

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ШАМЕНКО ВАДИМ ОЛЕКСАНДРОВИЧ



УДК: 616.831.4-018.83:577.175.7]:616-008.922.1-039.34]-092

**ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ВАЗОПРЕСИНЕРГІЧНОЇ СИСТЕМИ  
ГІПОТАЛАМУСА ВНАСЛІДОК ДІЇ ПЕРЕРИВЧАСТОЇ  
ГІПОКСИЧНОЇ ГІПОКСІЇ**

14.03.04 – патологічна фізіологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук

Запоріжжя – 2020

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Запорізькому державному медичному університеті МОЗ України.

**Науковий керівник:**

доктор медичних наук, професор **Абрамов Андрій Володимирович**, професор кафедри патологічної фізіології Запорізького державного медичного університету МОЗ України.

**Офіційні опоненти:**

доктор медичних наук, професор **Ткачук Світлана Сергіївна**, завідувач кафедри фізіології ім. Я.Д. Кіршенבלата ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет».

доктор медичних наук, професор **Хара Марія Романівна**, професор кафедри патологічної фізіології ДВНЗ «Тернопільський національний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України».

Захист відбудеться «17» вересня 2020 р. о 13<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 17.600.04 при Запорізькому державному медичному університеті МОЗ України (69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Запорізького державного медичного університету МОЗ України (69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26).

Автореферат розісланий «17» серпня 2020 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
к.мед.н., доцент



Т.В. Іваненко

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Науковий інтерес щодо ролі вазопресинергічної системи гіпоталамуса в механізмах підтримки внутрішнього гомеостазу організму та його адаптації до дії різноманітних факторів зовнішнього середовища зберігається і до сьогодні. На це звертають увагу автори чисельних наукових оглядів [Charmandari E. et al., 2012; Lightman S.L., 2012; Calabrò R.S. et al., 2012; Szczepanska-Sadowska E. et al., 2018; Russell J.A. et al., 2018, 2019]. Це пов'язано з пластичністю функції вазопресинергічних нейронів та власне вазопресину, який у якості ендogenous регулятора виконує координуючу роль у взаємодії ЦНС і периферійних систем організму [Armstrong W.E. et al., 2010; Rotondo F. et al., 2016].

Вазопресинергічна система мозку анатомічно й функціонально відокремлена існуванням гіпоталамічної нейросекреторної системи крупноклітинних нейронів паравентрикулярних (ПВЯ) і супраоптичних (СОЯ) ядер, а також дрібноклітинних нейронів ПВЯ [Swanson L.W., et al., 1983; Silverman A.-J. et al., 1983]. Нейроендокринна реакція на стрес є типовим прикладом пластичності нервової системи, яка реагує на спровоковані порушення гомеостазу шляхом зміни своєї активності для забезпечення поточних і майбутніх потреб організму [Caldwell H.K. et al., 2008; Goodson J.L. 2008; Russell G., Lightman S., 2019]. На рівні гіпоталамуса основними стрес-реалізуючими компонентами є кортикотропін-релізінг-гормон-синтезуючі і вазопресин-синтезуючі нейрони, які здатні швидко реагувати на гострий стрес збільшенням секреції гормонів, але внаслідок хронічного стресу уповільнюють секрецію кортиколіберину на тлі збільшення секреції вазопресину [Fragala M.S. et al., 2011; Leng, G. et al., 2015]. Відомо, що гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальна система (ГТАКС) має вирішальне значення для відновлення гомеостазу і підтримки стану здоров'я, проте дизрегуляторні процеси з боку ГТАКС, філогенетично найбільш давнім компонентом якої є вазопресинергічна система гіпоталамуса, призводять до появи так званих хвороб, пов'язаних із хронічним стресом [Chrousos G.P., 2009; Russell G., Lightman S., 2019]. Це обумовлює важливу роль вазопресинергічної системи у програмуванні механізмів взаємовідносин нейроендокринної та імунної систем і пов'язану з цим її роль у механізмах запалення та патогенезі інфекційних хвороб [Pittman Q.J., 2011; Russell J.A., 2018], а також у протидії критичним станам у тяжко хворих пацієнтів [Sharshar T., Annane D., 2008; Russell J.A., 2019].

Слід зауважити, що одним із найбільш поширених патологічних впливів на організм є дія гіпоксії, в тому числі як зовнішнього чинника. Але багатоденний вплив дозованої екзогенної гіпоксичної гіпоксії призводить до активації ГТАКС як у тварин, так і у людини, та сприяє підвищенню функціональної активності гіпоталамічних пептидергічних нейронів [Абрамов А.В., 1998, 2004; Kolesnik Y.M. et al., 2014; Khoshnam S.E. et al., 2017]. Режим переривчастих гіпоксичних впливів надає адаптуючих властивостей організму і призводить до підвищення його стійкості до багатьох патогенних факторів

середовища: гострої гіпоксії, гіпокапнії, токсичної дії високих тисків кисню, гіпокінезії, дії високої температури або глибокого охолодження, іонізуючого випромінювання, фізичного навантаження [Караш Ю.М. із співавт., 1988; Агаджанян Н. А. із співавт., 1997; Sprick J.D. et al., 2019; Chen P.S. et al., 2020]. Різноманіття проявів ефектів гіпоксичних тренувань пов'язане з тим, що зміни, які виникають під впливом цього чинника, спостерігаються в багатьох органах і системах організму, головним чином – у системі дихання, кровообігу, еритроциту та ендокринній системі [Myers D.A., Ducsay C.A., 2014; Serebrovskaya T.V., Xi L., 2016; Dudnik E. et al., 2018; Chen P.S. et al., 2020]. У той же час, питання участі пептидергічних систем мозку і, зокрема, вазопресинергічної системи гіпоталамуса, в центральних механізмах адаптації до гіпоксичної гіпоксії розглядається лише в поодиноких роботах і тому вважається недостатньо вивченою науковою проблемою.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри патологічної фізіології Запорізького державного медичного університету МОЗ України «Закономірності формування метаболічних порушень, нейроендокринного та вегетативного дисбалансів в патогенезі експериментальної артеріальної гіпертензії різного генезу», 2014-2016 рр. (№ державної реєстрації 0114U000966), «Роль пептидергічних структур гіпоталамусу та стовбуру мозку в патогенезі артеріальної гіпертензії», 2017–2019 рр. (№ державної реєстрації 0117U0002579), та науково-дослідної роботи Навчального медико-лабораторного центру Запорізького державного медичного університету МОЗ України «Механізми реакції органів з різним регенераторним потенціалом на ушкодження», 2016-2019 рр. (№ держреєстрації 0116U005352).

**Мета дослідження:** вивчити особливості морфофункціонального стану вазопресинергічної системи гіпоталамуса за умов дії переривчастої гіпоксичної гіпоксії та у постгіпоксичний період.

**Завдання дослідження:**

1. Вивчити розподіл нейронів, що синтезують вазопресин, у гіпоталамічних ядрах щурів у нормі, встановити їх морфометричні характеристики і визначити концентрацію [Arg<sup>8</sup>]-вазопресина і РНК в нейронах.

2. Вивчити розподіл нейронів, що синтезують вазопресин, у гіпоталамічних ядрах щурів після 15-ти сеансів гіпоксичної гіпоксії, встановити їх морфометричні характеристики і визначити концентрацію [Arg<sup>8</sup>]-вазопресина і РНК в нейронах.

3. Вивчити розподіл нейронів, що синтезують вазопресин, у гіпоталамічних ядрах щурів через 10 днів після закінчення гіпоксичних сеансів, встановити їх морфометричні характеристики і визначити концентрацію [Arg<sup>8</sup>]-вазопресина і РНК в нейронах.

4. Вивчити особливості експресії генів *hif1a* і *hif3a* в гіпоталамусі щурів у нормі, після 15-ти сеансів гіпоксичної гіпоксії і в постгіпоксичний період.

5. Вивчити особливості експресії білків HIF-1 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$  і cFos в вазопресинергічних нейронах ядер гіпоталамуса.

*Об'єкт дослідження:* вазопресинергічні нейрони гіпоталамуса щурів лінії Вістар.

*Предмет дослідження:* функціональний стан вазопресинергічної системи гіпоталамуса в умовах багатоденної дії переривчастої гіпоксичної гіпоксії.

*Методи дослідження:* патофізіологічні, морфометричні, гістохімічні, імунофлуоресцентні, методи аналізу гістологічного матеріалу, молекулярно-генетичний метод, комп'ютерний аналіз зображень і методи математичної статистики, класифікаційний і кореляційний аналіз.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Уперше, на підставі комплексного імуногістохімічного та імунофлуоресцентного аналізу серійних зрізів гіпоталамуса встановлені якісні та кількісні критерії функціональної активності вазопресинергічної системи гіпоталамуса при багатоденній дії переривчастої гіпоксичної гіпоксії та у постгіпоксичний період.

Вперше встановлено, що переривчаста дія гіпоксичної гіпоксії впродовж 15 днів стимулює функціональну активність крупноклітинних нейронів задньолатерального суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса і дрібноклітинних нейронів медіального суб'ядра паравентрикулярного ядра, стимулює в них синтез і секрецію вазопресину, поєднану з посиленням утворення білка-маркера нейросекреції cFos і специфічних білків-маркерів гіпоксичної стимуляції HIF-1 $\alpha$  і HIF-3 $\alpha$ .

Вперше доведено, що після 10 днів постгіпоксичного періоду функціональна активність вазопресинергічних нейронів задньолатерального суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса зберігається на високому рівні і поєднується з підвищеним синтезом у нейроцитах і секрецією нейрогормона, білків HIF-1 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$  і cFos.

Вперше встановлено, що після 10 днів постгіпоксичного періоду знижується функціональна активність вазопресинергічних нейронів медіального дрібноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра зі зниженням в них синтезу і секреції вазопресину та білка cFos при збереженні високого рівня утворення білка HIF-1 $\alpha$  в нейроцитах.

Доповнені наукові уявлення про особливості функціональної реакції вазопресинергічних нейронів супраоптичного ядра на багатоденну дію переривчастої гіпоксичної гіпоксії, які проявляються відсутністю специфічної реакції на гіпоксичний стимул у вигляді синтезу білків HIF-1 $\alpha$  і HIF-3 $\alpha$ , і гальмуванням синтезу білка cFos і вазопресину, а також формуванням дистрофічних морфогістологічних змін у нейроцитах. Показано, що 10-денний постгіпоксичний період є недостатнім для повноцінного відновлення функціональної активності супраоптичних нейронів.

Доповнені наукові уявлення про особливості експресії генів сімейства *hif* при переривчастій дії гіпоксичної гіпоксії, що приводить до зростання концентрації мРНК до білків HIF-1 $\alpha$  і HIF-3 $\alpha$  в тканині медіобазального

гіпоталамуса зі збереженням високих показників експресії генів сімейства *hif* впродовж 10-денного постгіпоксичного періоду.

**Практичне значення одержаних результатів.** Робота є фундаментальним дослідженням. Її результати розширюють наукові уявлення про патогенетичні особливості участі вазопресинергічної системи гіпоталамуса в механізмах нейроендокринної адаптації до багатоденної дії гіпоксичної гіпоксії. Методичні підходи до моделювання та кількісні методи аналізу нейроендокринної реакції нейронів на гіпоксичний стимул розширюють практичні можливості для дослідження і оцінки реакції клітин мозку при фізіологічних навантаженнях, дії інших чинників середовища та при моделюванні патологічних станів.

Нові теоретичні положення дисертації використовуються в навчальному процесі на кафедрі патологічної фізіології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України, кафедрі патофізіології Української медичної стоматологічної академії МОЗ України, кафедрі загальної та клінічної патофізіології ім. В.В. Підвисоцького Одеського національного медичного університету МОЗ України, кафедрі патологічної фізіології Буковинського державного медичного університету МОЗ України, кафедрі патологічної фізіології Запорізького державного медичного університету МОЗ України.

**Особистий внесок дисертанта.** Дисертаційна робота є самостійно виконаним дослідженням автора, науковим керівником визначені тема і складена програма дослідження. Дисертант особисто виконав патентно-інформаційний пошук і аналіз літератури, а також патофізіологічні, гістохімічні, морфометричні, денситометричні, імунофлуоресцентні та молекулярно-генетичні методи дослідження матеріалу; провів статистичний аналіз отриманих даних, систематизував та інтерпретував отримані результати; написав усі розділи дисертації; сформулював висновки.

**Апробація результатів дисертації** відбулася на засіданні кафедр патологічної фізіології, нормальної фізіології, анатомії людини, патологічної анатомії і судової медицини, лабораторної діагностики, мікробіології, вірусології та імунології, фармакології та медичної рецептури Запорізького державного медичного університету МОЗ України 02.06.2020 р.

Основні положення роботи були представлені та обговорені на: VI науково-практичній конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів» (Тернопіль, 2013); науково-практичній конференції «Сучасні проблеми біологічної хімії» (Харків, 2013); науково-практичній конференції «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології (14-ті Данилевські читання)» (Харків, 2015); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми сучасної патоморфології та патофізіології» (Запоріжжя, 2015); VIII науково-практичній конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (Тернопіль, 2015); VII Національному з'їзді патофізіологів України «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції» (Харків,

2016); науковій конференції, присвяченій 120-річчю від дня народження та 40-річчю від дня смерті акад. М.М. Сиротиніна (Київ, 2017); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 105-річчю від дня народження професора Я.Д. Кіршенבלата «Фізіологія і патологія нейроімуноендокринної регуляції» (Чернівці, 2017); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих учених «Медична наука в практику охорони здоров'я» (Полтава, 2017); VII Пленумі Українського наукового товариства патофізіологів та науково-практичній конференції, присвяченій 110-річчю з дня народження члена-кореспондента АМН СРСР, професора М. Н. Зайка «Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики» (Полтава, 2018); XX з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка (Київ, 2019); II науково-практичній internet-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція» (Харків, 2019).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 17 наукових праць: 7 статей у наукових фахових виданнях України, серед яких 3 статті у журналах, які індексуються міжнародними наукометричними базами; 1 стаття у закордонному виданні, та 9 тез у матеріалах міжнародних і Всеукраїнських науково-практичних конференцій.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 186 сторінках машинопису і складається з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 4 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, додатків. Робота ілюстрована 34 рисунками та 20 таблицями. Список літератури містить 350 джерел (73 кирилицею та 277 латиницею).

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали і методи дослідження.** Дослідження проведено на 50 самцях щурів лінії Wistar віком 5-6 місяців, які були поділені на три групи: інтактні щури (контроль, n=15), тварини, які піддавались впливу переривчастої гіпоксичної гіпоксії (n=35), з яких частина (n=15) спостерігалася впродовж 10-денного постгіпоксичного періоду. Тварин утримували у стандартних умовах віварію.

Всі експерименти здійснювалися в суворій відповідності до національних «Спільних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), які узгоджуються з директивою Ради 2010/63EU Європейського парламенту і Ради від 22 вересня 2010 року з захисту тварин, що використовують для наукових цілей (Council Directive 2010/63EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes).

Комісією з питань біоетики Запорізького державного медичного університету МОЗ України (протокол № 5 від 12.03.2020 р.) порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено.

*Переривчасту гіпоксичну гіпоксію (ГГ)* моделювали щоденним перебуванням тварин упродовж 6 годин у вентиляльованій барокамері об'ємом 0,5 м<sup>3</sup>. Режим ГГ був наступним: 1-ша експозиція на висоті 1 км, на кожний наступний день – на 1 км вище, з 6-го і в наступні 10 днів – 6 км (pO<sub>2</sub>=75 мм рт. ст., або 9,8 % O<sub>2</sub>).

Для виготовлення гістологічного матеріалу експериментальних тварин декапітували під наркозом (етамінал натрію 40 мг/кг внутрішньочеревно), вилучали мозок, який фіксували у рідині Карнуа (для морфометрії і визначення РНК) або/та рідині Буена (для постановки імунофлуоресцентної реакції). Після стандартної гістологічної обробки мозок заливали у парапластові блоки, з котрих отримували серійні фронтальні зрізи гіпоталамуса завтовшки 7 мкм для ідентифікації РНК, або 14 мкм – для постановки імунофлуоресцентної реакції.

Для морфометрії та визначення РНК зрізи гіпоталамуса депарафінували та забарвлювали за Ейнарсеном. Аналіз проводили на комп'ютерній системі цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия). Аналізували параметри площі нейронів, ядер, цитоплазми, ядерець, та відносний вміст у них РНК.

Для проведення імунофлуоресцентної реакції серійні зрізи гіпоталамуса депарафінували, регідрували та інкубували з первинними антитілами (Santa Cruz Biotechnology, США) до [Arg<sup>8</sup>]-вазопресину (sc-390723), білків cFos (sc-271243), HIF-1α (sc-53546) і HIF-3α (sc-390769). У якості вторинних антитіл використовували m-IgGк ВР, кон'юговані з FITC (sc-516140, Santa Cruz Biotechnology).

Кількісний аналіз імунофлуоресцентної реакції здійснювали на мікроскопі AxioImager-M2 зі світлофільтром 38HE та камерою AxioCam-HRm (Carl Zeiss, Німеччина) і засобами програмного пакету цифрового аналізу зображення AxioVision-4.8.2 (Carl Zeiss, Німеччина, ліцензія № 3005339). Аналізували параметри площі імунореактивного матеріалу (IPM) до вазопресину, білків HIF-1α, HIF-3α, cFos та їх концентрацію у перікаріоні та аксонах нейронів. Обчислювали сумарний вміст визначених біомаркерів загалом у гіпоталамічній структурі (ядрі, суб'ядрі).

Аналіз експресії генів *hif1α* *hif3α* здійснювали методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу з використанням специфічних пар праймерів. Аналіз даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення CFX Manager (Bio-Rad, США). Рівень мРНК визначали відносно експресії референсного гену *GAPDH*.

Статистична обробка отриманих результатів проводилась за допомогою програмного пакета EXCEL 2003 (Microsoft Corp., США) з програмною надбудовою AtteStat і за допомогою статистичного пакету «STATISTICA» (StatSoft Inc., США, ліцензія № AXXR712D833214FAN5).



### Результати дослідження та їх обговорення.

Переривчаста гіпоксична гіпоксія (ГГ) призводила до гіпертрофії нейронів медіального дрібноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра (мдПВЯ) зі збільшенням площі нейронів на  $10,6 \pm 2,2$  % ( $p < 0,001$ ) за рахунок збільшення площі їх цитоплазми (на  $23,4 \pm 3,4$  %) і підвищенням вмісту РНК в цитоплазмі на  $36,8 \pm 7,5$  % ( $p < 0,001$ ) (рис. 1). Гіпоксичні впливи призводили й до помірної гіпертрофії нейронів задньолатерального крупноклітинного суб'ядра ПВЯ (злкПВЯ) зі збільшенням площі нейронів на  $14,1 \pm 2,6$  % ( $p < 0,001$ ) та підвищенням вмісту РНК в цитоплазмі на  $6,1 \pm 3,7$  % ( $p < 0,001$ ). На відміну від реакції ПВЯ, у крупноклітинному супраоптичному ядрі (СОЯ), ГГ призводила до дистрофічних змін в нейронах та зниження у нейроцитах вмісту РНК.

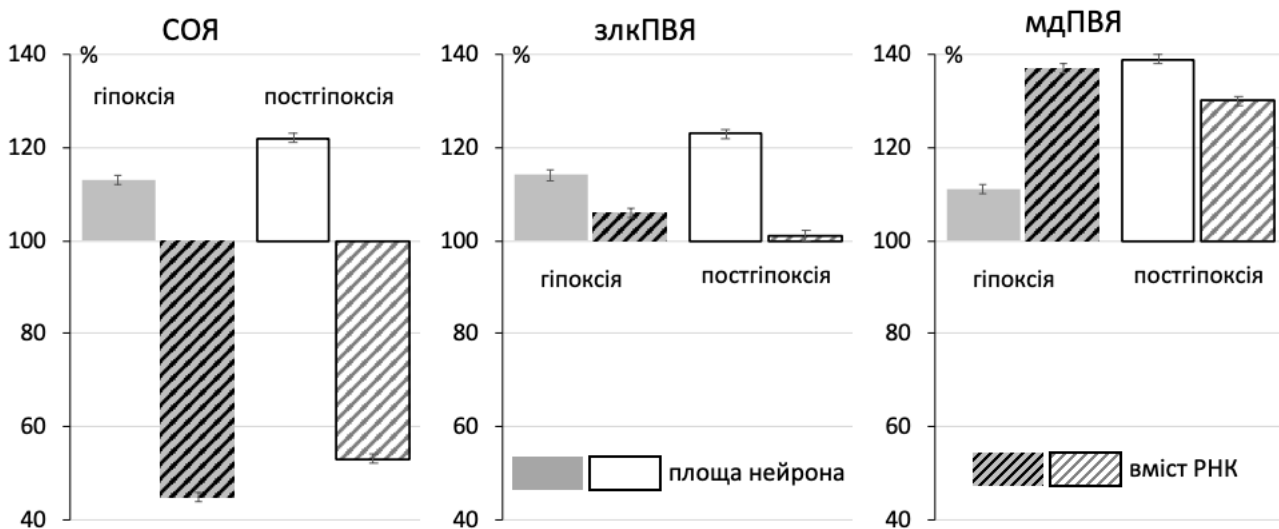


Рисунок 1 – Морфоденситометричні характеристики вазопресинергічних нейронів гіпоталамуса. Примітка: тут і надалі показники контролю прийняті за 100%.

По закінченні 10-денного постгіпоксичного періоду у нейронах мдПВЯ зберігалися ознаки гіпертрофії і підвищеного синтезу РНК, тоді як збереження гіпертрофії крупноклітинних нейронів злкПВЯ супроводжувалося уповільненням синтезу РНК до показників контролю. У нейронах СОЯ у цей час відзначалася часткова редукція дистрофічних змін, проте рівень РНК в нейроцитах не відновлювався.

Вважається, що реакцією клітин на гіпоксію є підвищення концентрації білків із сімейства факторів, індукованих гіпоксією, а саме – білків HIF-1 $\alpha$  і HIF-3 $\alpha$ , які у ссавців, у свою чергу, є провідними транскрипційними регуляторами генів, відповідальних за реакцію на нестачу кисню [Majmundar A.J. et al., 2010; Zagórska A, Dulak J., 2014]. Зокрема, білок HIF-1 $\alpha$  змінює експресію генів, які контролюють транспорт глюкози і гліколіз, що забезпечує швидку адаптацію клітин до умов гіпоксії [Wang G.L. et al., 1995; Majmundar A.J. et al., 2010; Prabhakar N.R, Semenza G.L., 2012].

Здатністю клітин організму, й особливо нейронів, реагувати на вплив гіпоксії, є підвищення синтезу білків сімейства HIF. Особливістю впливу ГГ

було суттєве підвищення експресії генів *hif-1α* и *hif-3α* у медіобазальному гіпоталамусі зі збільшенням концентрації мРНК до HIF-1α у 12,8 раза та у 8,6 раза до HIF-3α (рис. 2).

Серед структур гіпоталамуса найбільш потужною була реакція на гіпоксію вазопресинергічних нейронів злкПВЯ у вигляді збільшення площі імунореактивного матеріалу (ІРМ) до білка HIF-1α в 1,5 раза, поєднаного зі зростанням його вмісту в нейронах у 3,4 раза порівняно з контрольними тваринами. У злкПВЯ у 2 рази збільшувалася площа ІРМ до білка HIF-3α та в 3 рази зростав вміст білка в нейронах. У мдПВЯ ГГ призводила до зростання площі ІРМ до білка HIF-1α в 1,6 раза ( $p < 0,001$ ) і підвищення у 2,5 раза його вмісту в нейронах. У той же час, гіпоксичні впливи не змінили параметри ІРМ до білка HIF-3α, проте на 73,5 % ( $p < 0,001$ ) збільшили його вміст у мдПВЯ. Нейрони СОЯ реагували на гіпоксію зменшенням імунореактивності до білків HIF-1α і HIF-3α, але достовірних змін вмісту цих білків у нейронах не спостерігалось.

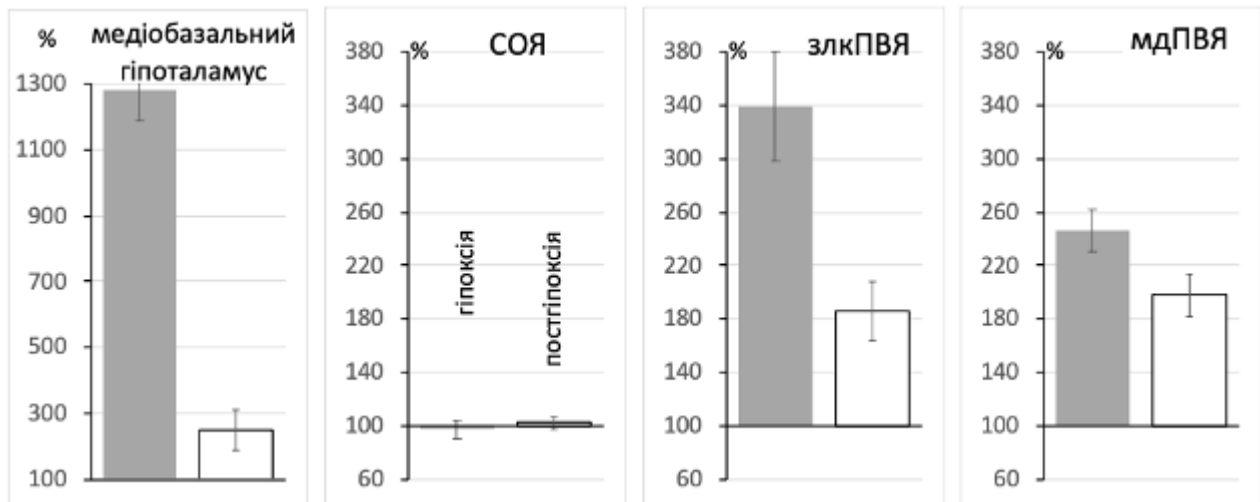


Рисунок 2 – Концентрація мРНК до HIF-1α у медіобазальному гіпоталамусі та вміст білка HIF-1α у структурах гіпоталамуса.

Постгіпоксичний період, порівняно з гіпоксичним, характеризувався зниженням концентрації мРНК до білків HIF-1α і HIF-3α в медіобазальному гіпоталамусі, але рівень мРНК до білка HIF-1α у 2,5 раза перевищував показник контролю. У нейронах злкПВЯ відбувалося зменшення площі ІРМ до білка HIF-1α до рівня контролю. При цьому на 55 % зменшувався ( $p < 0,002$ ) вміст білка HIF-1α в нейронах порівняно з періодом дії ГГ. Проте, даний показник залишався практично в 2 рази вищим, ніж у контрольних тварин. Подібні зміни відзначалися і в динаміці експресії білка HIF-3α в злкПВЯ: у постгіпоксичний період площа ІРМ до білка в нейронах злкПВЯ знижувалася на 39 % ( $p < 0,001$ ), а вміст білка HIF-3α в нейронах, порівняно з періодом ГГ, зменшувався на 60 % ( $p < 0,001$ ), але залишався на 20 % більшим ( $p < 0,05$ ), ніж у контролі. У постгіпоксичний період у мдПВЯ площа ІРМ до білка HIF-1α не зменшувалася порівняно з періодом ГГ, а вміст білка в нейронах, хоч і дещо

зменшувався, однак залишився у 2 рази вищим, ніж у контролі. Поряд із цим, у ділянці мдПВЯ спостерігалася збільшення ІРМ до білка НІF-3 $\alpha$ , величина якого зростала і на 40 % перевищувала ( $p < 0,001$ ) показники контролю. При цьому збільшення імунореактивності не відображалася на вмісті даного білка в структурі ( $p > 0,05$ ). У постгіпоксичний період у СОЯ частково відновлювалася експресія білка cFos і показники імунореактивності до білків НІF-1 $\alpha$  і НІF-3 $\alpha$ .

Головним показником функціональної активності гіпоталамічних нейросекреторних нейронів є синтез вазопресину, як основного нейрогормону у злкПВЯ, вазопресину у мдПВЯ, як ко-гормону до кортикотропін-рилізинг гормону – головного активатора ГТАКС, та вазопресину поряд з окситоцином у СОЯ. Нейросекреторна відповідь злкПВЯ на гіпоксію не призводила до зміни загальної площі ІРМ до вазопресину, проте в окремих нейронах ІРМ зростала на  $11,2 \pm 4,1$  % ( $p < 0,001$ ). Це мало свідчити про те, що гіпоксичні впливи не приводили до збільшення числа крупноклітинних нейронів, які синтезують вазопресин, однак посилювали процеси синтезу гормону в окремих нейронах. У цитоплазмі нейронів злкПВЯ відзначалося підвищення концентрації вазопресину у 2,5 рази і його вмісту в перикаріоні нейроцитів у 2,1 рази відносно контролю. При цьому сумарний вміст вазопресину в злкПВЯ у відповідь на дію ГГ збільшувався практично у 6 разів (рис. 3). ГГ призводила до зростання на  $28,8 \pm 5,3$  % ( $p < 0,05$ ) ІРМ до вазопресину в аксонах нейронів злкПВЯ та сумарного вмісту нейрогормону в аксонах у 6,1 рази – в тому ж кількісному співвідношенні, що і вміст вазопресину у перикаріоні самих нейронів. Таким чином, ГГ спричиняла потужне збільшення синтезу та секреції вазопресину крупноклітинними нейронами ПВЯ.

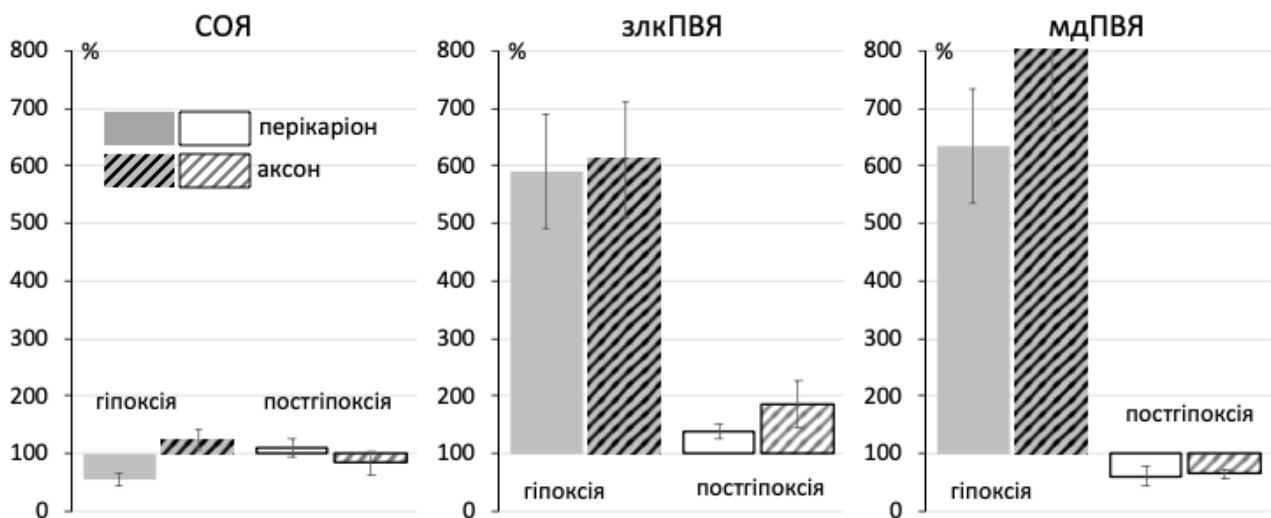


Рисунок 3 – Вміст вазопресину в перикаріоні і аксонах нейронів гіпоталамуса.

Під дією ГГ у нейронах медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ в 1,6 рази збільшувалася ( $p < 0,001$ ) площа ІРМ до вазопресину, а загальна імунореактивність в мдПВЯ зростала на 22,5 % ( $p < 0,001$ ), що свідчило про збільшення пулу нейронів, які синтезують вазопресин у відповідь на гіпоксію. У перикаріоні нейронів мдПВЯ у 2,5 рази збільшувалася концентрація

вазопресину та у 6,3 раза зростав загальний вміст нейрогормону. В аксонах нейронів мдПВЯ відзначалося майже 10-кратне зростання ІМР до вазопресину зі збільшенням загального вмісту вазопресину у 8 разів. Це свідчило про те, що поряд із посиленням біосинтезу вазопресину, гіпоксичні впливи стимулювали нейросекреторну функцію дрібноклітинних нейронів мдПВЯ.

Нейросекреторна відповідь нейронів СОЯ на ГГ характеризувалася обмеженням імунореактивності до вазопресину в перікаріоні нейронів, зменшенням його концентрації і сумарного вмісту, що свідчило про обмеження процесів біосинтезу вазопресину в крупноклітинних нейронах СОЯ. Разом із тим, в аксонах нейронів СОЯ спостерігалось помірне збільшення імунореактивності і сумарного вмісту вазопресину, що свідчило про деяке прискорення процесів секреції нейрогормона.

У постгіпоксичному періоді в ПВЯ спостерігалось уповільнення вазопресин-синтезуючої та нейросекреторної активності. Так, площа ІМР до вазопресину і його концентрація у перікаріоні нейронів злкПВЯ зменшувалася до рівня контрольних показників. При цьому загальний вміст вазопресину в злкПВЯ залишався на  $38,2 \pm 7,3$  % більшим ( $p < 0,005$ ), ніж у контролі. В аксонах нейронів злкПВЯ у постгіпоксичний період також спостерігалось суттєве зменшення ІМР до вазопресину та його вмісту відносно показників гіпоксичного періоду. При цьому величина імунореактивності і вміст вазопресину залишалися в 1,8 раза вищими ( $p < 0,005$ ), ніж у контролі. Отримані дані свідчать про збереження підвищеної функціональної активності крупноклітинних вазопресинергічних нейронів злкПВЯ у віддаленому постгіпоксичному періоді.

У перікаріоні нейронів мдПВЯ в постгіпоксичному періоді відбувалося зменшення площі ІМР до рівня контролю. Внаслідок цього в нейроцитах на 40 % знижувався ( $p < 0,001$ ) вміст вазопресину порівняно з періодом ГГ, але відносно контролю цей показник залишався у 2,4 раза вищим ( $p < 0,001$ ). Характерно, що в постгіпоксичному періоді загальна площа імунореактивності в мдПВЯ, яка припадає на вазопресинергічні нейрони, скорочувалася в 17 разів і ставала в 7 разів меншою, ніж у контролі. Це вказувало на те, що в постгіпоксичний період істотно зменшувалася частка дрібноклітинних нейронів мдПВЯ, які брали участь у біосинтезі вазопресину. За рахунок цього сумарний вміст вазопресину в мдПВЯ значно скорочувався і даний показник становив лише 61 % від вмісту вазопресину у контрольних тварин. Постгіпоксичний період характеризувався скороченням площі ІМР до вазопресину в аксонах нейронів мдПВЯ, причому даний показник ставав на 28 % нижчим ( $p < 0,001$ ), ніж показники контролю, що призводило до суттєвого зменшення сумарного вмісту вазопресину в аксонах нейронів мдПВЯ, і даний показник становив лише 63 % ( $p < 0,001$ ) від показника контролю. Таким чином, отримані дані свідчать про гальмування біосинтезу вазопресину та процесів нейросекреції вазопресинергічних нейронів мдПВЯ у постгіпоксичний період.

У СОЯ постгіпоксичний період характеризувався практично повним відновленням параметрів імунореактивності до вазопресину та вмісту нейрогормона у перікаріоні нейроцитів та їх аксонів.

Проявом пластичності нервової тканини є здатність нейронів як до короткочасної, так і до довготривалої фенотипової трансформації під впливом різноманітних стимулів. В основі нейрональної пластичності лежить механізм керованої регуляції активності генів, серед яких виділяють гени негайної відповіді (*immediate-early genes*), такі як *c-fos* і *c-jun*, так і транскрипційні фактори довготривалої нейрональної пластичності, такі як CREB і CREM [Loeblich S., Nedivi E., 2009; Perez-Cadahia B., et al., 2011; Minatohara K. et al., 2016]. Доведено, що білок c-Fos є маркером функціональної активності нейронів [Bullitt E., 1990; Jaworski J. et al., 2018], а рівень його експресії в секреторних нейронах пов'язано із підвищенням секреції вазопресину, окситоцину, кортикотропін-релізінг гормону, дофаміну і ряду інших нейропептидів [Hoffman G.E. et al., 1990; Yoshimura M., Ueta Y., 2018], які визначають ефективність нейроендокринної відповіді на дію чинників навколишнього середовища.

Встановлено, що ГГ стимулювала збільшення площі ІРМ до білка cFos у злкПВЯ на 41 % ( $p < 0,01$ ) із підвищенням концентрації білка у нейронах на 31 % ( $p < 0,01$ ). Як результат, загальний вміст білка cFos у злкПВЯ внаслідок ГГ збільшувався в 1,8 раза (рис. 4). Проте у мдПВЯ гіпоксичні впливи не призводили до статистично достовірної зміни площі іРМ до білка cFos ( $p > 0,05$ ). Однак концентрація білка cFos у нейронах мдПВЯ збільшувалася на 26 % ( $p < 0,05$ ) поряд зі зростанням його вмісту у структурі на 37 % ( $p < 0,05$ ).

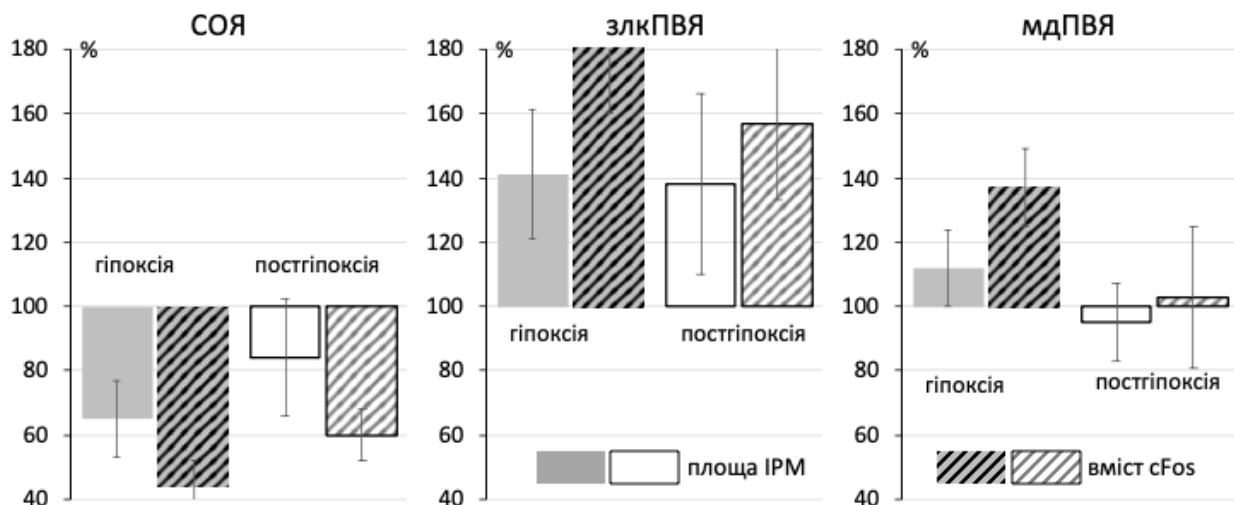


Рисунок 4 – Площа ІРМ до білка cFos та його вміст у структурах гіпоталамуса.

Зовсім іншою та протилежною була реакція нейронів СОЯ на ГГ. Внаслідок дії ГГ в СОЯ відбувалося зменшення на 35 % площі ІРМ до білка cFos, зменшення його концентрації в нейронах на 31% та зниження його загального вмісту в структурі у 2,3 раза відносно контролю. Це свідчило про істотне пригнічення синтезувальної функції вазоперсинергічних нейронів СОЯ.

Постгіпоксичний період характеризувався збереженням показника імунореактивності до білка c-Fos у злкПВЯ на високому рівні, який статистично не відрізнявся від значень на момент закінчення гіпоксичних впливів. Отже, отримані результати свідчать про те, що ГГ не тільки стимулює в нейронах злкПВЯ синтез білка c-Fos, але й сприяє підвищеному його синтезу

впродовж тривалого постгіпоксичного періоду. У той же час, у мдПВЯ постгіпоксичний період відзначався зменшенням вмісту білка c-Fos у структурі до показників контролю. У СОЯ по закінченні постгіпоксичного періоду спостерігалось практично повне відновлення показників імунореактивності до білка cFos. Разом із тим, концентрація білка cFos у нейронах цього ядра змінювалась і залишалася на 30 % нижчою, ніж у контролі, як і вміст відповідного білка, який також на 41 % залишався меншим. Отримані дані свідчать про те, що навіть через 10 днів після закінчення ГГ відновлення процесів біосинтезу в СОЯ не відбувалося повною мірою.

Аналізуючи особливості реакції вазопресинергічної системи гіпоталамуса на дію переривчастої гіпоксичної гіпоксії треба відзначити, що, порівняно з вихідним функціональним станом за умов нормоксії, найбільшу реакцію на гіпоксію демонструють пептидергічні нейрони медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ. Для цих нейронів більш характерний синтез кортикотропін-рилізінг гормону (CRH), який є високоспецифічним активатором синтезу АКТГ і, отже, кортикостероїдів. Останні є анаболічними гормонами, які забезпечують молекулярні механізми адаптації організму, підвищуючи потужність енергетичного і білкового обміну в клітинах [Nicolaidis N.C. et al., 2015; Picard M. et al., 2018]. Тому ефективність адаптації організму до дії стресових факторів однозначно пов'язують із пластичністю ГТАКС [McEwen B.S., 2007, 2012; Joles M., 2018]. Характерно, що вазопресинергічна система відповідає більш ранній реакції на стрес, ніж CRH-ергічна, а вазопресин, як нейрогормон, здатний самостійно активувати синтез АКТГ у гіпофізі і кортикостероїдів у надниркових залозах, та, відносно до CRH, чинить стимулюючий і пермісивний ефекти [Aguilera G. et al., 2000, 2014; Herman J.P., Taske J.G., 2016]. Очевидно, що підвищення функціональної активності вазопресинергічної системи мдПВЯ при адаптації до гіпоксії обумовлено важливою роллю вазопресину як ко-стимулятора синтезу і секреції CRH і ко-трансмiттера синтезу АКТГ і кортикостероїдів.

Стосовно реакції вазопресинергічних нейронів СОЯ на ГГ слід зауважити, що пригнічення їх синтезувальної та секреторної активності спостерігали й раніше в альпіністів [Ramirez G. et al., 1992; Robach P. et al., 2002; Khodae M. et al., 2016], що може бути обумовлено гальмівною дією підвищеної концентрації глюкокортикоїдів в крові в умовах багатоденних гіпоксичних впливів на глюкокортикоїдні GR-II рецептори супраопічних нейронів. У той же час, даний тип рецепторів практично відсутній на вазопресинергічних нейронах злкПВЯ, які експресують високоафінні мінералокортикоїдні GR-I рецептори. За цих обставин стає зрозумілою відсутність реакції пригнічення функціональної активності нейронів злкПВЯ на тлі гіперкортицизму, викликаного дією гіпоксії. Цілком ймовірно, що підвищення функціональної активності вазопресинергічних крупноклітинних та дрібноклітинних нейронів ПВЯ, поряд з іншими нейроендокринними системами гіпоталамуса, сприяє більш ефективній стратегії нейроендокринної адаптації організму в умовах багатоденної дії гіпоксичної гіпоксії.

## ВИСНОВКИ

Механізми нейроендокринної адаптації організму до гіпоксичної гіпоксії відіграють важливу роль у розробці способів адаптації людини до умов високогір'я і усунення патогенного впливу кисневої недостатності в клінічній практиці. У дисертації наведене теоретичне обґрунтування і експериментальне вирішення актуальної наукової задачі, яка полягає у встановленні нейроендокринної реакції різних відділів вазопресинергічної системи гіпоталамуса при переривчастій гіпоксичній гіпобаричній гіпоксії і в постгіпоксичному періоді.

1. Переривчаста гіпоксія стимулює експресію в нейронах гіпоталамуса генів сімейства *hif* і зростання концентрації мРНК до білка HIF-1 $\alpha$  в 13 разів і до HIF-3 $\alpha$  – у 8,6 раза. При цьому, у відповідь на гіпоксичні впливи відзначалося зростання концентрації білків HIF-1 $\alpha$  і HIF-3 $\alpha$  у вазопресинергічних нейронах задньолатерального крупноклітинного (в 3 рази) і медіального дрібноклітинного (у 2 рази) суб'ядер ПВЯ, і не спостерігалось у крупноклітинних нейронах СОЯ.

2. Постгіпоксичний період характеризується зниженням концентрації мРНК до білків HIF-1 $\alpha$  і HIF-3 $\alpha$  в медіобазальному гіпоталамусі до базальних показників, при збереженні підвищеної концентрації білків HIF-1 $\alpha$  і HIF-3 $\alpha$  в нейронах задньолатерального крупноклітинного і медіального дрібноклітинного суб'ядер ПВЯ.

3. Переривчаста дія гіпоксичної гіпоксії стимулює функціональну активність крупноклітинних нейронів задньолатерального суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса, що проявляється гіпертрофією нейронів з посиленням у них синтезувальної активності зі зростанням вмісту вазопресину в 2,1 раза, білків cFos – на 80 %, HIF-1 $\alpha$  – в 3,4 раза і HIF-3 $\alpha$  – в 3 рази, та стимуляцією нейросекреції з підвищенням вмісту вазопресину в аксонах нейронів у 6 разів.

4. Переривчаста гіпоксія спричиняє гіпертрофію нейронів медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ з підвищенням в них вмісту РНК на 37 %, білків HIF-1 $\alpha$  – у 2,5 раза і HIF-3 $\alpha$  – на 73 %. Під впливом переривчастої гіпоксичної гіпоксії посилюється синтезувальна активність нейронів медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ з наростанням в них вмісту білка c-Fos на 26 % і вазопресину у 6,3 раза у поєднанні з посиленням нейросекреторної активності і збільшенням в аксонах вмісту нейрогормона у 8 разів.

5. Гіпоксична гіпоксія спричиняє гальмування функціональної активності вазопресинергічної системи супраоптичного ядра зі зменшенням вмісту вазопресину в тілах нейроцитів на 26 %, депресією синтезу c-Fos у 2,3 раза, формуванням дистрофічних змін у нейроцитах зі зменшенням на 55 % вмісту РНК в цитоплазмі. При цьому в аксонах нейронів СОЯ гіпоксичні впливи гальмують нейросекрецію і спричиняють накопичення вазопресину з підвищенням його вмісту на 24 %. Нейросекреторні клітини СОЯ не реагують на гіпоксію зміною експресії білків сімейства HIF.

6. Основні показники підвищення функціональної активності крупноклітинних нейронів ПВЯ зберігаються впродовж 10 днів після закінчення дії переривчастої гіпоксії, що проявляється збереженням підвищеного синтезу білка cFos при незначному обмеженні синтезу вазопресину, білків HIF-1 $\alpha$  і HIF-3 $\alpha$ , вміст яких залишається достовірно вищим, ніж у контрольній групі. У дрібноклітинних нейронах ПВЯ постгіпоксичний період характеризується пригніченням синтезу вазопресину і його нейросекреції при збереженні підвищених показників експресії білків HIF-1 $\alpha$  і HIF-3 $\alpha$ . У крупноклітинних нейронах СОЯ в постгіпоксичному періоді спостерігається тенденція до часткового відновлення функціональної активності.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Шаменко В. А. Морфогистохимическая характеристика нейронов супраоптического ядра гипоталамуса крыс при действии прерывистой гипоксии. *Ежемес. науч. журн. науч. Фонда «Биолог»*. 2014. № 4. С. 29–32. (Дисертант виконав набір матеріалу, морфометричні, денситометричні дослідження та статистичну обробку результатів).

2. Абрамов А. В., Шаменко В. А., Колесник Ю. М. Влияние прерывистой гипоксии на функциональное состояние паравентрикулярного ядра гипоталамуса и экспрессию гена hif-1 $\alpha$  и белка HIF-1 $\alpha$  у крыс линии Вистар. *Патологія. Реабілітація. Адаптація*. 2017. № 15 (1). С. 8–14. (Дисертант виконав набір матеріалу, молекулярно-генетичні дослідження та аналіз літературного матеріалу).

3. Абрамов А. В., Шаменко В. А. Особенности экспрессии HIF-1 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$  в гипоталамусе у крыс линии Вистар под влиянием прерывистой гипобарической гипоксии. *Патологія*. 2017. Т. 14, № 2 (40). С. 156–162. DOI : 10.14739/2310–1237.2017.2.109291. (Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістохімічні, імунофлюоресцентні, денситометричні, молекулярно-генетичні дослідження та статистичну обробку результатів).

4. Абрамов А. В., Шаменко В. А., Колесник Ю. М. Экспрессия белка c-Fos в гипоталамусе крыс при многодневном действии прерывистой гипоксической гипоксии. *Вісник Укр. мед. стомат. академії = Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2017. Т. 17, вип. 4 (60), ч. 2. С. 5–8. (Дисертант виконав набір матеріалу, імунофлюоресцентні, денситометричні дослідження та статистичну обробку результатів).

5. Абрамов А. В., Колесник Ю. М., Шаменко В. О. Функціональний стан вазопресинергічної системи гіпоталамуса при багатоденній дії переривчастої гіпоксичної гіпоксії. *Клінічна та експерим. патологія*. 2018. Т. 17, № 3 (65), ч. 2. С. 9–16. DOI : 10.24061/1727-4338.XVII.3.65.2018.150. (Дисертант виконав набір матеріалу, імунофлюоресцентні, денситометричні дослідження та статистичну обробку результатів).

6. Абрамов А. В., Шаменко В. А., Колесник Ю. М. Сравнительная характеристика реакции вазопресинергических нейронов супраоптического и паравентрикулярного ядер гипоталамуса при прерывистом действии



гипоксической гипоксии. *Патологія*. 2018. Т. 15, № 3 (44). С. 360–366. DOI : 10.14739/2310-1237.2018.3.151862. (Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістохімічні, імунофлюоресцентні, денситометричні дослідження та статистичну обробку результатів).

7. Shamenko V. O., Kadzharian I. V., Abramov A. V. Intermittent hypobaric hypoxia and neuroendocrine reaction of the parvocellular neurons of the paraventricular hypothalamic nucleus. *Патологія*. 2019. Т. 16, № 3 (44). С. 334–338. DOI : 10.14739/2310-1237.2019.3.188834. (Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістохімічні, імунофлюоресцентні, денситометричні дослідження та статистичну обробку результатів).

8. Абрамов А. В., Шаменко В. А. Сравнительная характеристика нейроэндокринного ответа крупноклеточных и мелкоклеточных вазопрессинергических нейронов паравентрикулярного ядра гипоталамуса на прерывистое действие гипоксической гипоксии. *Клінічна та експерим. патологія*. 2019. Т. 18, № 4 (70). С. 3–9. DOI : 10.24061/1727-4338XVIII.4.70.2019.283. (Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістохімічні, імунофлюоресцентні, денситометричні дослідження та статистичну обробку результатів).

9. Шаменко В. А., Абрамов А. В. Морфофункциональные изменения нейронов супраоптического ядра гипоталамуса крыс после прерывистого действия гипобарической гипоксии. *Актуальні питання експериментальної та клінічної патофізіології* : матеріали VI Пленуму наук. т-ва патофізіологів України (м. Вінниця, 23-25 вер. 2014 р.). Вінниця, 2014. С. 116–117. (Дисертант виконав набір матеріалу, імунофлюоресцентні, денситометричні дослідження та статистичну обробку результатів).

10. Шаменко В. А., Василенко Г. В., Абрамов А. В. Физиологические характеристики крупноклеточных вазопрессинергических нейронов гипоталамуса при адаптации к гипоксической гипоксии. *Патологія*. 2015. Т. 1 (додаток) : матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 50-річчю кафедри патологічної анатомії та кафедри патофізіології ЗДМУ «Актуальні проблеми сучасної патоморфології та патофізіології» (м. Запоріжжя, 28-29 трав. 2015 р.). С. 77. (Дисертант виконав набір матеріалу, імунофлюоресцентні, дослідження та статистичну обробку результатів).

11. Шаменко В. О. Вплив переривчастої гіпоксії на функціональний стан крупноклітинних суб'ядер паравентрикулярного ядра гіпоталамусу. *Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм* : матеріали VIII наук.-практ. конф. (м. Тернопіль, 1-2 жовт. 2015 р.). Тернопіль, 2015. С. 83. (Дисертант виконав набір матеріалу, імунофлюоресцентні, денситометричні дослідження та статистичну обробку результатів).

12. Шаменко В. А., Василенко Г. В., Абрамов А. В. Морфогистохимическая характеристика крупноклеточных вазопрессинергических нейронов гипоталамуса крыс при действии гипоксической гипоксии. *Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології (14-ті Данилевські читання)* : наук.-практ. конф. з міжнар. участю (м. Харків,

2-3 бер. 2015 р.). Харків, 2015. С. 180–181. (*Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістохімічні, денситометричні дослідження та статистичну обробку результатів*).

13. Абрамов А. В., Шаменко В. А., Василенко Г. В. Экспресси ямРНК к белку HIF-1 alpha в медиобазальном гипоталамусе и коре головного мозга крыс при прерывистой гипоксической гипоксии. *Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції* : матеріали VII Нац. з'їзду патофізіологів України (м. Харків, 5-7 жовт. 2016 р.). Харків, 2016. С. 27. (*Дисертант виконав набір матеріалу, імунофлюоресцентні, денситометричні дослідження та статистичну обробку результатів*).

14. Молекулярні маркери ранньої реакції нейронів гіпоталамусу при адаптації до гіпоксичної гіпоксії / А. В. Абрамов, В. О. Шаменко, Ю. М. Колесник, В. О. Жулінський. *Фізіологія і патологія нейроімуноендокринної регуляції* : матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнародною участю, присвяченої 105-річчю від дня народж. проф. Я.Д. Кіршенבלата (м. Чернівці 5-6 жовт. 2017 р.). Чернівці, 2017. С. 9. (*Дисертант виконав набір матеріалу, імунофлюоресцентні дослідження та статистичну обробку результатів*).

15. Функціональний стан нейросекреторних нейронів паравентрікулярного ядра гіпоталамуса щурів при адаптації до гіпоксичної гіпоксії / А. В. Абрамов, Ю. М. Колесник, В. О. Шаменко, Є. В. Каджарян, Г. В. Василенко, В. О. Жулінський, М. М. Ковальов. *Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики* : матеріали VII Пленуму Укр. наук. т-ва патофізіологів та наук.-практ. конф., присвяч. 110-річчю з дня народж. чл.-кор. АМН СРСР, проф. М.Н. Зайка (м. Полтава, 11-12 жовт. 2018 р.). Полтава, 2018. С. 3–4. (*Дисертант виконав набір матеріалу, імунофлюоресцентні дослідження та статистичну обробку результатів*).

16. Особливості реакції крупно клітинних вазопресинергічних нейронів супраоптичного та паравентрікулярного ядер гіпоталамусу при переривчастої дії гіпоксичної гіпоксії / А. В. Абрамов, В. О. Шаменко, Ю. М. Колесник, Г. В. Василенко, М. М. Ковальов. *Фізіол. журн.* 2019. Т. 65, № 3 (додаток) : матеріали XX-го з'їзду Укр. фізіологіч. т-ва ім. П.Г. Костюка з міжнар. участю, присвяч. 95-річчю від дня народж. акад. П.Г. Костюка (м. Київ, 28-30 трав. 2019 р.). С. 123–124. (*Дисертант виконав набір матеріалу, імунофлюоресцентні, денситометричні дослідження та статистичну обробку результатів*).

17. Шаменко В. О., Каджарян Є. В., Абрамов А. В. Особливості нейроендокринної відповіді нейронів паравентрикулярного ядра гіпоталамусу за умов переривчастої дії гіпоксичної гіпоксії. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція* : матеріали II наук.-практ. internet-конф. з міжнар. участю (м. Харків, 21 листоп. 2019 р.). Харків : НФУ, 2019. С. 375–376. (*Дисертант виконав набір матеріалу, імунофлюоресцентні, денситометричні дослідження та статистичну обробку результатів*).

## АНОТАЦІЯ

**Шаменко В.О. Функціональний стан вазопресинергічної системи гіпоталамуса внаслідок дії переривчастої гіпоксичної гіпоксії. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія. – Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2020.

У дисертації наведено теоретичне обґрунтування і експериментальне вирішення актуальної наукової задачі, яка полягає у встановленні механізмів участі вазопресинергічної системи гіпоталамуса в нейроендокринній відповіді мозку на багатоденну переривчасту дію гіпобаричної гіпоксичної гіпоксії (ГГ) та особливостей відновлення морфофункціонального стану вазопресинергічних нейронів у постгіпоксичний період.

На підставі кількісного імунофлуоресцентного дослідження серійних зрізів гіпоталамуса було показано, що ГГ призводила до гіпертрофії нейронів задньолатерального крупноклітинного суб'ядра ПВЯ (злкПВЯ), накопичення у цитоплазмі РНК, підвищення концентрації вазопресину у тілах нейронів та їх аксонах. ГГ підвищувала імунореактивність до білків cFos, HIF-1 $\alpha$  і HIF-3 $\alpha$  в злкПВЯ. У постгіпоксичний період у нейронах злкПВЯ зберігались основні показники вазопресин-синтезувальної і нейросекреторної активності. Встановлено високу реактивність медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ (мдПВЯ) на ГГ у вигляді гіпертрофії нейронів, зростання концентрації РНК, збільшення імунореактивності до вазопресину зі зростанням і його сумарного вмісту у тілах та аксонах нейронів. Внаслідок ГГ в мдПВЯ зростала імунореактивність до білків cFos, HIF-1 $\alpha$  і HIF-3 $\alpha$  зі зростанням їх вмісту в структурі. Проте у постгіпоксичний період у мдПВЯ зменшувались імунореактивність до вазопресину і його вміст. У СОЯ ГГ викликали розвиток дистрофічних змін у нейроцитах і органелах зі зниженням концентрації РНК у нейронах, зменшенням імунореактивності до білків HIF-1 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ , cFos і до вазопресину, з частковим відновлюванням функції у постгіпоксичний період

**Ключові слова:** переривчаста гіпоксична гіпоксія; вазопресин; білок cFos; фактори HIF-1 $\alpha$  та HIF-3 $\alpha$ , індуковані гіпоксією; паравентрикулярне ядро гіпоталамуса; супраоптичне ядро гіпоталамуса.

## АННОТАЦИЯ

**Шаменко В.А. Функциональное состояние вазопрессинергической системы гипоталамуса при действии прерывистой гипоксической гипоксии. - На правах рукописи.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.04 – патологическая физиология. – Запорожский государственный медицинский университет МЗ Украины, Запорожье, 2020.

В диссертации приведено теоретическое обоснование и

экспериментальное решение актуальной научной задачи, которая заключается в установлении механизмов участия вазопрессинергической системы гипоталамуса в нейроэндокринном ответе мозга на многодневное действие прерывистой гипобарической гипоксической гипоксии (ГГ) и особенностей восстановления морфофункционального состояния вазопрессинергических нейронов в постгипоксический период.

На основании количественного иммунофлюоресцентного анализа серийных срезов гипоталамуса было показано, что ГГ приводила к гипертрофии нейронов заднелатерального крупноклеточного субъядра ПВЯ (злкПВЯ), накоплению в цитоплазме РНК, повышению концентрации вазопрессина в телах нейронов и аксонах, росту суммарного содержания вазопрессина в ПВЯ. В злкПВЯ ГГ повышала иммунореактивность к белкам cFos, HIF-1 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$ . В постгипоксический период в нейронах злкПВЯ сохранялись основные показатели вазопрессин-синтезирующей и нейросекреторной активности. Установлена высокая реактивность медиального мелкоклеточного субъядра ПВЯ (мкПВЯ) на ГГ в виде гипертрофии нейронов, роста концентрации РНК, увеличения иммунореактивности к вазопрессину с повышением его концентрации. ГГ приводили к повышению иммунореактивности к белкам cFos, HIF-1 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$  в ммПВЯ. В постгипоксический период в ммПВЯ происходило уменьшение иммунореактивности к вазопрессину и снижение его содержания. Реакция СОЯ на ГГ характеризовалась развитием дистрофических изменений в нейронах и органеллах, сопровождалась снижением концентрации РНК в нейронах, уменьшением иммунореактивности к белкам HIF-1 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ , cFos и к вазопрессину. В течение постгипоксического периода отмечалось частичное восстановление морфофункционального состояния нейронов СОЯ.

**Ключевые слова:** прерывистая гипоксическая гипоксия; вазопрессин; белок cFos; факторы HIF-1 $\alpha$  и HIF-3 $\alpha$ , индуцибельные гипоксией; паравентрикулярное ядро гипоталамуса; супраоптическое ядро гипоталамуса.

## ABSTRACT

**Shamenko V.O. The Functional State of the Vasopressinergic System of the Hypothalamus After Intermittent Hypoxic Hypoxia Influence. – Qualification scientific work as the manuscript.**

Thesis for a Candidate of Medical degree by specialty 14.03.04 “Pathological physiology”. – Zaporizhzhia State Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Zaporizhzhia, 2020.

The dissertation presents a theoretical justification and an experimental solution to an urgent scientific problem, which is to establish the mechanisms of the vasopressinergic system of the hypothalamus participation in the neuroendocrine response of the brain to the long term intermittent hypobaric hypoxic hypoxia and to study the features of the morphofunctional state of vasopressinergic neurons in the posthypoxic period.

Based on quantitative immunohistochemical and immunofluorescence studies of serial sections of the hypothalamus, it was shown that the long term intermittent hypoxic hypoxia led to hypertrophy of the neurons of the lateral subdivision of the posterior magnocellular subnucleus of the paraventricular hypothalamic nucleus (PVNpml) with an increase in the area of the cytoplasm and nucleoli, as well as accumulation of cytoplasmic RNA. The increase of vasopressin concentration was noted in the magnocellular neurons and their axons, which led to a significant increase in the vasopressin total content in the PVNpml. Hypoxia resulted in an increase in immunoreactivity to cFos, HIF-1 $\alpha$ , and HIF-3 $\alpha$  proteins in the PVNpml in combination with an increase of these proteins' concentration in neurocytes and an increase in the total content of these proteins within the subnuclei. An increase in the functional activity of neurons of the PVNpml with an increase of vasopressin synthesis and secretion in response to hypoxic stimulation was combined with an increase in the concentration of mRNA for the HIF-1 $\alpha$  and HIF-3 $\alpha$  proteins in the mediobasal hypothalamus.

It is noteworthy that 10 days after the end of hypoxic conditions, signs of neurons hypertrophy were present in the PVNpml while RNA concentration increased in the nucleoli of neurocytes, and the main parameters of the neurosecretory activity of magnocellular neurons remained higher compared with the control parameters that indicated the prolongation of high functional activity of magnocellular vasopressinergic neurons in the posthypoxic period. Thus, the nature of PVNpml neurons functional activity alteration in response to hypoxia and in the posthypoxic period indicates the involvement of magnocellular vasopressinergic neurons in the processes of neuroendocrine adaptation to hypoxia.

The study of the morphofunctional state of the medial parvocellular subnuclei of the paraventricular hypothalamic nucleus (PVNmp) demonstrated a high reactivity of neurosecretory cells to the 15 day hypoxic stimulation. Morphometric analysis showed that hypoxic influence result in the hypertrophy of neurons and an increase in the area of the cytoplasm with the increase in RNA concentration. The area of vasopressin immunoreactivity in the cytoplasm of neurons its concentration and total content in the subnuclei increased, that testified an increase in the synthesis of neuropeptide under the influence of hypoxia. A similar increase in immunoreactivity and vasopressin content was observed in neuronal axons in the region of the PVNmp, which indicated that intermittent hypoxic hypoxia stimulated neurosecretion processes. The immunoreactivity to cFos, HIF-1 $\alpha$  and HIF-3 $\alpha$  proteins increased under the influence of hypoxia in the PVNmp, that was accompanied with an increase in their content in the structure and an increase in their concentration in the mediobasal hypothalamus.

It is characteristic that in the posthypoxic period, signs of neurons' hypertrophy in the PVNmp not only remained, but continued to increase. At the same time, a decrease in the immunoreactivity to vasopressin and its content both in the neurons and in the axons was observed in the structure, which indicated a decrease in the synthesis and neurosecretion processes in the vasopressinergic neurons of the PVNmp in the posthypoxic period. At the same time, the cFos protein

content in the structure decreased to the control level while HIF family proteins content in neurocytes maintained increased.

Therefore, the peculiarities of PVN neurons reaction to the long term intermittent hypoxic hypoxia, apparently, evidence the involvement of the vasopressinergic system in the mechanisms of the integral neurosecretory response to hypoxia with the formation of a systemic structural trace of adaptation.

A different reaction to the long term intermittent hypoxic hypoxia was demonstrated by magnocellular neurons of the supraoptic nucleus of the hypothalamus (SON), in which dystrophic changes were observed in neurocytes and their organelles in combination with a decrease in RNA concentration. The magnocellular supraoptic neurons reacted to hypoxia by a decrease in immunoreactivity in the HIF-1 $\alpha$  and HIF-3 $\alpha$  marker proteins; no significant change in the content of these proteins in neurocytes was observed. At the same time, the immunoreactivity to the cFos protein of the early neurosecretory response significantly decreased in the SON, the concentration of protein in neurons and its total content in the SON decreased. The neurosecretory response of magnocellular supraoptic neurons to hypoxia was characterized by a limitation of vasopressin immunoreactivity in neurons, a decrease in the hormone concentration in neurocytes and its total content in the SON, which indicated a reduction of vasopressin biosynthesis in magnocellular supraoptic neurons. At the same time, in the axons of neurons in the supraoptic region, hypoxia increased the immunoreactivity and the total vasopressin content, which indicated an acceleration of neurohormone's neurosecretion processes.

At the end of the 10-day posthypoxic period, a partial reduction of dystrophic changes in the neurons of the SON was observed while decreased level of RNA in the neurocytes remained. The parameters of vasopressin immunoreactivity and the neurohormone content were almost completely restored in neurocytes and in the axons of the SON neurons, expression of the cFos protein and immunoreactivity to HIF-1 $\alpha$  and HIF-3 $\alpha$  proteins were partially restored.

Thus, the long term intermittent hypoxic hypoxia exposure caused the inhibition of vasopressin synthesis in neurons of the SON with a moderate acceleration of neurosecretion processes. At the same time, during the posthypoxic period, there is a steady tendency to restore the morphologic and histochemical characteristics and neurosecretory function of supraoptic neurons, however, the 10-day posthypoxic period is insufficient to restore the functional activity of the SON completely.

**Key words:** intermittent hypoxic hypoxia; arginine vasopressin; cFos protein; hypoxia inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-3 $\alpha$ ; paraventricular nucleus of the hypothalamus; supraoptic nucleus of the hypothalamus.

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

|        |  |
|--------|--|
| АКТГ   | – адренокортикотропний гормон  |
| ГГ     | - переривчаста гіпоксична гіпоксія   |
| ГТАКС  | - гіпоталамо-гіпофізарно-адренокортикальна система                                 |
| злкПВЯ | - задньолатеральне крупноклітинне суб'ядро ПВЯ                                     |
| ІРМ    | - імунореактивний матеріал   |
| мдПВЯ  | - медіальне дрібноклітинне суб'ядро ПВЯ  |
| ПВЯ    | - паравентрикулярне ядро гіпоталамуса  |
| ПЛР    | - полімеразна ланцюгова реакція  |
| РНК    | - рибонуклеїнова кислота   |
| СОЯ    | - супраоптичне ядро гіпоталамуса   |
| cFos   | - білок-маркер негайної нейросекреторної відповіді                                 |
| CRH    | - кортикотропін-релізінг гормон  |
| HIF    | - hypoxia-inducible factor: сімейство білків, синтез яких індуковано дією гіпоксії |

Підписано до друку 14.07.2020. Гарнітура Times New Roman  
Папір друкарський. Формат 60 90 1/16. Умовн. друк. арк. 0,8  
Наклад – 100 прим. Замовлення №. 8890.  
Надруковано з оригінал-макету в типографії  
Запорізького державного медичного університету  
69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26.