

STATE OF RAT PINEAL GLAND STRUCTURAL COMPONENTS IN THE CONDITIONS OF DIFFERENT EXTRACELLULAR DEHYDRATION TERMS

СТАН СТРУКТУРНИХ КОМПОНЕНТІВ ЕПІФІЗА ЩУРІВ В УМОВАХ РІЗНИХ ТЕРМІНІВ ПОЗАКЛІТИННОГО ЗНЕВОДНЕННЯ

Nataliia Hryntsova¹

DOI: <https://doi.org/10.30525/978-9934-26-021-6-30>

Abstract. The monograph presents a theoretical generalization and a new solution for the research target to study the state of the pineal gland structural components in sexually mature rats under different terms of extracellular dehydration. The experiment was performed on 24 white sexually mature male rats aged 5-6 months. The animals of the experimental group were simulated extracellular dehydration of mild and heavy severity. Animals were kept and manipulated in compliance with national and international bioethics standards. Different degrees of extracellular dehydration severity caused negative changes in all structural components of the pineal gland in experimental animals: stromal, vascular and parenchymal, with the greatest intensity in animals with heavy severity course. Morphological rearrangements were nonspecific and polymorphic in nature. In the pineal gland of animals with a mild severity course there was a tension of adaptive processes, increased secretory activity by both indole-producing and polypeptide-producing pinealocytes (with predominance of the latter), formation of the gland's reserve capacity. There was a moderate increase in the expression of heat shock proteins in pinealocytes, which, certainly, made these cells more resistant to apoptotic rearrangements and the subsequent action of extreme factors. With increasing duration of the experiment (severe degree), there was a significant decrease in the size of the gland, thickening and swelling of the stromal component, sharp impairment of

¹ Candidate of Biological Sciences,
Associate Professor at Department of Morphology,
Sumy State University, Ukraine

hemodynamics in the organ. Blood viscosity increased, its rheological properties were impaired (stasis, sludge), vascular wall permeability increased, processes of accelerated apoptosis in part of pinealocytes developed. The heat shock proteins level and the proliferative activity of astrocytic glia were significantly reduced, indicating a weakening of the mechanisms of anti-apoptotic and anti-stress protection. The 90-day effect of extracellular dehydration on the experimental animals' body caused the phenomenon of chronic stress "subcompensation", which was expressed in the depletion of pineal indolamines reserve and their urgent evacuation into the blood to maintain general adaptive capacity of the body. However, disturbances in the morphology of the vascular wall and increased blood viscosity negatively affected the mechanisms of pineal hormones diffusion into the vascular bed, the development of compensatory-adaptive processes in the body as a whole and the course of general adaptation syndrome.

1. Вступ

Вода з розчиненими в ній речовинами представляє собою функціональну єдність як у біологічному, так і у фізико-хімічному відношенні і виконує багаточисельні функції. Обмінні процеси в клітинах протікають у водному середовищі. Вода слугує дисперсійним середовищем органічних колоїдів та індиферентної основи для транспортування будівельних і енергетичних речовин до клітини та евакуації продуктів обміну до органів виділення [1, с. 13–16]. Вода організму поділяється на внутрішньоклітинну та позаклітинну. Позаклітинна вода включає інтерстиціальну рідину (рідину навколо клітин); внутрішньосудинну рідину; трансцелюлярну рідину (рідину серозних та інших порожнин). Порушення водно-електролітного обміну – надзвичайно поширена патологія, що розвивається внаслідок негативного або позитивного водного балансу [2, с. 9]. Виникаючі при цьому розлади вмісту води в різних середовищах організму та пов'язані з цими змінами розлади вмісту електролітів створюють передумови для розвитку патології життєво важливих органів та порушення метаболізму [1, с. 14]. До одного із видів негативного водного балансу (дегідратації) належить позаклітинна дегідратація, яка називається ще вторинною чи гіпотонічною. Вона зумовлена значними втратами електролітів, особливо іонів калію. При цьому вода із позаклітинного простору потрапляє у клітини [2, с. 11].

У формуванні регуляції механізму компенсації на різні екстремальні фактори, що впливають на організм, ендокринній системі відводиться одна з провідних ролей. Адекватність, характер пристосувальних змін організму залежить від змін гормональної секреції, що забезпечують гомеостаз організму. Тривалий і багаторазовий стрес може стати основою стресіндукованого розвитку патології [3, с. 179]. Регуляція обміну води здійснюється нейро-гуморальними механізмами [2, с. 11–12]. Епіфіз займає одне з центральних місць в ендокринній регуляції життєдіяльності всіх органів та систем, здійснює пристосувальні реакції організму до мінливих умов зовнішнього середовища, є універсальним адаптогеном [4; 5, с. 198–222]. Особливістю клітин епіфіза пінеалоцитів є їх здатність синтезувати та виділяти в кров індоламін серотонін, який за гематоенцефалічним бар'єром виконує функції медіатора. Із серотоніна у відсутності освітлення в епіфізі мозку утворюється мелатонін [6, с. 113].

Дослідження стану структурних компонентів епіфіза статевозрілих щурів за умов різних термінів позаклітинного зневоднення є актуальною науковою проблемою та потребує детального вивчення. У доступній літературі ми не знайшли відомостей про морфологічні та імуногістохімічні особливості органа за умов розладів водно-електролітного балансу. Цікавим на нашу думку є вивчення експресії фактору проліферації Ki-67 у клітинах епіфіза, а також експресії білка теплового шоку Hsp90. Відомо, що цей білок синтезується в певній кількості постійно в будь-яких ядерних клітинах, у безлічі внутрішньоклітинних структур (цитоплазмі, ядрі, ендоплазматичній сітці, мітохондріях), у всіх багатоклітинних організмів. Підвищення внутрішньоклітинного синтезу білків теплового шоку відбувається не тільки на тепловий шок, але і на будь-який стресовий вплив: ультрафіолетове опромінення, тепловий шок, важкі метали, амінокислоти, вірусні, бактеріальні та паразитарні інфекції, лихоманка, запалення, злоякісна трансформація, аутоімунні реакції або навіть ростові фактори, клітинна диференціація, гормональна стимуляція, ріст тканин.. тощо. Синтез білків теплового шоку є універсальною неспецифічною відповіддю клітини на стрес, і, за сучасними даними, немає такого виду клітинного стресу, при якому не відбувалося б синтезу цього виду білка [7 с. 125]. Тому, **метою роботи** є комплексне вивчення стану структурних компонентів епіфіза статевозрілих щурів за умов різних термінів позаклітинного зневоднення.

2. Матеріали та методи

Експеримент проведений на 24 білих статевозрілих щурах-самцях масою 150-200г, віком 5-6 місяців, які були розподілені на 2 групи (2 контрольні та 2 експериментальні). Тварини обох груп знаходилися у звичайних умовах виварію, де підтримувалися однакові умови утримання, харчування, належного догляду та природного освітлення (день/ніч), з постійною температурою оточуючого середовища (20-22°). Дослідження проведено в осінньо-зимовий період. В експерименті використовували активних тварин із задовільним загальним станом та станом шкіряного покриву. Експериментальну групу склали 12 тварин, яким згідно [2, с. 12–13] моделювали різний ступінь тяжкості позаклітинної дегідратації шляхом утримання тварин на дієті, що складалася із знесоленої (вивареної) маломінералізованої їжі. В якості пиття тварини отримували знесолену бідистильовану воду. На протязі всіх термінів експерименту тваринам внутрішньоочеревинно вводили препарат Фуросемід у дозі 0,0003 г згідно схеми [8, с. 53–55]. Препарат входить до фармакотерапевтичної групи високоактивних діуретиків (Код АТС С03С А01. Зареєстрований в Україні від 30.08.2011 р., № UA/5153/01/01). Згідно фармакологічних протоколів доза, рекомендована для дорослої людини із середньою вагою 70 кг, становить 20 мг (0,02 г) на 1 добу. Для розрахунку дози для лабораторного щура було використано формулу Р. С. та Ю. Р. Риболовлевих (1979) та відповідні розрахунки [8, с. 53–55]. Першу серію складали щури з легким ступенем позаклітинного зневоднення (30-та доба експерименту). Другу серію досліду складали щури, яким моделювали тяжкий ступінь позаклітинного зневоднення (90-та доба експерименту).

Групи піддослідних тварин виводили з експерименту після попереднього тіопенталового наркозу (із розрахунку 30-40мг/10г маси тіла) на 30-ту та відповідно 90-ту добу експерименту. Утримання тварин та маніпуляції над ними проводилися у відповідності до національних та міжнародних норм з біоетики: положень «Загальноетичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.), «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3477-IV від 21.02.2006 р.

Для вивчення морфологічних перебудов у структурних компонентах епіфізу застосовували загальноприйняті методики мікроанатомічного (гістологічного) методу дослідження. З метою проведення морфологічних та імуногістохімічних досліджень епіфізу проводили видалення органа та виготовлення гістологічних препаратів згідно розробленої авторами оригінальної методики [9; 10]. При цьому, з метою атравматичного вилучення, епіфіз повністю не відпрепарувувався від епіталамуса проміжного мозку, а вилучався разом з фрагментами головного мозку та мозочка, що прилягали до нього (рис. 1).

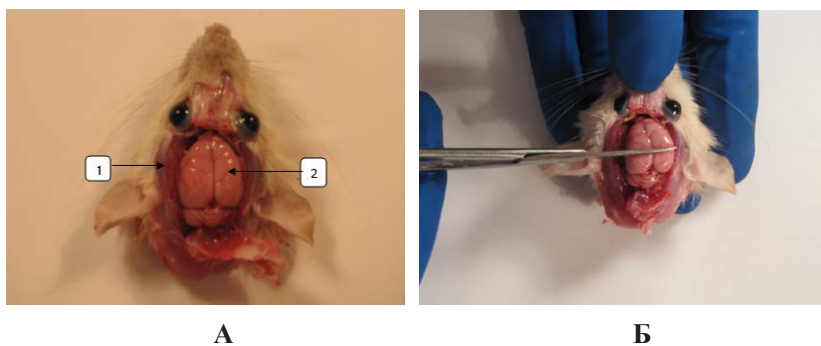


Рис. 1. А – Круговий розтин черепної коробки по тім'яно-скронеvim кісткам (1), оголення головного мозку (2). Б – Вилучення епіфіза органомкомплексом (разом з фрагментами головного мозку та мозочка, що прилягають до епіфіза).

Цифрові фото

Епіфіз, разом з прилеглими тканинами, занурювався у фіксуючу рідину (5% нейтральний розчин формаліну) строком на 12-24 години (рис. 2).

Процес зневоднення проводили у низці порцій етилового спирту з висхідними концентраціями 70°, 80°, 90°, 96°, після чого об'єкти заливали парафіном. З гістологічних блоків на ротаційному мікротомі виготовляли зрізи завтовшки від 4 до 5 мкм, з подальшим приготуванням постійних гістологічних препаратів та фарбуванням гематоксилін-еозином за стандартною методикою. Розроблений спосіб дозволив раціонально препарувати епіфіз, що запобігало його травмуванню та дозво-

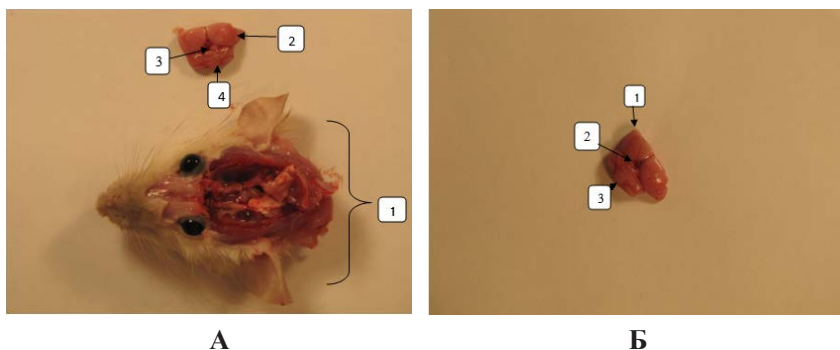


Рис. 2. А – Голова декапітованого щура з вилученим головним мозком (1). Органокомплекс: фрагмент головного мозку (2), епіфіз (3), фрагмент мозочка (4). Б – Органокомплекс: фрагмент головного мозку (1), епіфіз (2), фрагмент мозочка (3) перед фіксацією. Цифрові фото

лило приготувати якісні гістологічні препарати для світлооптичного, морфологічного та імуногістохімічного методів дослідження. Загальний морфологічний аналіз проводили за допомогою світлооптичного мікроскопа «Leica DM 500», з об'єктивами $\times 4$, $\times 10$, $\times 40$, бінокюлярами 7, 10. Фотодокументування отриманих результатів проводили цифровою відеокамерою «Leica DM IC C50 HD Camera». Використовували програмне забезпечення «Leica Application Suite LAS EZ version 20.0 [Build: 292] Copyright @ 2010». Оцінку морфологічного стану епіфіза проводили за рядом мікроскопічних показників: стан стромального та паренхіматозного компонентів, стан судинного русла, зміни реологічних властивостей крові, стан пінеалоцитів та астроцитарної глії та визначення імуногістохімічних маркерів Ki-67 та Hsp90 α .

Визначення експресії маркера проліферації Ki-67 та маркера білка теплового шоку 90 (Hsp90 α) проводили на депарафінованих зрізах товщиною 4–5 мкм, Демаскування антигенів проходило у водяній бані «ВБ-4» при температурі 97–980С. Реакція антиген-антитіло була візуалізована з використанням системи детекції «UltraVision Quanto Detection System HRP DAB Chromogen» («Thermo scientific», США), яка включала блокування ендогенної активності пероксидази пере-

киснем водню, блокування неспецифічного фонового забарвлення з використанням «Ultra V block», посилення реакції «Primary Antibody Amplifier Quanto» та кінцева візуалізація діамінобензидином (ДАБ) з дозобарвленням ядер гематоксиліном Маєра [11,с.41]. Для імуногістохімічної реакції використовували панель антитіл («Thermo scientific», США): кролячі моноклональні антитіла (клон SP6) з титром 1:100 та кролячі поліклональні антитіла до білка Hsp90 α з титром 1:200 згідно рекомендацій виробника. Оцінку експресії маркера проліферації Ki-67 проводили по кількості забарвлених ядер. Результат виражався у відсотках і оцінювався за прийнятою шкалою: 1) негативна реакція (-), 2) 0-20% – слабкий рівень експресії (+), 3) 21-50% – помірний рівень експресії (++) , 4) 51-100% – значний рівень експресії (+++) [12, с. 176].

Оцінку експресії маркера Hsp90 α проводили по кількості забарвлених ядер та цитоплазми клітин залози. Результат виражався у відсотках і оцінювався за прийнятою шкалою у випадку позитивної реакції: слабопозитивна (1 бал), помірнопозитивна (2 бали) та сильнопозитивна (3 бали) реакція, враховуючи кількість клітин та інтенсивність їх забарвлення [11, с. 43]. Обробка цифрових результатів виконувалася прикладними статистичними методами за допомогою текстового редактора Microsoft Word Excell 2010 з додатком AtteStat 12.0.5. Достовірність розходження експериментальних і контрольних даних морфометричних показників оцінювали з використанням критерію Стьюдента, достатньою вважали ймовірність похибки менше 5% ($p \leq 0,05$).

3. Результати та їх обговорення

3.1. Результати дослідження епіфіза експериментальних тварин за умов легкого ступеня позаклітинного зневоднення організму

Після 30-ти денного терміну впливу позаклітинного зневоднення на організм експериментальних тварин епіфіз мав досить добре збережену анатомічну овальну форму та зв'язок з судинним сплетінням. Цілісність капсули залози була не порушена, її структура відзначалася незначною розпушеністю, з добре контурованими фіброцитами між колагеновими волокнами. Міжтрабекулярні сполучнотканинні септи в окремих полях зору були розширені, в інших – без ознак перебудов. Судини мікроциркуляторного русла візуалізувалися лише в поодино-

ких полях зору периферійних ділянок залози. Їх стінка була потовщена, з набряклими гіперхромними ендотеліоцитами та ознаками розширення та запусівання просвіту. Крім того, в периферійних ділянках епіфіза, навколо судин та особливо субкапсулярно спостерігалася незначна гліальна реакція, що, можна оцінювати як адаптивну реакцію нейроглії до розладів водно-електролітного балансу в організмі експериментальних тварин [13, с. 985] (рис. 3).

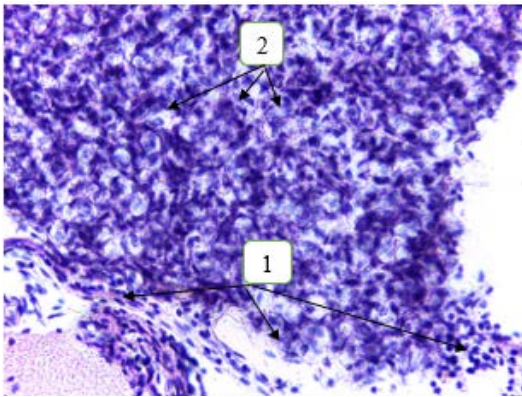


Рис. 3. Морфологічні перебудови структурних компонентів епіфіза експериментальних тварин за умов легкого ступеня позаклітинного зневоднення: 1 – гліальна реакція; 2 – розширення міжтрабекулярних просторів. Забарвлення гематоксилін-еозином. $\times 400x$

Результати імуногістохімічних досліджень маркера Кі-67 виявили його слабкий рівень проліферативної активності в астроцитах периферійних ділянок залози (2-3%) у порівнянні з показниками контрольних тварин. Інтенсивність забарвлення ядер клітин оцінювалася як помірна (++) (рис. 4Б). Рівень експресії Кі-67 у пінеалоцитах контрольних тварин оцінювався як негативний (рис. 4А).

Паренхіма епіфіза експериментальних тварин була сформована як світлими, так і темними пінеалоцитами, із збереженою характерною відросчатою будовою цитоплазми. У препаратах переважали світлі пінеалоцити з просвітленою, вакуолізованою цитоплазмою. Часто

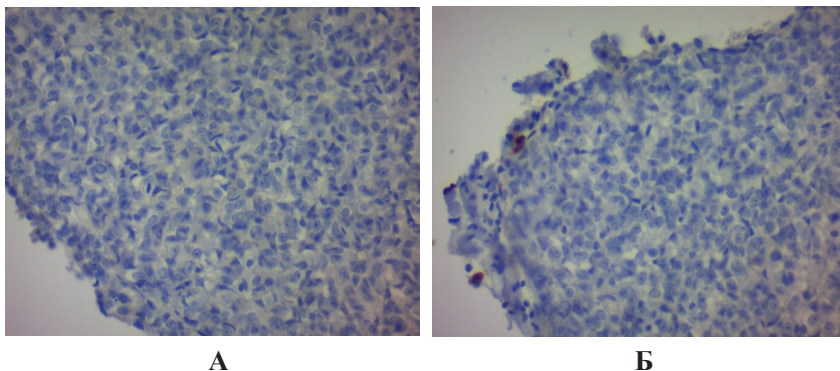
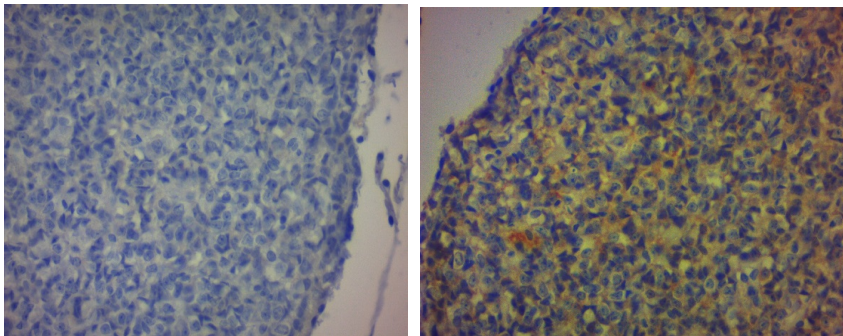


Рис. 4. Епіфіз контрольних (А) та експериментальних (Б) щурів за умов легкого ступеня позаклітинного зневоднення організму. Експресія Ki-67. X400

зустрічалися клітини з вакуолізованою цитоплазмою. Особливо велика кількість таких пінеалоцитів виявлялася у периферійних ділянках залози, субкапсулярно. Ядра пінеалоцитів мали як овальну, так і дещо видовжену форму та були більш крупними у порівнянні з ядрами групи контрольних тварин. Такі збільшені у розмірах ядра мали просвітлену, багату еухроматином, хроматинову сітку з гіперхромним, гіпертрофованим ядерцем, розмішеним у центрі ядра. У вакуолізованих клітинах ядра розмішувалися як центрально, так і були зміщені до периферії, розмішувалися ексцентрично. Крім того, більша частина таких ядер мала крайову маргінацію хроматину. Ознака крайової маргінації хроматину та збільшення кількості ядер з еухроматином та ядерцями, за даними Шкорбатова Ю.Г. [14, с. 22–25] є ознакою активації синтетичної активності клітин. Але інші автори все ж розглядають маргінацію хроматину, як один із проявів прискореного апоптозу пінеалоцитів [4, с. 36]. Порівняно менша частина пінеалоцитів мала деформовані, гіперхромні ядра, часто з ознаками пікнотичних перебудов. Їх хроматинова сітка була гомогенна, ядерця не візуалізувалися. Цитоплазма таких клітин була зафарбована в темні кольори. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення складало 1:1,8-1:2. Паренхіма залози мала поодинокі кісти малих розмірів, зафарбованих оксифільно. Наявність

у паренхімі залози пінеалоцитів з деформованими ядрами та сильно вакуолізованою цитоплазмою, за думкою ряду авторів [15, с. 67–92], свідчить про синтез та накопичення у цих клітинах індоламінів. Але, все ж більша частина пінеалоцитів мала ознаки активації у них синтезу поліпептидів. Де інде в міжтрабекулярних просторах візуалізувалися гранули гормонів. Структура паренхіми епіфіза експериментальних тварин не мала ознак розрідження та зменшення кількості пінеалоцитів у порівнянні з контрольними.

З метою вивчення адаптивної відповіді епіфіза на розлади водно-електролітного балансу було вивчено експресію білків теплового шоку (hsp90 α). При аналізі мікроскопічних препаратів було виявлено, що вміст hsp90 α в пінеалоцитах епіфіза характеризується лише цитоплазматичною локалізацією та відсутністю ядерної експресії hsp90 α . Майже 85% пінеалоцитів були позитивними щодо експресії hsp90 α , що вказує на участь цього білка в процесах адаптації до позаклітинного зневоднення організму. Особливо яскрава реакція відмічалася у периферійних ділянках залози. При цьому, рівень експресії hsp90 α , враховуючи кількість клітин та інтенсивність їх забарвлення, оцінювався як помірно-позитивний (2 бали) (рис. 5Б). Рівень експресії hsp90 α у пінеалоцитах контрольних тварин оцінювався як негативний (рис. 5А).



А

Б

Рис. 5. Епіфіз контрольних (А) та експериментальних (Б) щурів за умов легкого ступеня позаклітинного зневоднення організму. Експресія Hsp90 α . X400

3.2. Результати дослідження епіфіза експериментальних тварин за умов важкого ступеня позаклітинного зневоднення організму

Після 90-го денного терміну впливу позаклітинного зневоднення на організм експериментальних тварин епіфіз зберігав свою анатомічну форму, але його розміри були значно зменшеними у порівнянні з розмірами епіфіза контрольних тварин. Приносні судини епіфіза були значно повнокровні. Капсула залози була не потовщена, цілісність її не порушена. Міжтрабекулярні сполучнотканинні септи були потовщені, з ознаками набряку. Спостерігалось збільшення площі васкуляризації судин мікроциркуляторного русла. Судини епіфіза, особливо субкапсулярної зони, були повнокровні, їх діаметр був зменшений у порівнянні з показниками контрольних тварин. У просвіті судин виявлено гомогенну масу, стаз та процеси сладжування формених елементів крові. Стінка судин субкапсулярної зони мала ознаки порушення проникності, з формуванням множинних субкапсулярних крововиливів у паренхіму залози. Ендотеліоцити судин були значно видовженими, гіперхромними, з ознаками набряку (рис. 6). Але, активної гліальної реакції, що була присутня на попередньому терміні експерименту, не виявлено. Паренхіма залози експериментальних тварин, як і на попередніх термінах експерименту, була сформована як світлими, так і темними пінеалоцитами, з переважанням світлих у периферійних ділянках органа. Крім того, спостерігалася розрідженість паренхіми залози, зменшення кількості пінеалоцитів на одиницю площі. На нашу думку та на думку ряду авторів [6, с. 114] це явище може бути обумовлене апоптозом частини пінеалоцитів.

Паренхіму епіфіза за умови важкого ступеня позаклітинного зневоднення населяли пінеалоцити з овальними, округлими ядрами та ядрами видовженої вуглуватої форми. При цьому, ядра різної форми мали різну структуру хроматинової сітки. Ядра пінеалоцитів овальної та округлої форми були більш крупними у порівнянні з ядрами пінеалоцитів групи контрольних тварин. Хроматинова сітка більшої частини таких ядер була просвітлена, багата еухроматином, часто зустрічався ефект маргінації хроматину. Ядра мали гіперхромні, гіпертрофовані ядерця, що розміщувалися як центрально, так і перебували у стані ектопії. Інша частина ядер мала нечіткі контури каріомембрани, їх хроматинова сітка була гомогенною, без ядерець. Ядра видоженої вуглува-

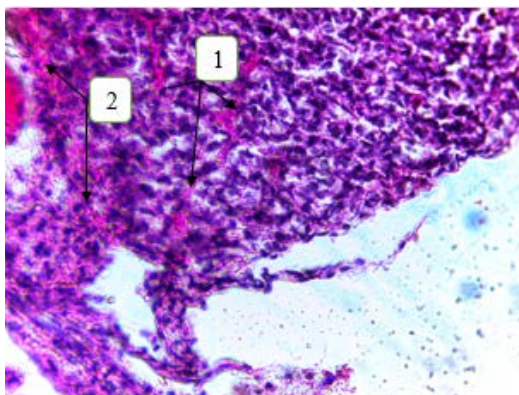


Рис. 6. Морфологічні перебудови структурних компонентів епіфіза експериментальних тварин за умов важкого ступеня позаклітинного зневоднення: 1 – повнокров'я судин субкапсулярної зони; 2 – множинні крововиливи у паренхімі залози. Забарвлення гематоксилін-еозином. $\times 400x$

тої форми були гіперхромними, гомогенними, дещо зменшеними у розмірах у порівнянні з ядрами пінеалоцитів групи контрольних тварин. Незначна частина ядер перебувала у стані пікнотичних перебудов, що також опосередковано може свідчити про процес апоптичної загибелі частини пінеалоцитів [16, с. 65]. У порівнянні з попереднім терміном експерименту змінюється і морфологія цитоплазми пінеалоцитів. Так, у порівнянні з попереднім терміном експерименту, у препаратах були практично відсутні пінеалоцити з вакуолізованою цитоплазмою. Такі клітини зустрічалися поодинокі, лише в окремих полях зору препаратів. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення складало 1:1,3-1:1,7. Наявність у паренхімі залози кіст не встановлено.

Результати імуногістохімічних досліджень експресії маркера Ki-67 виявили відсутність її у всіх ділянках залози експериментальних тварин, що співпадає з результатами, які виявлені у контрольних тварин (рис. 7).

Результати імуногістохімічних досліджень маркера теплового шоку (hsp90 α) виявили зменшення його експресії в цитоплазмі пінеалоцитів за умов важкого ступеня позаклітинного зневоднення у порівнянні з

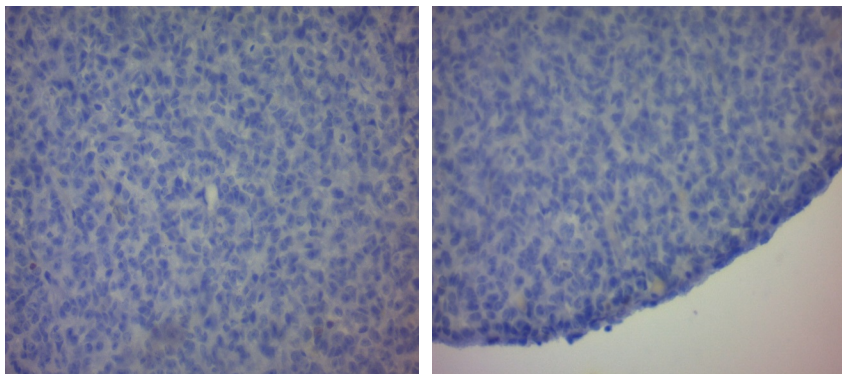


Рис. 7. Епіфіз експериментальних щурів за умов важкого ступеня позаклітинного зневоднення організму. Експресія Ki-67. X400

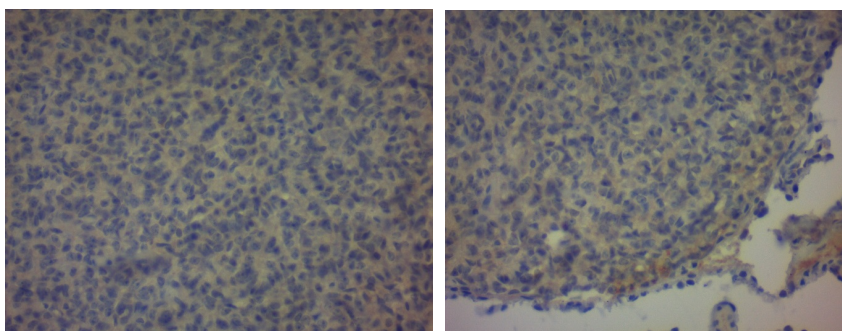


Рис. 8. Епіфіз експериментальних щурів за умов важкого ступеня позаклітинного зневоднення організму. Експресія Hsp90α. X400

попереднім терміном експерименту. Рівень експресії hsp90α, враховуючи кількість клітин та інтенсивність їх забарвлення, оцінювався як слабопозитивний (1 бал) (рис. 8).

4. Обговорення

Отже, отримані результати комплексних досліджень епіфіза статевозрілих щурів за умови легкого та важкого ступенів позаклітинного зневоднення свідчать про розвиток негативних перебудов у

всіх структурних компонентах залози: стромальному, судинному та паренхіматозному. Виразність морфологічних перебудов залежить від збільшення терміну дії позаклітинного зневоднення на організм піддослідних тварин. Так, із збільшенням термінів експерименту (важкий ступінь) спостерігається значне зменшення розмірів залози. Візуалізується потовщення стромального компонента, збільшення в'язкості крові, порушення її реологічних властивостей (стаз, сладж еритроцитів). Збільшується проникність судинної стінки, особливо в периферійних, субкапсулярних ділянках залози, де спостерігається формування множинних крововиливів. У експериментальних тварин за умови важкого ступеня позаклітинного зневоднення у порівнянні з тваринами легкого ступеня значно зменшується проліферативна активність астроцитарної глії, що підтверджується результатами дослідження імуногістохімічного маркера проліферації Ki-67.

У всіх термінах експерименту паренхіма залози була сформована як світлими, так і темними пінеалоцитами. Але, якщо за умов легкого ступеня позаклітинного зневоднення світлі пінеалоцити мали ознаки активного синтезу та накопичення індоламінів, що виявляється за допомогою морфологічних показників (вакуолізація цитоплазми, ядра видовженої форми, наявність поодиноких кіст малих розмірів з еозинофільним вмістом), та зі збільшенням термінів експерименту спостерігається зникнення прозорих вакуолей у цитоплазмі клітин. Це, на нашу думку та думку ряду авторів [4, с. 35; 15, с. 67–92] вказує на активні процеси виведення індоламінів у відповідь на дію стресорного агенту без формування запасів. У той же час, на всіх термінах дослідження виявляється продукція частиною пінеалоцитів поліпептидів, на що вказує морфологія клітин. Ядра таких пінеалоцитів мали овальну форму та були більш крупними у порівнянні з ядрами групи контрольних тварин, особливо у тварин важкого ступеня позаклітинного зневоднення. Такі збільшені у розмірах ядра мали просвітлену, багату еухроматином, хроматинову сітку з гіперхромним, гіпертрофованим ядерцем, розміщеним у центрі ядра. Крім того, більша частина таких ядер мала крайову маргінацію хроматину. Ознака крайової маргінації хроматину та збільшення кількості ядер з еухроматином та ядерцями, за даними Шкорбатова Ю.Г. [14, с. 22–25] є ознакою активації синтетичної активності клітин. Це вказує не тільки на збільшення морфофункціональної активності полі-

пептидпродукуючих пінеалоцитів у зв'язку з загальним високим навантаженням на залозу, але за думкою Губіної-Вакулик Г.І. [4, с. 36] має і компенсаторний характер у зв'язку зі зменшенням кількості пінеалоцитів за умов важкого ступеня позаклітинного зневоднення. На нашу думку, це можливо пояснити вичерпанням резервних синтетичних можливостей індолпродукуючих клітин та включенням компенсаторних можливостей за рахунок пептидпродукуючих клітин. Але, не можна не брати до уваги і порушення механізмів дифузії гормонів у кров та їх перенесення до органів-мішеней в результаті негативних морфологічних перебудов судинної стінки, збільшення в'язкості крові та порушення її реологічних властивостей. Це безумовно, негативно впливає на перебіг загального адаптаційного синдрому у відповідь на порушення водно-електролітного балансу організму.

У тварин з легким перебігом позаклітинного зневоднення спостерігалось збільшення експресії hsp90 α у цитоплазмі пінеалоцитів у порівнянні з негативними показниками експресії у пінеалоцитах контрольних тварин. Крім того, згідно літературних джерел, продукція пінеалоцитами білків теплового шоку (HSP) роблять ці клітини більш стійким до подальших екстремальних умов, розвивається стійкість до подальших стресів [17, с. 31]. Адже, ренатурація білків, пошкоджених під час стресу, є невід'ємною частиною стійкості до стресу. Встановлено, що Hsp90 відіграють важливу роль у контролі якості білків, направляючи пошкоджені білки до 26S протеосом для деградації, або ж іншим шаперонам (зокрема, Hsp70) для ренатурації [18, с. 894–895]. У стресових умовах, що приводять до накопичення в клітинах білків з порушеною конформацією, Hsp90, як вважають, частково переключаються на їх рефолдинг [19, с. 7288–7294]. Тобто, експресія білків теплового шоку у пінеалоцитах еспериментальних тварин за умови легкого ступеня позаклітинного зневоднення можна вважати одним з механізмів клітинного та органного захисту [17, с. 34].

Зважаючи на присутність у паренхімі епіфіза тварин з важким перебігом позаклітинної дегідратації незначної частини клітин з ядрами у стані пікнотичних перебудов, маргінацією хроматина, а також явища «розрідження паренхіми» може свідчити про процес апоптичної загибелі частини пінеалоцитів [4, с. 35–36; 16, с. 65–67]. Крім того, про зниження антиапоптичного захисту в пінеалоцитах тварин з важким

перебігом позаклітинного зневоднення свідчать і результати імуногістохімічних досліджень маркера теплового шоку (hsp90 α). Адже відомо, що білки теплового шоку беруть участь в захисті клітин від стрес-індукованого апоптозу, блокуючи шляхи його активації і стабілізуючи клітинні структури [7, с. 126]. Виявлено зменшення експресії hsp90 α у цитоплазмі пінеалоцитів, особливо тих, що розташовувалися у центральних ділянках залози. Очевидно, довготривала дія на організм розладів водно-електролітного балансу, зокрема позаклітинного зневоднення, чинить негативну дію на функціонування Hsp90 в пінеалоцитах епіфіза. Автори прийшли до думки, що розлади водно-електролітного балансу являються ініціаторами загибелі частини пінеалоцитів шляхом апоптозу.

5. Висновки

1. Порушення водно-сольового балансу організму (змодельованого позаклітинного зневоднення легкого та важкого ступенів) викликало негативні перебудови у всіх структурних компонентах епіфіза піддослідних тварин: стромальному, судинному та паренхіматозному. Ступінь виразності морфофункціональних перебудов в епіфізі знаходилася в прямій залежності від термінів експерименту, з найбільшою виразністю у тварин важкого ступеня позаклітинного зневоднення.

2. Морфологічні перебудови в епіфізі носили неспецифічний поліморфний характер. У епіфізі тварин з легким ступенем позаклітинного зневоднення спостерігалася напруження адаптивно-приспосувальних процесів, підвищення секреторної активності зі сторони як індолпродукуючих, так і поліпептидпродукуючих пінеалоцитів (з переважанням останніх), формування резервних можливостей залози. 30-ти добовий вплив на організм експериментальних тварин позаклітинного зневоднення викликало помірне підвищення експресії білків теплового шоку у пінеалоцитах, що, безумовно, робить ці клітини більш стійким до апоптичних перебудов та подальшої дії екстремальних стресорних чинників.

3. Із збільшенням термінів експерименту (важкий ступінь) спостерігалася значне зменшення розмірів залози, потовщення та набряк стромального компонента, різке порушення гемодинаміки в органі. Збільшувалася в'язкість крові, порушувалися її реологічні властивості (стаз,

сладж), збільшувалася проникність судинної стінки, розвивалися процеси прискороного апоптозу частини пінеалокитів, суттєво знижувався рівень білків теплового шоку у відповідь на дію пошкоджуючого агента. В експериментальних тварин важкого ступеня значно зменшувалася проліферативна активність астроцитарної глії, що підтверджувалося результатами дослідження імуногістохімічного маркера проліферації Ki-67.

4. 90-го добовий вплив на організм експериментальних тварин позаклітинного зневоднення викликало явище «субкомпенсації» хронічного стресу, що виражалося в вичерпанні резервних можливостей індоламінів епіфіза та термінової евакуації їх у кров для підтримання загальних адаптивних можливостей організму. При цьому, порушення морфології судинної стінки та збільшення в'язкості крові негативно вплинули на механізми дифузії гормонів епіфіза до судинного русла, розвиток в організмі в цілому компенсаторно-приспосувальних процесів та перебіг загального адаптаційного синдрому у відповідь на дію пошкоджуючого агента. Різке зниження рівня білків теплового шоку в органі вказує на суттєве послаблення антиапоптичного захисту та загальних механізмів антистресорного захисту, яскравим підтвердженням чого є морфологічні ознаки явища прискороного апоптозу в органі.

Перспективи подальших розробок базуються на проведенні подальших морфологічних, морфометричних, імуногістохімічних та біохімічних досліджень ендокринних залоз щурів в умовах різних видів порушень водно-сольового балансу організму.

Список літератури:

1. Полушин Ю.С. (2004). Руководство по анестезиологии и реаниматологии. С. Петербург : Наука: 13–16.
2. Погорелов М.В., Бумейстер В.І, Ткач Г.Ф., Болотна І.В., Бончев С.Д. (2009). Сучасні уявлення про водно-сольовий обмін (огляд літератури та методи власних досліджень). *Вісник проблем біології і медицини*, 2: 8–14.
3. Hryntsova N.B., Khomenko I.V., Romanyuk A.M., Bumeister V.I., Kravtsova I.A. (2019). Morphological and morphometric rearrangements of the rat adenohypophysial – thyroid system under the experimental extracellular dehydration. *Світ медицини та біології*, № 2(68): 178–183.
4. Губина-Вакулик Г.И. (2006). Попытка обобщения результатов патогистологического исследования эпифиза мозга. *Буковинський медичний вісник*, 10(4): 34–36.
5. Арушанян Э.Б. (2004). Антистрессорные возможности эпифизарного мелатонина. Мелатонин в норме и патологии. Москва: 222.

6. Денисенко С.А., Губина-Вакулик Г.И. (2009). Особенности морфофункционального состояния эпифиза мозга крыс-потомков при низкоинтенсивном электромагнитном облучении их матерей. *Проблемы эндокринной патологии*, 4: 112–117.
7. Никитин К.Д. (2008). Белки теплового шока: биологические функции и перспективы применения. *Клиническая онкогематология*, 1(2): 125–130.
8. Гула В.І. (2019). Структурні зміни фундального відділу шлунка за умов зневоднення організму : Текст дисертації на здобуття ступеня канд.мед.наук, спеціальність 14.03.01 – нормальна анатомія. Суми : Сумський державний університет: 273.
9. Гринцова Н.Б., Романюк А.М. (2020). Спосіб ідентифікації і атравматичного вилучення епіфіза у щурів/ Патент на корисну модель № 142276 від 25.05.20 Державного реєстру патентів України на корисні моделі.
10. Гринцова Н.Б., Романюк А.М., Линдін М.С., Линдіна Ю.М. (2020). Модифікований спосіб приготування гістологічних препаратів епіфіза щурів/ Патент на корисну модель № 142314 від 25.05.2020 Державного реєстру патентів України на корисні моделі.
11. Линдін М.С. (2015). Морфогенез інфільтративного протокового раку молочної залози в умовах забруднення довкілля солями важких металів : Текст дисертації на здобуття ступеня канд.мед.наук, спеціальність 14.03.02 – патологічна анатомія. Суми : Сумський державний університет: 188.
12. Луцик С.О., Ященко А.М. (2018). Імуногістохімічне дослідження надниркових залоз нащадків щурів, що розвивались в умовах експериментального гіпо- та гіпертиреозу материнського організму. *Світ медицини та біології*, 4 (66): 175–180.
13. Дроздова Г.А., Самигулина А.Ф., Нургалева Е.А. (2017). Постгипоксическая реакция астроглиальных клеток зрительной коры в эксперименте. *Казанский медицинский журнал*, 98(6): 984–988.
14. Shkhorbatov Yu.G. (2005) Structural and electrochemical power of the nuclei of the civil society of people with the sound of physical and chemical factors and the great functionality of the body : abstract. dis. ... doc. biologist. sciences : 03.00.11. Kiev : Kiev State University: 27.
15. Бондаренко Л.А., Губина-Вакули Г.И., Геворгян А.Р. (2013). Пинеальная железа и гипоталамо-гипофизарно-тиреоидная система: возрастные и хронобиологические аспекты. Харьков : Институт эндокринной патологии: 262.
16. Манских В.Н. (2004). Морфологические методы верификации и количественной оценки апоптоза. *Бюллетень сибирской медицины*, 1: 63–70.
17. Жданов Д.Д., Орлова В.С. (2007). Белки теплового шока в качестве механизма клеточной защиты. *Вестник РУДН. Сер. Экология и безопасность жизнедеятельности*, 2: 31–34.
18. Козеко Л.Е. (2010). Белки теплового шока 90 КДА: разнообразие, структура и функции. *Цитология*, 52(11): 893–910.
19. Jakob U., Lilie H., Meyer I., Buchner J. (1995). Transient interaction of hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase-implications for heat shock in vivo. *J. Biol. Chem*, 270: 7288–7294.

References:

1. Polushin Yu.S. (2004) Rukovodstvo po anesteziologii i reanimatologii [Guide to Anesthesiology and Resuscitation]. S. Peterburg: Nauka. (in Russian)
2. Poghorjelov M.V., Bumejster V.I., Tkach Gh.F., Bolotna I.V., Bonchev S.D. (2009) Suchasni ujavlennja pro vodno-soljovyj obmin (oghljad literatury ta metody vlasnykh doslidzhenj) [Modern ideas about water-salt metabolism (literature review and methods of own research)]. *Visnyk problem biologhiji i medycyny*, no. 2, pp. 8–14.
3. Hryntsova N.B., Khomenko I.V., Romanyuk A.M., Bumeister V.I., Kravtsova I.A. (2019) Morphological and morphometric rearrangements of the rat adenohypophysial – thyroid system under the experimental extracellular dehydration. *The world of medicine and biology*, no. 2(68), pp. 178–183.
4. Gubina-Vakulik G.I. (2006) Popytka obobshcheniya rezul'tatov patogistologicheskogo issledovaniya epifiza mozga [An attempt to generalize the results of histopathological examination of the brain pineal gland]. *Bukovins'kiy medichnij visnik*, vol. 10, no. 4, pp. 34–36.
5. Arushanyan E.B. (2004) Antistressornye vozmozhnosti epifizarnogo melatonina. Melatonin v norme i patologii [Antistress capabilities of epiphyseal melatonin. Melatonin in health and disease]. Moskva: Nauka. (in Russian)
6. Denisenko S.A., Gubina-Vakulik G.I. (2009) Osobennosti morfofunktsional'nogo sostoyaniya epifiza mozga kryss-potomkov pri nizkointensivnom elektromagnitnom obluchenii ikh materey [Features of the morphofunctional state of the brain pineal gland of offspring rats at low-intensity electromagnetic irradiation of their mothers]. *Problemi endokrinnoi patologii*, no. 4, pp. 112–117.
7. Nikitin K.D. (2008) Belki teplovogo shoka: biologicheskie funktsii i perspektivy primeneniya [Heat shock proteins: biological functions and application prospects]. *Klinicheskaya onkogematologiya*, vol. 1, no. 2, pp. 125–130.
8. Ghula V.I. (2019) Strukturni zminy fundaljnogho viddilu shlunka za umov znevodnennja orghanizmu [Structural changes of the stomach fundus under conditions of dehydration] (PhD Thesis), Sumy: Sumy State University.
9. Ghryncova N.B., Romanjuk A.M. (2020) Sposib identyfikaciji i atravmatychnogho vyluchennja epifiza u shhuriv [Method for identification and atraumatic removal of pineal gland in rats]. *Patent na korysnu modelj*, no. 142276 from 25.05.2020, State Register of Patents of Ukraine for Utility Models.
10. Ghryncova N.B., Romanjuk A.M., Lyndin M.S., Lyndina Ju.M. (2020) Modyfikovanyj sposib prygotuvannja ghistologichnykh preparativ epifiza shhuriv [A modified method of preparation of histological preparations of the rats pineal gland]. *Patent na korysnu modelj*, no. 142314 from 25.05.2020, State Register of Patents of Ukraine for Utility Models.
11. Lyndin M.S. (2015) Morfogenez infiljratyvnogho protokovogho raku molochnoji zalozy v umovakh zabrudnennja dovkillja soljamy vazhkykh metaliv [Morphogenesis of infiltrative ductal breast cancer under conditions of environmental pollution by heavy metal salts] (PhD Thesis), Sumy: Sumy State University.
12. Lucyk S.O., Jashhenko A.M. (2018) Imunohistokhimichne doslidzhenja nadnyrkovykh zaloz nashhadkiv shhuriv, shho rozvyvalysj v umovakh

eksperimentaljnogho ghipo- ta ghipertyreozu materynsjkogho orghanizmu [Immunohistochemical study of the adrenal glands of the offspring of rats that developed under conditions of experimental hypo- and hyperthyroidism of the maternal organism]. *Svit medycyny ta biologiji*, vol. 4(66), pp. 175–180.

13. Drozdova G.A., Samigullina A.F., Nurgaleeva E.A. (2017) Postgipoksicheseskaya reaktsiya astroglial'nykh kletok zritel'noy kory v eksperimente [Posthypoxic reaction of astroglial cells of the visual cortex in the experiment]. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*, vol. 98, no. 6, pp. 984–988.

14. Shkorbatov Yu.G. (2005) Structural and electrochemical power of the nuclei of the civil society of people with the sound of physical and chemical factors and the great functionality of the body. (MDS Thesis), Kiev: Kiev State University.

15. Bondarenko L.A., Gubina-Vakuli G.I., Gevorgyan A.R. (2013) Pineal'naya zheleza i gipotalamo-gipofizarno-tireoidnaya sistema: vozrastnye i khronobiologicheskie aspekty [Pineal gland and hypothalamic-pituitary-thyroid system: age and chronobiological aspects]. Kharkiv: Institute of Endocrine Pathology. (in Ukraine)

16. Manskikh V.N. (2004) Morfologicheskie metody verifikatsii i kolichestvennoy otsenki apoptoza [Morphological methods for verification and quantitative assessment of apoptosis]. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*, no. 1, pp. 63–70.

17. Zhdanov D.D., Orlova V.S. (2007) Belki teplovogo shoka v kachestve mekhanizma kletochnoy zashchity [Heat shock proteins as a cellular defense mechanism]. *Vestnik RUDN. Ser. Ekologiya i bezopasnost' zhiznedeyatel'nost*, no. 2, pp. 31–34.

18. Kozeko L.E. (2010) Belki teplovogo shoka 90 KDA: raznoobrazie, struktura i funktsii [Heat shock proteins 90 KDA: variety, structure and function]. *Tsitologiya*, vol. 52, no. 11, pp. 893–910.

19. Jakob U., Lilie H., Meyer I., Buchner J. (1995) Transient interaction of hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase-implications for heat shock *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, no. 270, pp. 7288–7294.