паратироцитів у залозах. Також відмічалось прямопропорційне збільшення площі залоз за рахунок розростання стромальних компонентів. Спостерігалась пряма кореляційна залежність активності паратгормону з його модуляторами (кальцієм, магнієм та

кальцитоніном). У зв'язку зі зменшенням щільності клітин у залозах відмічалась прямопропорційна залежність з активністю паратгормону.

При виконанні роботи застосовано комплекс імуногістохімічних досліджень, який дозволив уточнити та доповнити відомості про патогенний вплив комбінації солей важких металів та їх зв'язок із морфологічними особливостями прищитоподібних залоз. Виявлено, що упродовж всього терміну експерименту проліферативна активність була слабо-позитивною та спостерігалась переважно в головних клітинах. Експресія білків теплового шоку протягом надлишкового надходження солей важких металів та у період відновлення була на достатньому рівні, не відбувалось їх зниження, а подекуди навіть спостерігалась тенденція до посиленого синтезу в клітинах. Це вказувало на ознаки адаптації, часткової компенсації дії полютантів на організм піддослідних тварин та активації відновлювальних процесів.

Коливання кількості клітин з позитивною реакцією до білка Ki - 67 свідчило про ознаки розвитку компенсаторно-приспосувальних процесів та відновлення прищитоподібних залоз. А також застосування імуногістохімічного дослідження експресії до білка Chromogranin A дозволило вивчити секреторну активність паратироцитів та встановити, що паренхіма залоз представлена клітинами з різною функціональною активністю.

За результатами комплексного біологічного дослідження виявлено морфофункціональні особливості прищитоподібних залоз, як у нормі так і під час надходження полютантів до організму. Визначені результати лінійних морфометричних показників залоз та аналіз показників активності секреції паратгормону та його модуляторів, а також механізмів регулювання кальцієвого гомеостазу за умов комбінованого впливу солей важких металів та у період відновлення вказують на залежність цих показників до тривалості експериментального дослідження. Встановлені морфометричні дані про будову прищитоподібних залоз можуть слугувати основою для моделювання досліджень стосовно впливу різних екзогенних та ендогенних чинників.

Результати дисертаційного дослідження уточнюють та поглиблюють теоретичне розуміння адаптаційних процесів у прищитоподібних залозах за умов впливу на організм несприятливих факторів (солі важких металів), а також виступають основою для використання цих даних у науково-практичній діяльності та навчальному процесі при підготовці фахівців з біології, медицини та ветеринарії.

*Ключові слова:* прищитоподібні залози, паратгормон, паратироцити, солі важких металів, забруднення біосфери, кров, відновлення, імуногістохімічне дослідження.

## SUMMARY

Olena Tymakova. Morphofunctional changes of the parathyroid glands under the influence of the unpropitious factors (heavy metal salts). – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis was written to get a degree of a Doctor of Philosophy by specialty 091 – Biology. – Sumy State University, Sumy, 2021.

Sumy State University, Sumy, 2021.

Pollutant pollution of the biosphere is a global threat that is growing every year. The growth of anthropogenic factors and man-made pollution leads to the spread and accumulation of toxicants in the ecosystem.

Chemical elements in different ways and in different doses enter the human body, causing him harm and benefit. Their migration in ecosystems is going on with the participation of organisms, air, water, colloidal solutions and due to man-made processes.

From the ecotoxicological point of view, heavy metal ions do not disappear from the biological cycle, their toxicity does not decrease, but vice versa, with increasing concentration, increases. The pathophysiological effect of xenobiotics depends on: concentration, route of interaction and chemical type (combination), term of exposure in the body and ability to bioaccumulation.

Heavy metals are considered the most dangerous in terms of ecology, toxicology and hygiene, due to their ability to accumulate in the body, disrupting metabolic and physiological processes at the tissue and cellular levels.

One of the important endocrinological problems of today, both in Ukraine and in other countries of the world, is diseases that are associated with morphological changes in the thyroid gland and violation of calcium homeostasis.

Diseases associated with morphological disorders and glandular dysfunction are the third most common diseases after diabetes and thyroid disease.

Studying and understanding the causes of these morphological disorders and gland dysfunction is a complex process. Therefore, the dissertation is aimed at studying the features of morphological changes and mechanisms of their regulation in the thyroid glands under the influence of adverse factors, namely the combination of salts of heavy metals. The regenerative capabilities of the glands in the abolition of pollutants have been studied separately. For a detailed study and analysis of the mechanism of action of heavy metals, a biological research design was formed, which included the use of 48 outbred adult male rats.

Animals were divided into 3 groups in order to study the combined effects of pollutants and in the recovery period after their abolition: 1- control group; 2- rats, which received a mixture of heavy metal salts with drinking water, which is inherent in the pollution of some regions of Ukraine, especially Sumy region. Experimental animals constantly received a drinking solution containing zinc ( $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) - 5 mg/l, copper ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) - 1 mg/l, iron ( $\text{FeSO}_4$ ) - 10 mg/l, manganese ( $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) - 0.1 mg/l, lead ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) - 0.1 mg/l, chromium ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) - 0.1 mg/l. Group 3 - the recovery period, these rats received normal drinking water after canceling heavy metals.

In order to study the morphological features of the structure of the thyroid glands and their functional activity, the experimental animals were removed from the experiment on the 30th, 90th, 120th and 180th day.

With the help of a set of research methods: histological, morphometric, immunohistochemical, biochemical, enzyme-linked immunosorbent assay and

statistical analysis of digital indicators, the solution of the aim was achieved. The relationship between the studied indicators was also evaluated according to the Pearson correlation criterion ( $r$ ). The results were considered statistically significant when the probability was greater than 95% ( $p < 0.05$ ).

Measurement of the given drugs was performed after photographing using a microscope "Carl Zeiss Primo Star" (Germany) (binoculars  $\times 10$ , lenses  $\times 10$ ,  $\times 40$ ) and a digital camera "Zeiss AxioCam ERc 5s" (Germany), as well as a software package of image and calculation systems "ZEN 2 (blue edition)" (Germany).

There are scientific papers in the literature where are described the pathological conditions of the thyroid gland, which are associated with the influence of certain trace elements and various substances, but there is no information about the complex effect of a combination of heavy metal salts (copper, zinc, iron, chromium, manganese and lead) salts.

During the study, we received data on changes in the linear parameters of the area of glands, cells and nuclei of parathyrocytes, the size of the stromal component and the density of cell distribution with excessive consumption of a combination of salts of heavy metals. In the process of increasing incoming combination of heavy metal salts in the body of rats during 1 and 3 months of the experiment, the display of toxic effects of pollutants was observed at different levels of morphological organization of the thyroid glands. Decomplexation and disorganization of epithelial trabeculae were observed in the parenchyma.

In parathyrocytes there was a development of hydropic dystrophy in two directions: edema and swelling. During using additional methods of staining of histological preparations of the organ (according to Van Gizon and according to Mallory), appeared reactivated rearrangements in the stromal component, which were characterized by the growth of connective tissue. Also, more pronounced morphological changes were observed in the microcirculatory tract of the glands, namely the expansion of the lumen of small vessels, the phenomenon of stagnation.



Morphometrically revealed the term of the dependent fluctuation of indicators: the size of the stromal components, the area of glands, parathyroid cells and cell nuclei. The area of the glands increased due to the growth of stromal components throughout the experiment. The peak of growth occurs on the 90th day of intoxication. The area of parathyrocytes increased due to dystrophic changes and edema during intoxication, the peak occurs on the 30th day of the study. The nuclear-cytoplasmic index in the cells showed an increase of more than one unit during the whole observation period.

For the first time the character of compensatory-adaptive processes and restoration of glands at cancellation of pollutants was studied and described, where a slight decrease in the intensity of structural modifications was observed and a change in cell composition in the parenchyma of the organ took place.

Toxic effects of heavy metals on the body of rats caused dysfunction of the thyroid gland, namely the suppression of the secretion of parathyroid hormone and its regulators. Fluctuations in biochemical and enzyme-linked immunosorbent data in the serum of animals throughout the study indicated a violation of calcium homeostasis in the body, namely, there was an increase in % of extracellular calcium, alkaline phosphatase and calcitonin. On the 90th day of the experiment, the maximum level of calcitonin in the serum of rats was observed, which may indicate the severity of morphofunctional changes in the endocrine glands and beyond.

Taken results are confirmed by a significant statistical difference of indicators and the presence of correlation patterns between them. Thus, excessive intake of heavy metals leads to morphological changes in the glands, where there was a direct proportional increase in the area of the thyroid gland and the area of cells, while reducing the density of parathyrocytes in the glands. There was also a directly proportional increase in the area of the glands due to the growth of stromal components.

There was a direct correlation between the activity of parathyroid hormone and its modulators (calcium, magnesium and calcium). Due to the decrease in cell

density in the glands, there was a direct proportional relationship with the activity of parathyroid hormone.

A set of immunohistochemical studies was used to clarify and supplement the information on the pathogenic effect of the combination of heavy metal salts and their relationship with the morphological features of the thyroid gland. It was found that throughout the experiment, proliferative activity was weakly positive, observed mainly in stem cells.

The expression of heat shock proteins during the excess intake of heavy metal salts and during the recovery period was at a sufficient level, there was no decrease, and in some cases, there was even a tendency to increased synthesis in cells. This indicated signs of adaptation, partial compensation of pollutants on the body of experimental animals and activation of recovery processes.

Fluctuations in the number of cells with a positive reaction to the Ki-67 protein indicated signs of the development of compensatory-adaptive processes and the restoration of the thyroid gland. As well as the application of immunohistochemical study of expression to the protein Chromogranin A allowed to study the secretory activity of parathyrocytes and to establish that the parenchyma is represented by cells with different functional activity.

According to the results of a comprehensive biological study was revealed morphological features of the parathyroid glands, both normally and during the entry of pollutants into the body. The results of linear morphometric parameters of glands and analysis of parameters of parathyroid hormone secretion and its modulators, as well as mechanisms of regulation of calcium homeostasis under combined exposure to heavy metal salts and in the recovery period indicate the dependence of these indicators on the duration of experimental studies. Established morphometric data on the structure of the thyroid gland can serve as a basis for modeling studies on the influence of various exogenous and endogenous factors.

The results of the dissertation research clarify and deepen the theoretical understanding of adaptation processes in the pancreas under the bad influence (heavy metal salts), and also serve as a basis for the use of these data in scientific

and practical activities and educational process in training specialists of biology, medicine and veterinary medicine.

Key words: parathyroid glands, parathyroid hormone, parathyrocytes, heavy metal salts, biosphere pollution, blood, recovery, immunohistochemical study.

### **СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ АВТОРА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Тимакова ОО, Романюк АМ. Морфологічні особливості прищитоподібної залози щурів за умов модельованого підгострого впливу солей важких металів. Український журнал медицини, біології та спорту. 2017;6(8):38-40. DOI: 10.26693/jmbs02.06.038 (Дисертанткою проведено морфологічне дослідження прищитоподібних залоз, опрацьовані результати дослідження та сформовано висновки).

2. Romaniuk A, Lyndin M, Lyndina Y, Sikora V, Hrintsova N, Timakova O, Gudymenko O, Gladchenko O. Changes in the Hematopoietic System and Blood Under the Influence of Heavy Metal Salts Can Be Reduced with Vitamin E. Turk Patology Derg. 2018;34(1):73-81. DOI: 10.5146/tjpath.2017.01412. (Здобувачем виконані біохімічні дослідження та інтерпретовані отримані результати).

3. Романюк АМ, Тимакова ОО, Линдіна ЮМ, Гринцова НБ, Кравцова ІА, Куст ВВ. Морфофункціональні зміни у прищитоподібних залозах при тривалій дії солей важких металів. Вісник Вінницького національного медичного університету. 2019;1(23):80-83. DOI:10.31393/reports-vnmedical-2019-23(1)-12. (Автором проведено біологічне експериментальне дослідження, написані результати та сформовані висновки).

4. Hryntsova NB, Tymakova OO, Romaniuk AM. Morphofunctional reconstructions of epiphysal-parathyroide axis structural components of rats in the period of readaptation after prolonged exposure to heavy metals. Проблеми ендокринної патології. 2020;4(74):106-114. DOI:10.21856/j-PEP.2020.4.14. (Здобувач провела гістологічне, імуногістохімічне, біохімічне, імуноферментне дослідження, проаналізувала отримані результати).

5. Тимакова ОО. Морфо-функціональні особливості прищитоподібної

залози у щурів в умовах впливу солей важких металів. В: М.В. Погорелов, редактор. Актуальні питання теоретичної та клінічної медицини: збірник тез доповідей V Міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених; 2017 20-21 квітня, Суми. Суми: Сумський державний університет; 2017, с. 206-207. (Дисертанткою виконано морфологічне дослідження прищитоподібних залоз, опрацьовані результати експериментального дослідження, сформовані висновки, підготовлено тези до друку).

6. Тимакова ОО. Морфо-функціональні особливості прищитоподібної залози у щурів в умовах впливу солей важких металів (хронічний стан). В: М.В. Погорелов, редактор. Збірник тез доповідей Всеукраїнської науково-методичної конференції, присвяченої 25-річчю Медичного інституту Сумського державного університету: Перспективи розвитку медичної науки і освіти; 2017 16-17 листопада, Суми. Суми: Сумський державний університет; 2017, с. 37-38. (Здобувачем проведено морфологічне дослідження прищитоподібних залоз, опрацьовані результати дослідження, сформовані висновки, підготовлені тези до друку).

7. Romaniuk A, Hryntsova N, Timakova O, Lyndina Y, Korobchanska A, Honcharova A, Sikora V. Modeling effect of heavy metals salts and glucocorticoids on the secretion of parathormone in the experiment. 30 th European Congress of Pathology Pathology: Path to Precision medicine; Spain 2018 8 – 12 September; Bilbao, 2018, p. 68. (Дисертанткою проведено гістологічне та імуногістохімічне дослідження, опрацьовані результати дослідження, сформовані висновки).

8. Тимакова ОО, Романюк АМ, Гринцова НБ, Линдіна ЮМ, Гончарова ГМ. Реадаптаційні зміни танини прищитоподібних залоз у щурів після впливу солей важких металів. Збірник матеріалів науково-практичної конференції з міжнародною участю: Індивідуальна анатомічна мінливість органів та структур організму в онтогенезі, присвячена 100-річчю від дня народження професора Ю.Т. Ахтемійчука; 2018 13-15 вересня; Чернівці.

Чернівці: Медуніверситет, 2018, с. 119-120. (Здобувачем проведено експериментальне дослідження, опрацьовані результати дослідження, сформовані висновки, підготовлені тези до друку).

9. Tymakova OO. Morphological features of the parathyroid glands in rats caused by simulated influence under prolonged heavy metal salts. Abstract book Intrenational Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists; 2018 17-19 October; Sumy. Sumy: Sumy State University; 2018, p. 26. (Дисертанткою проведено морфологічне дослідження прищитоподібних залоз, сформовані висновки, підготовлені тези до друку).

10. Tymakova O, Hryntsova N, Romaniuk O, KuzenkoY, Korobchanska A, Kravtsova I, Romaniu A. Morphological features of the parathyroid glands in rats under heavy metal salts influence. 31 th European Congress of Pathology; France 2019 7-11 September; Nice, 2019, p. 319. (Здобувачем проведено гістологічне та імуногістохімічне дослідження, опрацьовані результати дослідження, сформовані висновки).

11. Тимакова ОО. Морфометричні особливості прищитоподібних залоз у щурів за умов впливу комбінації солей важких металів. Наукового товариства анатомів, гістологів, ембріологів, топографоанатомів України: збірник тез доповідей VII конгрес наукового товариства анатомів, гістологів, ембріологів, топографоанатомів України; 2019 2-4 жовтня; Одеса. Одеса: Одеський національний медичний університет; 2019, с. 316-317. (Дисертанткою проведено морфологічне та морфометричне дослідження прищитоподібних залоз, сформовані висновки).