

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ШАМЕНКО ВАДИМ ОЛЕКСАНДРОВИЧ

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

ДИСЕРТАЦІЯ

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

14.03.04 – патологічна фізіологія

22 Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук.
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ В.О. Шаменко

Науковий керівник – **Абрамов Андрій Володимирович**, професор кафедри
патологічної фізіології ЗДМУ, доктор медичних наук, професор

Запоріжжя – 2020

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» (222 Медицина). – Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2020.

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 та особливості відновлення морфофункціонального стану вазопресинергічних нейронів у постгіпоксичний період.

На підставі кількісного імуногістохімічного та імунофлюоресцентного дослідження серійних зрізів гіпоталамуса було показано, що гіпоксичний вплив призводив до гіпертрофії нейронів задньолатерального крупноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса (ПВЯ) зі збільшенням площі цитоплазми і ядерець нейронів, а також накопиченням у цитоплазмі РНК. У крупноклітинних нейронах відзначалося підвищення концентрації вазопресину в тілах нейронів та їх аксонах, що призводило до істотного зростання сумарного вмісту вазопресину в задньолатеральному крупноклітинному суб'ядрі ПВЯ. Гіпоксичний вплив спричиняв підвищення імунореактивності до білків cFos, HIF-1 α і HIF-3 α в ділянці задньолатерального крупноклітинного суб'ядра ПВЯ у поєднанні з підвищенням концентрації цих білків у нейроцитах та зростанням сумарного вмісту цих білків у суб'ядрі. Підвищення функціональної активності нейронів задньолатерального крупноклітинного суб'ядра ПВЯ зі збільшенням синтезу і

секреції вазопресину у відповідь на гіпоксичну стимуляцію поєднувалося з підвищенням концентрації мРНК до білків HIF-1 α і HIF-3 α у медіобазальному гіпоталамусі.

Показовим є те, що через 10 днів після закінчення гіпоксичних впливів у нейронах задньолатерального крупноклітинного суб'ядра ПВЯ зберігались ознаки гіпертрофії і додатково зростала концентрація РНК в ядерцях нейроцитів, а основні показники нейросекреторної активності крупноклітинних нейронів залишались підвищеними порівняно з контрольними показниками, що свідчило про збереження високої функціональної активності крупноклітинних вазопресинергічних нейронів у постгіпоксичний період. Таким чином, характер змін функціональної активності нейронів задньолатерального крупноклітинного суб'ядра ПВЯ у відповідь на гіпоксичні впливи та у постгіпоксичний період свідчить про залучення крупноклітинних вазопресинергічних нейронів до процесу нейроендокринної адаптації до гіпоксії.

Вивчення морфофункціонального стану медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ показало високу реактивність нейросекреторних клітин на багатоденну гіпоксичну стимуляцію. Проведений морфометричний аналіз довів, що гіпоксичний вплив призводить до гіпертрофії нейронів, збільшення в них площі цитоплазми і зростання в ній концентрації РНК. У цитоплазмі нейронів збільшувалася площа імунореактивності до вазопресину, підвищувалася його концентрація і сумарний вміст у структурі, що свідчило про посилення процесів синтезу нейропептиду внаслідок гіпоксичної стимуляції. Аналогічне підвищення імунореактивності та вмісту вазопресину відзначалось в аксонах нейронів у ділянці медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ, що свідчило про стимуляцію процесів нейросекреції за умов переривчастої гіпоксичної гіпоксії. Внаслідок дії переривчастої гіпоксичної гіпоксії в медіальному дрібноклітинному суб'ядрі ПВЯ зростала імунореактивність до білків cFos, HIF-1 α і HIF-3 α , що призводило до

зростання їх вмісту в структурі і підвищення концентрації в медіобазальному гіпоталамусі.

Характерно, що у постгіпоксичний період ознаки гіпертрофії нейронів медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ не тільки зберігалися, але і продовжували зростати. Разом із тим, у структурі спостерігалось зменшення імунореактивності до вазопресину і його вмісту як у тілах нейронів, так і в аксонах, що свідчило про зниження інтенсивності синтезу і уповільнення нейросекреції в вазопресинергічних нейронах медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ у постгіпоксичний період. На тлі цього в структурі знижувався вміст білка cFos до рівня контролю при збереженні підвищеного вмісту білків сімейства HIF у нейроцитах.

Таким чином, особливість реакції нейронів ПВЯ на багатоденну переривчасту дію гіпоксичної гіпоксії, ймовірно, свідчить про залучення вазопресинергічної системи гіпоталамуса до інтегральної нейросекреторної відповіді на гіпоксію з формуванням системного структурного сліду адаптації.

Іншу реакцію на переривчасту дію гіпоксичної гіпоксії демонстрували крупноклітинні нейрони супраоптичного ядра гіпоталамуса (СОЯ), в яких розвиток дистрофічних змін у нейроцитах і органелах супроводжувалися зниженням концентрації РНК у нейронах. Нейрони СОЯ реагували на гіпоксію зменшенням імунореактивності до маркерних білків до гіпоксії - HIF-1 α і HIF-3 α , але достовірної зміни вмісту цих білків у нейроцитах не відзначалося. У той же час, в СОЯ істотно зменшувалась імунореактивність до білка ранньої нейросекреторної відповіді cFos у поєднанні зі зниженням його концентрації в нейронах та зменшенням його сумарного вмісту в СОЯ. Нейросекреторна відповідь нейронів СОЯ на гіпоксію характеризувалася зменшенням імунореактивності до вазопресину в нейронах і концентрації нейрогормону в нейроцитах та його сумарного вмісту в СОЯ. Це свідчило про обмеження процесів біосинтезу вазопресину в крупноклітинних нейронах СОЯ. Разом із тим, в аксонах нейронів в ділянці СОЯ збільшувалась імунореактивність до

вазопресину і його сумарний вміст, що свідчило про прискорення процесів нейросекреції нейрогормону у відповідь на гіпоксичну стимуляцію.

По закінченні 10-денного постгіпоксичного періоду відзначалася часткова редукція дистрофічних змін в нейронах СОЯ при збереженні зниженого рівня РНК в нейроцитах. У тілах нейроцитів СОЯ і в їх аксонах практично повністю відновлювалися параметри імунореактивності до вазопресину і вміст нейрогормону, а також частково відновлювалася експресія білка cFos і імунореактивність до білків HIF-1 α і HIF-3 α .

Таким чином, багатоденний режим дії переривчастої гіпоксичної гіпоксії призводив до пригнічення в нейронах СОЯ синтезу вазопресину на тлі повільного прискорення процесів нейросекреції. Хоча у постгіпоксичний період спостерігалася стійка тенденція до відновлення морфогістохімічних характеристик і нейросекреторної функції супраоптичних нейронів, проте 10-денний постгіпоксичний період був недостатнім для повного відновлення функціональної активності СОЯ.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше, на підставі комплексного імуногістохімічного та імунофлюоресцентного 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 α і HIF-3 α .

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 і секрецією нейрогормона, білків HIF-1 α , HIF-3 α і cFos у нейроцитах.

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 α 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 α і HIF-3 α , 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 α і HIF-3 α 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, результати якого розширюють наукові уявлення про патогенетичні особливості участі вазопресинергічної системи гіпоталамуса в механізмах нейроендокринної адаптації до багатоденної дії гіпоксичної гіпоксії. Методичні підходи до моделювання гіпоксичного навантаження та кількісні методи аналізу нейроендокринної реакції нейронів на гіпоксичний стимул розширюють практичні можливості для дослідження і оцінки реакції нейроендокриноцитів мозку при фізіологічних навантаженнях,

дії інших чинників навколишнього середовища та моделювання патологічних станів.

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

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

ANNOTATION

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.

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 α , and HIF-3 α 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 α and HIF-3 α 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 α and HIF-3 α 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 α and HIF-3 α marker proteins; no significant change in the content of these proteins in neurocytes was observed. At the same time, the immunoreactivity to the cFos the 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 cFos protein and immunoreactivity to HIF-1 α and HIF-3 α 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.

Scientific novelty. For the first time on the basis of a comprehensive immunohistochemical and immunofluorescence analysis of serial sections of the hypothalamus, qualitative and quantitative criteria for the functional activity of the vasopressinergic system of the hypothalamus during the long term intermittent hypoxic hypoxia and in the posthypoxic period were established.

For the first time, it was found that the intermittent hypoxic hypoxia for 15 days stimulates the functional activity of the magnocellular neurons of the lateral subdivision of the posterior magnocellular subnucleus of the paraventricular hypothalamic nucleus (PVNpml) and parvocellular neurons of the medial subnucleus of the paraventricular nucleus (PVNmp); stimulates the synthesis and

secretion of vasopressin in them in combination with increased synthesis of hypoxic stimulation specific markers such as HIF-1 α and HIF-3 α proteins. Moreover, signs of an increase in the functional activity of the vasopressinergic neurons of the PVN were confirmed by a powerful increase in the concentration of mRNA for the HIF-1 α and HIF-3 α proteins in the mediobasal hypothalamus after the long term intermittent hypoxic hypoxia.

For the first time, it was proved that after 10 days of the posthypoxic period, the functional activity of the vasopressinergic neurons of the PVNpml remains at the high level and is combined with increased synthesis and secretion of the neurohormone, HIF-1 α , HIF-3 α and cFos proteins in neurocytes. At the same time, a high concentration of mRNA to the HIF-1 α and HIF-3 α proteins remained in the mediobasal hypothalamus.

For the first time, it was found that after 10 days of the posthypoxic period, the functional activity of the vasopressinergic neurons of the PVNmp decreases with the reduction of vasopressin and cFos protein synthesis and secretion while high level of HIF-1 α protein synthesis in neurocytes continued. At the same time, an increased concentration of mRNA to the HIF-1 α protein remained in the mediobasal hypothalamus.

Scientific insights into the features of the functional response of vasopressinergic neurons of the supraoptic nucleus to the long term intermittent hypoxic hypoxia were supplemented. These features are manifested in the absence of a specific reaction to the hypoxia in the form of HIF-1 α , HIF-3 α protein synthesis, inhibition of cFos protein and vasopressin synthesis, as well as the formation of degenerative morphological and histological changes in neurons. It was shown that a 10-day posthypoxic period is insufficient for the full restoration of the functional activity of supraoptic neurons.

Scientific ideas about the features of *hif* family genes expression during the long term intermittent hypoxic hypoxia, which leads to an increase in the mRNA concentration to the HIF-1 α and HIF-3 α proteins in the mediobasal hypothalamus

with maintaining high levels of *hif* family genes' expression during a 10-day posthypoxic period, were supplemented too.

Practical meaning. The work is a fundamental study, the results of which expand the scientific understanding of the pathogenetic features of the hypothalamic vasopressinergic system's participation in the mechanisms of neuroendocrine adaptation to the long term intermittent hypoxic hypoxia. Methodological approaches to modeling and quantitative methods for analyzing the neuroendocrine response of neurons to a hypoxia expand practical possibilities for pathological conditions modeling, as well as for studying and evaluating the response of brain cells under physiological stresses, actions of environmental factors.

New theoretical positions of the thesis are used in the educational process at Department of Pathophysiology of the Bukovinskiy State Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Department of General and Clinical Pathophysiology named after V.V. Podvysotsky Odesa National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Department of Pathological Physiology of the Zaporizhzhya State Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, the Department of Pathophysiology of the Bogomoletz' National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine.

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

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ 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-1α* и белка HIF-1α 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-1α и HIF-3α 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 багатоденної 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 вазопрессинергических 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, денситометричні дослідження та статистичну обробку результатів)*.

15. Функціональний стан нейросекреторних нейронів паравентрікулярного ядра гіпоталамусу 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 паравентрікулярного 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).

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів	21
Вступ.....	22
Розділ 1. Сучасні уявлення про функціональний стан	
вазопресинергічної системи гіпоталамуса у нормі та при патології (огляд літератури)	30
1.1. Фізіологічні ефекти вазопресину	30
1.2. Гіпоталамо-нейрогіпофізарна крупноклітинна вазопресин-синтезуюча система як регулятор гіпофізарних функцій	32
1.3. Гіпоталамо-гіпофізарно-адренокортикальна система і її взаємодія з гіпоталамо-нейрогіпофізарною системою	34
1.4. Реакція гіпоталамо-гіпофізарно-адненокортикальної системи на хронічний стрес	36
1.5. Реакції гіпоталамо-нейрогіпофізарної системи у відповідь на хронічний стрес	38
1.6. Вплив вазопресину на нейроімунні реакції	39
1.7. Молекулярні механізми чутливості до кисню та його нестачі	41
1.8. Фізіологічні і патофізіологічні механізми дії переривчастої гіпоксичної гіпоксії	45
Розділ 2. Матеріал та методи дослідження	52
2.1. Експериментальні тварини та експериментальні групи	52
2.2. Методика моделювання переривчастої гіпоксичної гіпоксії	53
2.3. Методика гістологічної підготовки матеріалу для дослідження гіпоталамуса	53
2.4. Методика фарбування на РНК та морфометричного і денситометричного аналізу гістологічного матеріалу	54
2.5. Методика імунофлюоресцентного забарвлення та кількісний аналіз імунофлюоресцентної реакції	59

2.6. Методика полімеразної ланцюгової реакції та її кількісний аналіз	63
2.7. Методи статистичного аналізу експериментальних даних	66
Розділ 3. Вплив переривчастої гіпоксії на стан вазопресинергічних нейронів супраоптичного ядра гіпоталамуса	68
3.1. Морфологічні та денситометричні характеристики нейронів супраоптичного ядра гіпоталамуса	68
3.2. Вазопресинергічна система супраоптичного ядра гіпоталамуса	74
3.3. Експресія білка cFos в нейронах супраоптичного ядра гіпоталамуса	78
3.4. Експресія білків HIF-1 α і HIF-3 α в нейронах супраоптичного ядра гіпоталамуса	81
Розділ 4. Вплив переривчастої гіпоксії на стан вазопресинергічних нейронів задньолатерального крупноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса	86
4.1. Морфологічні та денситометричні характеристики нейронів задньолатерального крупноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса	86
4.2. Вазопресинергічна система задньолатерального крупноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса	92
4.3. Експресія білка cFos в нейронах задньолатерального крупноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса	96
4.4. Експресія білків HIF-1 α і HIF-3 α в нейронах задньолатерального крупноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса	98

Розділ 5. Вплив переривчастої гіпоксії на стан вазопресинергічних нейронів медіального дрібноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса	103
5.1. Морфологічні та денситометричні дослідження нейронів медіального дрібноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса	103
5.2. Вазопресинергічна система медіального дрібноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса	109
5.3. Експресія білку cFos в нейронах медіального дрібноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса	113
5.4. Експресія білків HIF-1 α і HIF-3 α в нейронах медіального дрібноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса	116
Ціл 6. Вплив переривчастої гіпоксії на експресію мРНК до білка HIF-1 α і HIF-3 α в медіобазальному гіпоталамусі	120
Розділ 7. Аналіз та узагальнення результатів дослідження	124
Висновки	138
Список використаних джерел	140
Додатки	176
Додаток А Акти впровадження	176
Додаток Б Наукові праці, опубліковані за темою дисертації	180
Додаток В Відомості про апробацію результатів дисертації	185

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ,
СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

АКТГ	– адренокортикотропний гормон
ВООЗ	– всесвітня організація охорони здоров'я
ГАМК	- гама-аміномасляна кислота
ГТАКС	- гіпоталамо-гіпофізарно-адренокортикальна система
ГНГС	- гіпоталамо-нейрогіпофізарна система
ДНК	- дезоксирибонуклеїнова кислота
злкПВЯ	- задньолатеральне крупноклітинне суб'ядро ПВЯ
ІХС	- ішемічна хвороба серця
мдПВЯ	- медіальне дрібноклітинне суб'ядро ПВЯ
МОЗ	- міністерство охорони здоров'я
ПВЯ	- паравентрикулярне ядро гіпоталамуса
ПЛР	- полімеразна ланцюгова реакція
РНК	- рибонуклеїнова кислота
СОЯ	- супраоптичне ядро гіпоталамуса
ЦНС	- центральна нервова система
cFos	- білок негайної відповіді на
CRH	- кортикотропін-релізінг гормон
HIF	- сімейство білків (факторів), індукованих дією гіпоксії (hypoxia-inducible factor)
V1a	- рецептор до вазопресину 1a типу
V1b	- рецептор до вазопресину 1b типу
V2	- рецептор до вазопресину 2 типу

ВСТУП

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 [1-10]. 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 [11-13].

Вазопресинергічна система мозку анатомічно й функціонально відокремлена існуванням гіпоталамічної нейросекреторної системи, яка за більшістю ефектів спрямована на реалізацію вегетативних ефектів вазопресину на нирки і серцево-судинну систему, а також має екстрагіпоталамічну еферентну спрямованість з реалізацією ефектів нейропептиду на ЦНС, в тому числі на пам'ять і поведінку [5, 6, 11, 14-17]. Експресія вазопресину в гіпоталамічних ядрах відбувається у крупноклітинних нейронах паравентрикулярних (ПВЯ) і супраоптичних (СОЯ) ядер, а також в дрібноклітинних суб'ядрах паравентрикулярних і супрахіазмальних ядер [14, 18-21].

Беззаперечно, що еволюційний успіх будь якого організму залежить від його здатності адаптуватися до мінливих обставин. Нейроендокринні реакції 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 [9, 10, 22]. На рівні гіпоталамуса основними стрес-реалізуючими компонентами є кортикотропін-релізінг-гормон-синтезуючі нейрони і вазопресин-синтезуючі нейрони, які на гострий стрес здатні швидко реагувати збільшенням секреції гормонів, але внаслідок хронічного стресу, можуть демонструвати нейроендокринну

відповідь деяким уповільненням секреції кортиколіберину, але значним збільшенням секреції вазопресину [23-27].

Відомо, що гіпоталамо-гіпофізарно-адренокортикальна система (ГГАКС), і власне її гормонально-секреторна функція, має вирішальне значення для підтримки і відновлення гомеостазу і підтримки стану здоров'я [3, 9, 28-31]. В свою чергу дизрегуляторні процеси з боку ГГАКС, філогенетичне найбільш древнім компонентом якої є вазопресинергічна система гіпоталамуса, призводять до появи так званих хвороб, пов'язаних із хронічним стресом [8, 9, 18, 25, 26, 32]. Порушення функціонування з боку вазопресинергічної системи спостерігається у людей і експериментальних тварин, хворих на цукровий діабет [33-40] або алкоголізм [41]. Беззаперечною є пресорна дія вазопресину та його вплив на серцево-судинну систему, що пов'язано зі здатністю нейропептиду діяти трьома шляхами: 1) безпосередньо на судинні рецептори; 2) регуляцією водно-сольового балансу; та 3) дією на судинний центр довгастого мозку [19, 42-46]. Це обумовлює важливу роль вазопресинергічної системи в протидії критичним станам у тяжко хворих пацієнтів [47-49]. Важливу роль покладають на вазопресинергічну систему у програмуванні механізмів взаємовідносин нейроендокринної та імунної систем [7, 10, 23, 24, 50-53] та пов'язану з цим її роль у механізмах запалення та патогенезі інфекційних хвороб [53, 54].

Все вищезазначене свідчить про важливу роль вазопресинергічної системи гіпоталамусу у організації нейроендокринної відповіді на гострий і хронічний стрес, а також у формуванні адаптаційних реакцій організму. Слід зауважити, що одним із найбільше поширених патологічних впливів на організм є дія гіпоксії, в тому числі як зовнішнього чинника. Але багатоденний вплив дозованої екзогенної гіпоксичної гіпоксії призводить до активації ГГАКС як у тварин, так і у людини, та сприяє підвищенню функціональної активності гіпоталамічних пептидергічних нейронів [33, 37, 55-61]. Режим переривчастих гіпоксичних впливів надає адаптуючі властивості організму і приводить до підвищення його стійкості до багатьох патогенних факторів

середовища: гострої гіпоксії, гіпокапнії, токсичної дії високих тисків кисню, гіпокінезії, дії високої температури або глибокому охолодженню, іонізуючому випромінюванню, фізичному навантаженню [62-69]. Різноманіття проявів ефектів гіпоксичних тренувань пов'язано з тим, що зміни, що виникають під впливом цього чинника, спостерігаються в багатьох органах і системах організму, головним чином в системі дихання, кровообігу, еритроциту та ендокринній системі [62, 64, 66, 68, 70]. В той же час, питання участі пептидергічних систем мозку і зокрема вазопресинергічної системи гіпоталамусу в центральних механізмах адаптації до гіпоксичної гіпоксії розглядається лише в поодиноких роботах [29, 38, 55-56, 68, 71-74] 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. (№ державної реєстрації 0116U005352).

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

Завдання дослідження:

1. Вивчити розподіл нейронів, що синтезують вазопресин, у гіпоталамічних ядрах у щурів в нормі, встановити їх морфометричні характеристики і визначити концентрацію [Arg⁸]-вазопресина і РНК в

нейронах.

2. Вивчити розподіл нейронів, що синтезують вазопресин, у гіпоталамічних ядрах у щурів після 15-ти сеансів гіпоксичної гіпоксії, встановити їх морфометричні характеристики і визначити концентрацію [Arg⁸]-вазопресина в і РНК в нейронах.

3. Вивчити розподіл нейронів, що синтезують вазопресин, у гіпоталамічних ядрах у щурів через 10 днів після закінчення гіпоксичних сеансів, встановити їх морфометричні характеристики і визначити концентрацію [Arg⁸]-вазопресина і РНК в нейронах.

4. Вивчити особливості експресії генів *HIF-1α* і *HIF-3α* в гіпоталамусі у щурів в нормі, після 15-ти сеансів гіпоксичної гіпоксії і в постгіпоксичний період.

5. Вивчити особливості експресії білків HIF-1α, HIF-3α 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, імунофлюоресцентні 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 імунофлюоресцентного аналізу серійних зрізів гіпоталамуса встановлені якісні та кількісні критерії функціональної активності вазопресинергічної системи гіпоталамуса при багатоденної дії переривчастої гіпоксичної гіпоксії та у постгіпоксичний період.

Вперше встановлено, що переривчасте дію гіпоксичної гіпоксії на протязі 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 в поєднанні з посиленням утворення білка-маркера нейросекреції cFos і специфічних білків-маркерів гіпоксичної стимуляції HIF-1 α і HIF-3 α .

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

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

Доповнені наукові уявлення про особливості функціональної реакції вазопресинергічних нейронів супраоптичного ядра на багатоденне дію переривчастої гіпоксичної гіпоксії, які проявляються відсутністю специфічної реакції на гіпоксичний стимул у вигляді синтезу білків HIF-1 α і HIF-3 α , і гальмуванням синтезу білка cFos і вазопресину, а також формування дистрофічних морфогістологічних змін у нейроцитах. Показано, що 10-денний погіпоксичний 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 α і HIF-3 α в тканини медіобазального гіпоталамуса зі збереженням високих показників експресії генів сімейства *hif* протягом 10-денного погіпоксичного періоду.

Практичне значення одержаних результатів. Робота є фундаментальним дослідженням, результати якого 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 Буковінського 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, імунофлюоресцентні, морфометричні, денситометричні та молекулярно-генетичні дослідження матеріалу; провів статистичний аналіз отриманих даних, систематизував та інтерпретував отримані результати; написав всі розділи дисертації; сформулював висновки.

Апробація результатів дисертації відбулась на засіданні кафедр патологічної фізіології, нормальної фізіології, патологічної анатомії і судової медицини, лабораторної діагностики, мікробіології, вірусології та імунології, анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії; гістології,

цитології та ембріології Запорізького державного медичного університету МОЗ України від 02.06.2020 р. (протокол №18).

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 в матеріалах міжнародних і Всеукраїнських науково-практичних конференцій.

Структура то 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).

РОЗДІЛ 1
СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН
ВАЗОПРЕСИНЕРГІЧНОЇ СИСТЕМИ ГІПОТАЛАМУСА
У НОРМІ ТА ПРИ ПАТОЛОГІЇ
(ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Фізіологічні ефекти вазопресину

Вазопресин є еволюційно древнім пептидом, характерним для всіх ссавців, а його аналог – вазотоцин – синтезується в гіпоталамусі починаючи з хрящових риб [13, 15, 22]. Вазопресин – це невеличкий пептид, що складається з дев'яти амінокислот з дисульфідним мостом між двома цистеїновими амінокислотами, який синтезується в ядрах гіпоталамуса, а також у мінорних кількостях виробляється різними тканинами поза гіпоталамусом. Синтез вазопресину в гіпоталамусі здійснюється разом з двома асоційованими білками – нейрофізином 2 (NPII) і копептином, а ген вазопресину розташований у хромосомній ділянці 20p13 [75-76]. У такому вигляді вазопресин синтезується в якості попередника пре-про-вазопресину, що складається з 164 амінокислот, упаковується в нейросекреторні гранули та транспортується по аксонах у задню частину гіпофіза. На шляху до нейрогіпофіза вазопресин перетворюється на активний гормон і накопичується для подальшої секреції у кровоток [16]. Цікаво відзначити, що копептин секретується разом із вазопресином в еквімолярних співвідношеннях і на даний час розглядається як сурогатний маркер секреції вазопресину, аналогічно тому, як С-пептид вважається маркером секреції інсуліну [76-77].

Рівень вазопресину в плазмі крові у здорових людей зазвичай дуже низький: від 0 до 3 пг/мл (0-3 пмоль/л) [28]. Концентрація вазопресину в сечі в кілька разів вища, ніж у крові, але швидкість його виведення у сечу не відображає його дійсної концентрації в крові, оскільки вона в значній мірі залежить від осмоляльності плазми і сечі [28].

За фізіологічних умов основним стимулом для виділення вазопресину є зневоднення, що призводить до збільшення осмоляльності плазми. Але при зміні осмоляльності натрій надає більший вплив на секрецію вазопресину, ніж сечовина або глюкоза [78]. Іншими стимулами секреції вазопресину є скорочення об'єму циркулюючої крові і стресові ситуації [79]. Експериментальними дослідженнями та клінічними спостереженнями доведено, що поріг секреції вазопресину і його залежність від осмоляльності плазми мають схильність до спадковості [80]. Встановлено, що стимуляція V1a-рецепторів в нирці вимагає більш високої концентрації вазопресину, ніж ефекти, опосередковані V2-рецепторами [81]. У здорових людей введення вазопресину зі швидкістю від 1,5 до 25 пг/хв*кг викликало значну, дозозалежну антидіуретичну дію, але при цьому тільки найвища швидкість введення вазопресину викликала помітне зростання його концентрації в крові [82], що свідчить про вкрай високий ступінь зв'язування нейропептида у нирках.

Фізіологічні ефекти вазопресину реалізуються після його зв'язування зі специфічними рецепторами. Ідентифіковано три різних типи рецепторів для вазопресину – V1a, V1b і V2 [13, 83].

V1a-рецептори в основному експресуються на клітинах гладеньких м'язів судин і в міомерії, де вони опосередковують вазо- і міоконстрикцію, а також на гепатоцитах і тромбоцитах, стимулюючи глікогеноліз у печінці і агрегацію тромбоцитів. У центральній нервовій системі V1a-рецептори регулюють циркадний ритм [84], температуру тіла [85], соціальну поведінку, соціальне пізнання і емоції [86]. Вони також відіграють найважливішу роль в розвитку психічних розладів, таких як тривога, депресія і посттравматичні стресові розлади [5-6, 10, 17, 22, 30, 87-88]. V1a-рецептори присутні і в інших тканинах, в тому числі в мозковій і кірковій речовині надниркових залоз, а також у жировій тканині [13, 27, 54, 83].

V1b-рецептори інтенсивно експресуються в клітинах кортикотрофів аденогіпофіза, де вони модулюють вивільнення адренкортикотропного

гормону (АКТГ) [89]. V1b-рецептори також беруть участь у формуванні когнітивних функцій мозку [83, 90]. Висловлювалося припущення, що істотне підвищення експресії V1b-рецепторів і супутнє наростання пулу цАМФ в кортикотрофах може ставати причиною розвитку кортикотропних аденом [91].

Основна функція V2-рецепторів реалізується в нирках, де вони розташовані на мембрані ниркових каналців, а їх зв'язування з лігандом (вазопресином) призводить до підвищення синтезу аквапоринів-2 та їх уведення в апікальну мембрану [13, 83, 92]. В результаті вазопресин підвищує проникність мембран для води і підсилює реабсорбцію води в нирках. V2-рецептори в петлі Генле нирок стимулюють реабсорбцію Na⁺. Таким чином, дефіцит вазопресину або зниження чутливості нирок до нього призводить до нецукрового діабету – стану, що характеризується поліурією, полідипсією і гіпернатріємією. Існує також екстраренальний пул V2-рецепторів на судинному ендотелії [83], де активація синтетичним агоністом V2/V1b-рецепторів вазопресину десмопресином (dDAVP – de-amino 8D-arginine vasopressin) або поєднання його введення з екзогенним вазопресином призводить до вивільнення фактору фон Віллебранда (vWF) і фактора VIII [93-94]. Є клінічні спостереження, які свідчать про посилення експресії V2-рецепторів у трансформованих епітеліальних клітинах, у тому числі при ракові легенів, молочної залози та шийки матки, а також кортикотрофних аденомах гіпофіза [95-98].

1.2. Гіпоталамо-нейрогіпофізарна крупноклітинна вазопресин-синтезуюча система як регулятор гіпофізарних функцій

Гіпоталамус є частиною мозку, який із функціональної точки зору є головним центром вісцерального контролю вегетативних функцій всього організму. Серед основних функцій гіпоталамуса – регуляція температури тіла, апетиту і фертильності, циркадних ритмів і лактації, рідинного гомеостазу та харчової поведінки, ноцицепції і серцево-судинної регуляції,

контролю ендокринної системи і її реакції на стрес [21, 99]. Нейрони гіпоталамуса організовані в скупчення ядер, які мають різні морфологічні та функціональні особливості. Два з них – це парні: паравентрикулярне (ПВЯ) і супраоптичне (СОЯ) ядра гіпоталамуса – мають велике значення для регуляції функції адено- і нейрогіпофіза, і відіграють ключову роль у відповіді на стрес. ПВЯ розташоване з двох боків уздовж стінки третього шлуночка мозку. Латеральна частина ПВЯ в основному складається з великих нейронів діаметром 20-30 мкм, які формують крупноклітинні суб'ядра ПВЯ; медіальна частина ПВЯ переважно складається з дрібних нейронів, діаметром 7-10 мкм, які формують дрібноклітинні суб'ядра. СОЯ є крупноклітинним ядром, сформованим із нейронів діаметром 20-30 мкм, і знаходяться дорсально від оптичних трактів [19-20, 100-102].

ПВЯ і СОЯ рясно васкуляризовані і на кожен крупноклітинний нейрон припадає по одній капілярної петлі, що відображає високий рівень метаболізму у нейроцитах [103]. Для ПВЯ і СОЯ характерні вікові і гендерні зміни активності нейронів [104-105]. Крупноклітинні нейрони ПВЯ і СОЯ спрямовують свої довгі аксони через внутрішню зону серединного підвищення до нейрогіпофіза, де вони закінчуються на фенестрованих кровоносних капілярах [75]. У цілому вони утворюють гіпоталамо-нейрогіпофізарну систему (ГНГС), що грає основну роль у підтримці гомеостазу і регуляції численних адаптаційних реакцій [106]. Основними гормонами цієї системи є нонапептиди вазопресин і окситоцин [19-20, 107].

Загально визнано, що вазопресин крупноклітинних нейронів є одним з основних фізіологічних регуляторів водно-електролітного балансу, синтез якого специфічно активізується у відповідь на дегідратацію, гіповолемію та гіпотензію [108-110]. Існують численні докази участі крупноклітинних вазопресинергічних нейронів у контролі секреції адренкортикотропного гормону (АКТГ) як компонента гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальної системи (ГТАКС) [45, 111-114]. Незважаючи на те, що вазопресин- і окситоцин-синтезуючі нейрони представляють дві різні популяції клітин,

ко-експресія обох нонапептидів в одній нейросекреторній клітині експериментально була продемонстрована при моделюванні специфічних фізіологічних умов, таких як лактація або водна депривація [20, 115]. Відомо, що ПВЯ і СОЯ регулюються різними частинами мозку [12, 52, 75, 116], а їх функції модулюються різними нейротрансміттерами і гормонами, в тому числі – глюкокортикоїдами, естрогенами, глутаматом і ГАМК, дофаміном і серотоніном, ангіотензином II, нейропептидом Y та проопіомеланокортином [19, 99]. Нейрони ГНГС здатні синтезувати й інші нейропептиди поряд із вазопресиноном та окситоцином, наприклад, галанін, лей- і мет-енкефаліни, речовину P, вазоактивний інтестинальний поліпептид та інші, які можуть діяти паракринно або аутокринно в межах ПВЯ і СОЯ [19, 117]. Крім того, було продемонстровано локальне вивільнення вазопресину і окситоцину в позаклітинну рідину при екзоцитозі з дендритів або безпосередньо з перикаріону крупноклітинних нейронів [112]. У сукупності це свідчить про високий рівень складності регуляції ГНГС при різних фізіологічних і патологічних станах.

1.3. Гіпоталамо-гіпофізарно-адренокортикальна система і її взаємодія з гіпоталамо-нейрогіпофізарною системою

Нейроендокринні механізми стресової відповіді включають активацію гіпоталамо-гіпофізарно-адренокортикальної системи (ГГАКС), яка ієрархічно регулюється механізмами позитивного та негативного зворотного зв'язку [113, 115, 117-118]. Нормальне функціонування ГГАКС є дуже важливим для регуляції метаболічних, імунних, серцево-судинних та нейробіологічних процесів, а також для контролю процесів формування органів, їх морфогенезу та підтримки клітинної маси [119-120]. Ключовим гормоном ГГАКС вважається гіпоталамічний нейропептид кортикотропін-релізінг гормон (CRH), який синтезується у дрібноклітинних нейронах медіального суб'ядра ПВЯ, що простягають свої аксони через зовнішню зону серединного підвищення і секретують CRH в гіпофізарну портальну систему [121]. CRH

стимулює продукцію АКТГ в аденогіпофізі, що у свою чергу спричиняє синтез і секрецію в надниркових залозах глюкокортикоїдів – кортизолу у людини та кортикостерону у гризунів – у відповідь на різноманітні гострі та хронічні стресові подразники [118, 122]. Є дані про вікову залежність рівня експресії CRH у гіпоталамусі у гризунів і людини [123]. Характерно, що дрібноклітинні нейрони ПВЯ також синтезують вазопресин [19, 124], секреція якого посилюється при стресі [114, 125]. Ко-експресія CRH і вазопресину в дрібноклітинних нейронах ПВЯ доведена як у гризунів [118], так і у людини [126-127]. Показано, що ко-локалізація вазопресину з CRH посилює дію CRH на кортикотрофи аденогіпофіза, що є особливо актуальним після експериментальної адреналектомії [128], коли різко знижується рівень глюкокортикоїдів у крові, або при хронічному стресі [105, 129-132]. Відзначено, що при гострому стресі синтез і секреція вазопресину швидко збільшуються паралельно з CRH і АКТГ [133-134]. При цьому вазопресин сприяє повноцінній і адекватній секреції АКТГ у відповідь на гострий стрес [135]. Експерименти з нокауту генів показали, що для забезпечення нормальної секреції АКТГ у фізіологічних умовах необхідний V1b-рецептор [133, 136]. Гострі стресові фактори, такі як іммобілізація або вимушене плавання, підвищують рівень АКТГ і кортикостерону в плазмі у мишей дикого типу порівняно з тваринами, нокаутуваними за геном V1b-рецептора [136].

Важливість глюкокортикоїдних гормонів для функціонування нейроендокринної системи визначається їх здатністю вільно долати гематоенцефалічний бар'єр і, таким чином, бути периферичними медіаторами центральних функцій, які працюють за механізмом негативного зворотного зв'язку [132]. Існує як мінімум два різних механізми такого регулювання: класичний геномний, коли реалізується механізм відстроченого зворотного зв'язку через активацію глюкокортикоїдних і/або мінералокортикоїдних рецепторів, і негеномний механізм реалізації швидкого зворотного зв'язку [120, 132]. Відомо, що біодоступність глюкокортикоїдів та їх спорідненість до тканин-мішеней залежить від рівня кортикостероїд-зв'язуючого глобуліну

[137]. Показано, що в нейронах і гліальних клітинах різних ділянок головного мозку відбувається експресія кортикостероид-зв'язуючого глобуліну [133-134]. Подібна експресія кортикостероид-зв'язуючого глобуліну спостерігається у вазопресин-синтезуючих нейронах гіпоталамуса [135]. Важливість глюкокортикоїдного сигналу для нормального функціонування ГГАКС визначається не тільки їх роллю як гормонів, що забезпечують механізми негативного зворотного зв'язку, але і їх участю в реалізації центральних і периферичних ефектів адаптації. Глюкокортикоїди відіграють важливу роль в метаболічній, імунній та вегетативній адаптації до стресу, проте хронічна або неадекватна активація ГГАКС призводить до патологічних станів [29, 138].

Ендокринна регуляція ГГАКС є дуже складною і відбувається в присутності численних нейротрансмітерів, гормонів і нейропептидів, які регулюють та інтегрують вплив на компоненти ГГАКС на різних рівнях [1, 3, 29, 49, 121]. Наприклад, добре досліджені стимуляція вивільнення АКТГ і глюкокортикоїдів при активації центральної глутаматної системи мозку або гальмування внаслідок активації ГАМК-ергічної системи [120, 136]. При цьому питання функціональної взаємодії ГГАКС і ГНГС при стресі і на цей час є не цілком очевидним і залишається дискусійним [21, 112, 139-140].

1.4. Реакція гіпоталамо-гіпофізарно-аденокортикальної системи на хронічний стрес

Вивчення патогенезу різних хронічних захворювань у людини, зокрема психічних, аутоімунних і серцево-судинних, виявили численні патологічні зміни на різних рівнях морфологічної та функціональної організації ГГАКС [21, 23, 29, 79, 131]. Зокрема, було показано, що певні нейроендокринні фактори відіграють важливу роль у патогенезі ішемічної хвороби серця (ІХС) [141-142]. Виходячи з нейрогормональної гіпотези [141], ІХС вважається високоскладним клінічним синдромом. Його прояв і прогресування сильно залежить від активації стероїдних гормонів і цитокінів [142]. Поряд із

механічними факторами ушкодження це призводить до збільшення розмірів кардіоміоцитів і гіпертрофії серця [143]. При цьому у пацієнтів з ІХС спостерігається активація експресії CRH в гіпоталамусі і АКТГ в гіпофізі [131], а також збільшення пулу нейроендокриноцитів гіпоталамуса, в яких посилюється ко-експресія CRH і вазопресину [118]. Це узгоджується з результатами, отриманими на тваринах з експериментальною ІХС [144-145]. При цьому примітним фактом є те, що рівень кортизолу у хворих на ІХС, як правило, не відрізняється від рівня контрольної групи, а підвищення рівня кортизолу не виявляється навіть у пацієнтів з тяжкими формами ІХС. При цьому характер змін, що спостерігаються в гіпоталамусі і передній частці гіпофіза у цих пацієнтів передбачали б підвищення рівня кортизолу плазми крові через високі показники CRH і АКТГ в крові [131, 146]. Можливим поясненням даних клінічних спостережень є факт встановлення формування глибоких дистрофічних змін кортикоцитів у корі надниркових залоз у хворих на ІХС [21, 131], що свідчить про наявність дизрегуляторних порушень у функціонуванні ГГАКС. Подібні дизрегуляторні порушення у вигляді невідповідності між рівнем центральної стимуляції щодо утворення CRH і АКТГ та рівнем периферичного синтезу глюкокортикоїдів спостерігаються при хворобі Альцгеймера, розсіяному склерозі, сепсисі, депресії, у хворих із хронічною алкогольною хворобою [82, 105, 147-151], а також відтворюються в деяких експериментальних моделях на тваринах, наприклад при хронічному запаленні, септичному шоці або тривалому стресі у щурів [3, 129-130, 152].

Таким чином, нейроендокринна регуляція ГГАКС є складним і динамічним процесом, що відіграє важливу роль у гомеостатичному регулюванні функцій різних відділів головного мозку, а дизрегуляторні порушення в ГГАКС можуть мати згубні наслідки не тільки для функціонування різних відділів ЦНС, а й призводити до розвитку соматичних захворювань.

1.5. Реакції гіпоталамо-нейрогіпофізарної системи у відповідь на хронічний стрес

Паравентрикулярне ядро гіпоталамуса відіграє важливу роль у регуляції стресових реакцій. Як згадувалося вище, CRH-синтезуючі нейрони медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ (мдПВЯ) відіграють ключову роль у стимуляції утворення АКТГ і глюкокортикоїдів у фізіологічних умовах та при стресі [8, 23, 26, 31-32, 118, 153-155]. Проте, нейрони крупноклітинних структур гіпоталамуса, а саме задньолатерального крупноклітинного суб'ядра ПВЯ (злкПВЯ) і СОЯ, активуються у відповідь на різноманітний і дуже широкий спектр, але не на всі хронічні стресові фактори. Наприклад, хронічний соціальний стрес практично не спричиняє посилення синтезу вазопресину в ПВЯ [155]. Однак модуляція водно-електролітного балансу або електростимуляція нейронів викликає збільшення синтезу й секреції вазопресину у системний кровообіг [156-157]. Зміни функції і морфології крупноклітинних вазопресинергічних нейронів гіпоталамуса відзначали в патогенезі алкогольної хвороби, яка призводить до дегідратації і порушення осмоляльності сироватки крові [158]. При цьому в ядрах гіпоталамуса спостерігається глибоке гальмування синтезу вазопресину і зменшення його секреції в кров, що відмічається як у алкоголіків [105], так і спостерігається в експерименті при хронічному вживанні алкоголю у гризунів [159-160].

У пацієнтів з ІХС спостерігається посилена активація синтезу і секреції вазопресину в задню частку гіпофіза [161], що, вочевидь, пов'язано з участю гіпоталамічного вазопресину в регуляції функції серцево-судинної системи і патогенезі ІХС [162-164]. Чисельними клінічними даними доведено патогенетичний вплив вазопресину на стан сольового і водного дисбалансу, гіпонатріємію, ниркову недостатність, що є найбільш поширеними коморбідними станами у пацієнтів з ІХС [165-167]. Показано, що підвищений рівень вазопресину в крові посилює ремоделювання лівого шлуночка, спричиняє вазоконстрикцію і гіперволемію у пацієнтів з ІХС [165-168]. Це пояснює високу клінічну ефективність застосування антагоністів рецепторів до вазопресину – селективних V2 або комбінованих V2/V1-блокаторів при лікуванні основних симптомів ІХС [169-170].

Було встановлено, що у щурів, які піддавалися багаторазовому стресу, в гіпофізі збільшувалася експресія V1b-рецепторів, на відміну від рецепторів до CRH, що призводило до зниження ефективності зв'язування гіпоталамічного CRH [13, 18, 118, 171]. При цьому, на тлі збільшення вмісту вазопресину в нервових терміналах концентрація CRH в гіпофізі при хронічному стресі не зменшувалася [125]. Характерно, що хоча кількості вивільненого АКТГ все ж було досить для отримання повноцінної глюкокортикоїдної відповіді в надниркових залозах на тлі відсутності вазопресину, виявилось, що підвищення вазопресинергічної активності гіпоталамуса є основним визначальним фактором реактивності ГГАКС при хронічному стресі [18]. Дослідження показали, що при хронічному стресі CRH-ергічна регуляція ГГАКС перемикається на вазопресинергічну у поєднанні з підвищенням порогу чутливості V1b-рецепторів гіпофіза, що свідчить про те, що вазопресин починає відігравати першочергову роль у адаптації ГГАКС до тривалої стресової стимуляції [13, 18].

1.6. Вплив вазопресину на нейроімунні реакції

З'являється все більше даних, що свідчать про участь крупноклітинної вазопресинергічної системи гіпоталамуса в регуляції імунних реакцій при стресі, що обумовлено здатністю цих нейронів зберігати і секретувати цитокіни, а також інші імуномодуючі чинники [2, 38, 53, 172]. У цілому це свідчить про те, що ядра крупноклітинної вазопресинергічної системи ПВЯ і СОЯ є важливою частиною ефекторних шляхів, відповідальних за патогенез різних стресових розладів у людини. Показано, що вазопресин певною мірою стимулює як вроджений, так і адаптивний імунітет, завдяки своїй здатності стимулювати як ГГАКС, так і секрецію пролактину [173]. У результаті вазопресин виявляється важливим імунорегуляторним нейропептидом. Функція вазопресину в умовах гострого альтеративного запалення або хронічного запалення істотно різниться [173]. У той час як під час гострого запалення рівні вазопресину підвищуються разом із CRH, в умовах хронічного

запалення секреція CRH навпаки, пригнічується. Отже, вазопресин виступає первинним імунорегуляторним нейропептидом у гіпоталамусі при хронічному запаленні, тоді як при гострому запаленні відіграє другорядну роль [13, 173]. Дослідження показали, що щури з більш високим рівнем вазопресину в сироватці крові мають підвищену схильність до запальних і автоімунних захворювань, а низький рівень нейропептиду в сироватці крові корелює зі зниженням інтенсивності запальної реакції [174, 175]. Вважають, що вплив вазопресину на клітини імунної системи опосередковується усіма типами рецепторів – V1a, V1b і V2 [11, 13, 176-180].

Встановлено, що поряд із вазопресином на адаптивну імунітетність впливають гормон росту і пролактин, рівні яких підвищуються при ендотоксемії разом із CRH і вазопресином [173]. Вазопресин, АКТГ і глюкокортикоїди здатні перешкоджати імуносупресії у гіпофізектомованих щурів. У цьому випадку вазопресин, мабуть, відіграє балансує роль у модуляції імунної відповіді: за рахунок регулювання функціональної активності ГГКС впливає на вроджений імунітет, а за рахунок стимуляції секреції пролактину підтримує адаптивний імунітет [175].

Відомо, що травми, запалення, інфекція або психосоціальний стрес посилюють секрецію цитокінів [181]. При цьому інтерлейкіни 1-бета і 6 можуть підвищувати активність ГГКС і стимулювати секрецію АКТГ [182-184]. Зокрема, периферичне введення інтерлейкіну 1-бета збільшувало експресію мРНК до CRH, білку cFos і до вазопресину в мдПВЯ [185-187], а також підвищувало рівень мРНК до проопіомеланокортину в аденогіпофізі [185]. Ін'єкційне введення інтерлейкіну-6 підвищувало в плазмі концентрацію вазопресину [182], АКТГ, кортикостерону і пролактину [185]. При цьому більш вираженими були ефекти інтрацеребровентрикулярного введення інтерлейкіну-6 порівняно з периферичним його введенням [181, 187-188].

1.7. Молекулярні механізми чутливості до кисню та його нестачі

Кисень є важливим субстратом для отримання енергії і ко-фактором численних біохімічних реакцій у клітині, а позбавлення кисню є однією з найбільш критичних фізіологічних проблем для більшості живих організмів. Недостатній вміст кисню в тканинах, або гіпоксія, може зустрічатися як в фізіологічних ситуаціях, таких як морфогенез органів або підтримка пулу стовбурових клітин, так і бути проявом патологічних станів, таких як запалення, старіння, легеневі розлади, серцево-судинні захворювання, дегенерація нейронів і рак [189-190]. Для людини і багатьох інших ссавців нестача кисню протягом всього декількох хвилин призводить до швидкої втрати пулу макроергічних молекул АТФ і КФК, гальмування біохімічних процесів, деградації клітин і, в кінцевому рахунку, до смерті. Не дивно, що всі живі істоти на Землі розвинули фізіологічні механізми, які дозволяють цим складним багатоклітинним системам реагувати на гіпоксичні ситуації, зберігаючи цілісність функціонування клітин до межі можливостей організму. У першу чергу, такі системи контролю кисневого забезпечення включають хемочутливі до гіпоксії клітини, що відповідають за «зондування» концентрації кисню в артеріальній крові і перетворення цієї хімічної інформації в інформацію нервових рецепторів, яка по аферентним нервовим шляхам доставляється в центральну нервову систему (ЦНС). Раніше вважалося, що єдиними сенсорами кисню у ссавців є хеморецепторні клітини каротидних синусів і епідермальних тілець у зоні біфуркації сонної артерії. Однак, останні дослідження вказують на те, що всі клітини тіла, а не тільки клітини каротидного синуса, можуть відчувати дефіцит кисню і відповідати активацією експресії певних генів-мішеней, що досягається за допомогою кисень-залежної регуляції утворення білків сімейства HIF (hypoxia-inducible factor) [190-193]. Дослідженнями G.L.Semenza та співавт. показано, що у мишей, які нокаутовані за геном *hif*, і в яких спостерігається клітинна недостатність білка HIF-1 α , клітини каротидного тільця нездатні відповідати на гостру або хронічну гіпоксію [189, 194-196].

HIF є головним транскрипційним регулятором, який модулює багато клітинних реакцій, дозволяючи клітинам адаптуватися до низької концентрації кисню. Крім адаптивної функції до гіпоксичних умов навколишнього середовища, HIF відіграє важливу роль у патогенезі багатьох захворювань, таких як хвороби серця і кровообігу, порушення обміну речовин, запальні і онкологічні захворювання [73, 197-201].

Білок HIF-1 був вперше виділений з пухлинних клітин печінки людини лінії Hep3B [202]. Він відноситься до суперсімейства білків PAS і є гетеродимером, що складається з двох субодиниць – HIF-1 α і HIF-1 β [203-204]. HIF-1 α є універсальною субодиницею для всіх білків сімейства β NHLH-PAS, у той час як субодиниця HIF-1 β специфічна саме для HIF-1 [202, 205]. Експресія HIF-1 α і рівень цього білка залежать від концентрації і парціального тиску кисню (pO₂) в крові [206-209]. При гіпоксії спостерігається підвищення активності HIF-1 α [205, 209, 210]. HIF вважається провідним транскрипційним регулятором генів ссавців, відповідальних за реакцію на нестачу кисню. Він активується у фізіологічно важливих місцях регуляції кисневих шляхів, забезпечуючи швидкі і адекватні відповіді на гіпоксичний стрес, активуючи експресію генів, що регулюють ангиогенез [211-212], діяльність клітин серцево-судинної [196] і дихальної [189] систем, енергетичний метаболізм [213-214], еритропоез [215] і апоптоз [216-219]. Збільшення експресії HIF-1 α також призводить до підвищення експресії генів гліколітичних ферментів, таких як альдолаза, фосфофруктокінази, піруваткіназа [194-195, 220]. HIF-1 α синтезується в різних тканинах, у тому числі і в нервовій [221-222]. Він виявлений у всіх клітинах головного мозку, але його експресія в нейронах вища, ніж у гліальних і судинних клітинах мозку [223-226, 234].

У клітинах α -субодиниця білка HIF існує у вигляді ізоформ HIF-1 α , HIF-2 α і HIF-3 α , яким притаманна різна біологічна властивість. Бета-субодиниця білка HIF названа aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT / HIF-1 β). Як α -, так і β -субодиниці належать до базисного сімейства транскрипційних факторів, організованих за типом «спіраль-петля-спіраль» (helix-loop-helix,

HLH) із зоною гомології β HLH / Per-ARNT-Sim (PAS домен). Наявність домену β HLH визначає приналежність до великого сімейства димеризованих еукаріотичних факторів транскрипції, в яких домен HLH відповідає за димеризацію, зв'язування з ДНК і взаємодію з РНК-полімеразою [215, 227-229].

Субодиниця HIF-1 α є кисень-чутливою, вона має специфічну функцію в стимульованій гіпоксією генній регуляції і є мішенню для кисень-чутливих сигнальних шляхів. Субодиниця HIF-1 β є кисень-нечутливим конститутивним ядерним протеїном, який має різних партнерів у димеризації в інших системах генної регуляції [204, 230-231]. Обидві HIF-1 α і HIF-2 α субодиниці за умов гіпоксичного стану піддаються швидкій білковій стабілізації і з'єднуються з ідентичною мішенню в послідовності ДНК [229, 232-233]. Дані останніх років свідчать про те, що взаємини цих субодиниць не є простими. Показано, що принаймні один з HIF-димерів (HIF-2 α) разом із HIF-1 β і іншим спорідненим протеїном HIF-3 α можуть виступати в якості інгібіторів HIF-1 α [235-238]. Біохімічне порівняння субодиниць HIF-1 α і HIF-2 α показало, що ці протеїни мають дуже близькі біохімічні властивості, але кожна субодиниця контролює досить певні біологічні функції. Наприклад, в процесі ембріогенезу HIF-1 α має відношення до контролю васкуляризації, а HIF-2 α – до продукції катехоламінів [215-216, 239]. Є дані про те, що в культурі людських легеневи́х ендотеліальних клітин білки HIF-1 α і HIF-2 α однаково активувалися на 4-годинну гіпоксію у газовому середовищі з 0,5 % O₂ на трансляційному або посттрансляційному рівні. Разом із тим, вони по-різному реагували на тривалу 12-годинну гіпоксію (0,5 % O₂), а саме стимуляція білка HIF-1 α зникла через зменшення стабільності її мРНК, у той час як стимуляція HIF-2 α залишалася високою і стабільною [232, 240].

Здатність кисню впливати на активацію генів сімейства *hif* є стадійним процесом, що включає регульований синтез, процесінг і стабілізацію білка HIF-1 α , ядерну локалізацію, димеризацію і взаємодію з транскрипціональними ко-активаторами. На сьогоднішній день аналіз регуляторних

механізмів, що забезпечують активацію HIF гіпоксичними і негіпоксичними стимулами, дозволяє говорити про залучення різних способів активації HIF. У нормоксичних умовах субодиниці HIF-1 α постійно присутні в клітині, але характеризуються виключно коротким періодом напіврозпаду. Їх концентрація підтримується на низькому рівні завдяки декільком процесам і, в першу чергу, двом незалежним шляхам гідроксилювання: проліл- і аспарагін-гідроксилювання [228]. Присутність кисню запускає гідроксилювання пролінового залишку HIF-кисневого домену деградації ODD (oxygen-dependent degradation domain). Це гідроксилювання каталізується сімейством внутрішньоклітинних пролін-гідролаз (PHD - prolyl hydroxylase domain enzymes). У клітинах ссавців були ідентифіковані три ізоформи пролін-гідроксилаз (PHD1, PHD2 і PHD3), які представлені в досить великих концентраціях у клітині, але характеризуються різним паттерном максимальної експресії [241-243]. Активація цих ферментів слугує сигналом для їх розпізнавання α -субодиницею білка фон Хиппель-Ліндау (von Hippel-Lindau protein), який є компонентом убіквітін-протеїнлігази E3, і це робить білок HIF-1 α мішенню для протеасомної деградації [242, 244].

Альтернативний шлях активації HIF киснем включає ферментативне гідроксилювання специфічних амінокислотних залишків у HIF-1 α субодиниці групою 2-оксоглутарат-залежних оксигеназ (2-OG) [245]. Ці оксигенази є негемовими залізовмісними ферментами, які використовують молекулярний кисень в реакціях гідроксилювання, і тому забезпечують прямий зв'язок між наявністю молекулярного кисню і регуляцією HIF, тобто діють як прямий кисневий сенсор [190, 212, 242, 246].

Присутність кисню також викликає гідроксилювання аспарагінового залишку С-термінального домену трансактивації (С-TAD) білка HIF-1 α , блокуючи його взаємодію з ко-активатором транскрипції p300/CBP [246]. Цей процес регулюється специфічною аспарагін-гідроксилазою, що названа FHN-1 (factor-inhibiting HIF-1) [242, 247]. У результаті, в присутності кисню активні ферменти PHD і FHN інактивують білки HIF, тим самим блокуючи HIF-

опосередковану генну транскрипцію. В умовах гіпоксії недостача кисню інактивує PHD і FIH ферменти, що веде до активації білків сімейства HIF, яке у свою чергу запускає експресію гіпоксія-залежних генів, таких як еритропоетин (EPO) [215, 248] і судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF) [43-44, 225, 249-250] та інших.

1.8. Фізіологічні і патофізіологічні механізми дії переривчастої гіпоксичної гіпоксії

Стан гіпоксії виникає кожного разу, коли напруга кисню в клітинах і тканинах організму стає нижче критичного значення, при якому ще можлива підтримка ферментативних окиснювальних реакцій у дихальному ланцюзі мітохондрій. Причини, які безпосередньо зумовлюють виникнення і розвиток стану гіпоксії, можуть бути як зовнішнього (зміна газового складу середовища, підйом на висоту), так і внутрішнього характеру (функціональна недостатність або патологічні зміни життєво важливих органів, різкі зміни обміну речовин, що супроводжуються збільшенням потреби тканин у кисні, дія отрути, шкідливих продуктів обміну, утруднення легеневого дихання та інше). Незалежно від причин, що її породжують, гіпоксія має виражений вплив на перебіг метаболічних і фізіологічних процесів в організмі, що визначають стан здоров'я людини і її працездатність [65, 227, 241].

Короткочасний вплив гіпоксії помірного ступеня стимулює аеробний обмін у більшості органів і тканин, підвищує загальну неспецифічну резистентність організму, сприяє розвитку адаптації до різного роду несприятливих чинників [63, 250-253]. Гіпоксія, що виникає періодично, в тій чи іншій мірі звична для багатьох форм трудової, військової та спортивної діяльності [63, 254-255]. З урахуванням цих обставин, перебування в умовах помірної гіпоксії або повторення її короткочасних впливів може бути використано в цілях збільшення адаптаційного резерву організму, лікування і профілактики багатьох захворювань, а також для спеціальної підготовки до умов професійної діяльності.

Показано, що механізми пристосування до гіпоксії реалізуються за типом стрес-реакції та за участі гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальної і симпато-адреналової систем [256], роль яких у формуванні специфічних та неспецифічних компонентів адаптації до дефіциту кисню широко обговорюється в літературі [66, 68, 71, 206, 220, 244, 247, 257-258].

Процес поліпшення насичення гемоглобіну киснем, прискорення транспорту і підвищення утилізації його клітинами реалізується через безпосередні реакції певних систем організму і завдяки формуванню довгострокової адаптації, так званого «структурного сліду адаптації» [68, 71]. У відповідь на гіпоксичний стимул відбувається централізація кровообігу. При цьому життєво важливі органи: мозок, серце, нирки мають перевагу в кровопостачанні за рахунок інших органів і тканин. Як підйом на висоту, так і вплив переривчастої гіпоксії супроводжується підвищенням артеріального тиску, тиску в системі легеневої артерії, збільшенням частоти серцевих скорочень та дихання. Одночасно в системі легеневої артерії розкриваються резервні капіляри. Відбувається викид у кров'яне русло раніше депонованих еритроцитів, збільшується об'єм циркулюючої крові та хвилиний об'єм кровообігу. Ці реакції є своєрідною гарантією збереження життєздатності цілісного організму за умов гіпоксії. Під впливом переривчастої гіпоксії на організм відбуваються глибокі біохімічні і структурні зміни, адаптація клітинних структур в нових умовах функціонування [68, 228, 235-236, 246, 259].

Причинами реакцій біохімічної адаптації при гіпоксії є зміни внутрішньоклітинного метаболізму, уповільнення оновлення біомембран, їх часткове руйнування зі звільненням протеолітичних ферментів, що призводить до деградації деяких білків і утворення поліпептидів. Останнім відводиться роль регуляторів синтезу ДНК, РНК. Активація синтезу білків, що відбувається в умовах накопичення недоокиснених продуктів, призводить до модифікації структури і властивостей макромолекул, створює запас міцності біохімічних реакцій і можливість їхнього повноцінного протікання в умовах

зниженого вмісту кисню. Одночасно з перебудовою структури в ланцюзі окисного фосфорилювання відбувається процес активізації анаеробного гліколізу, що вносить свій внесок в енергозабезпечення організму [71, 208, 212, 236, 242, 260].

Але на сьогодні добре відомо, що наслідком впливу гіпоксичного фактора може бути не тільки розвиток патологічного процесу, але і прояв саногенних ефектів екзогенної гіпоксії. За даними клінічних спостережень показано участь органів і систем, що забезпечують доставку кисню в організм, у процесі адаптації до переривчастої гіпоксії з розвитком саногенних ефектів [66, 209, 261-262]. Показано, що дозовані гіпоксичні (гіпобаричні або нормобаричні) тренування підвищують загальну стійкість організму, ефективно відновлюють функціональний стан еритроноу при гіпопластичних і залізодефіцитних анеміях, знижують виразність клінічних проявів і продовжують ремісію при бронхіальній астмі, мають гіпотензивну дію при гіпертонічній хворобі [66, 194, 261, 263]. Вивчення подібних ефектів показало, що в основі саногенної дії гіпоксії лежить стимуляція функціонального стану органів і систем, відповідальних за транспорт і утилізацію кисню в організмі, тобто серцево-судинної та дихальної систем і еритроноу. Поряд із цим, гіпоксичні тренування активують функціональний стан нейроендокринної системи, формуючи необхідний гормональний базис розвитку адаптаційних процесів в організмі [195, 264-266].

Вивчення захисної дії гіпоксичної гіпоксії, проведене на лабораторних тваринах, встановило у них формування толерантності до гіпоксії, яка сприяє підвищенню адаптації до гіпоксії і покращує її переносимість. Найбільш поширеною моделлю гіпоксичної гіпоксії було використання короткочасної (один раз протягом 30 хвилин) або переривчастою (30 хвилин протягом 10-15 днів) експозиції 10 % O_2 , в результаті якої у експериментальних тварин (щурів, мишей і кролів) підвищувалася переносимість гострої гіпоксії, фізичного навантаження, дії токсичних доз хімічних препаратів [267-269]. Було встановлено, що дозована гіпоксична гіпоксія, застосована в якості

прекондиціонуючого фактора, має церебропротекторний вплив, захищаючи від травм головного мозку або пом'якшуючи наслідки церебральної ішемії [268-272], та має кардіопротекторну дію, захищаючи міокард від ішемії і реперфузійного ушкодження [273]. Пренатальне гіпоксичне preconditionування покращує вентиляційну здатність легень і знижує смертність у новонароджених щурів [274].

Одним із саногенних ефектів переривчастої гіпоксії є і поліпшення мікроциркуляції в органах і тканинах за рахунок розкриття резервних капілярів, а також утворення нових, раніше не існуючих судин. Підвищення киснево-транспортної функції крові відбувається за рахунок виходу еритроцитів із депо, стимуляції червоного паростка кісткового мозку і підвищення вмісту гемоглобіну [71, 189, 196]. Двотижнева адаптація дорослих щурів до високогірної гіпоксії збільшує серцевий викид, знижує загальний периферичний опір, покращує ангиогенез і підвищує стабільність транспорту кисню в мікроциркуляторному руслі [275]. Адаптація до періодичної гіпоксії ефективно запобігає окиснювальному і нітрозуючому стресу [260, 276-277], сприяє підвищенню активності антиоксидантної системи із мембранопротективним ефектом [71, 232, 245], запобігає розвитку нейродегенеративних змін у нервовій системі та формуванню енцефалопатії [278], порушенню когнітивної функції мозку при експериментальній хворобі Альцгеймера [279]. Проявом імуномодулюючої дії гіпоксичних тренувань є їх пригнічуючий вплив на імунопатологічні процеси з активацією депресивних ланок імунітету: підвищення кількості антитіл-продукуючих клітин, синтезу імуноглобулінів і активізація фагоцитозу, супресивний вплив на патогенетичні ланки алергічних реакцій [63, 67, 119, 252].

Таким чином, в експериментальних дослідженнях було показано, що дозоване застосування гіпоксичної гіпоксії є багатообіцяючою терапевтичною стратегією для профілактики ушкоджень органів, спричинених різними патологічними станами [266, 268-269, 272, 280].

Клінічне застосування гіпоксичної терапії як методу лікування або профілактики захворювань уперше стали випробовувати в СРСР починаючи з 1970-х років, шляхом попередньої гіпоксичної підготовки пацієнтів, або за допомогою адаптації до нестійкої дії гіпоксичної гіпоксії. Така адаптація виникає при диханні повітрям із низьким, зазвичай із 10-12 %, вмістом кисню через маску у нормобаричних умовах, наприклад, у приміщенні на рівні моря, або відтворюється в гіпобаричних умовах середньогір'я чи в барокамері. Це призводить до підвищення загальної неспецифічної резистентності організму [69], фізичної працездатності та витривалості, що особливо важливо при спортивній підготовці [267, 281]. Вважається, що мобілізація ендокринних механізмів функціональної регуляції ГТАКС при гіпоксичних тренуваннях сприяє ефективному підвищенню рівня загальної стійкості організму відносно різних екстремальних факторів зовнішнього середовища [68, 256, 282]. Пацієнти, які пройшли курс гіпоксичних тренувань, здебільшого відзначають підвищення працездатності, зниження стомлюваності, регресію тих захворювань, з якими вони звернулися. На тлі поліпшення самопочуття представляється можливим знизити добові дози медикаментозної підтримуючої терапії [71, 283-284]. Переривчаста гіпоксична гіпоксія також призводить до підвищення стійкості організму людини до хімічних інтоксикацій, у тому числі при проведенні хіміотерапії та при дії хімічних факторів зовнішнього середовища [68, 285].

Відзначена радіозахисна дія переривчастої гіпоксії пройшла серйозну перевірку в клініці ще у 1975 році [68, 286]. Так, було встановлено, що застосування переривчастої нормобаричної гіпоксії при передопераційній променевої терапії злоякісних новоутворень дозволяє збільшити сумарну осередкову дозу опромінення на 25 %, і це є цілком доцільним і перспективним для застосування в якості комплексного методу гіпоксирадіотерапії. Слід наголосити, що радіозахисна дія гіпоксії є специфічною, оскільки вона безпосередньо пов'язана з патогенезом променевої хвороби, і

запобігає підвищенню концентрації активних кисневих радикалів [68, 219, 230, 268, 277, 286].

Вплив високогірної гіпоксії знижує частоту виникнення різних захворювань у місцевих мешканців-аборигенів, зокрема цукрового діабету, ішемічної хвороби серця, неврозів, бронхіальної астми і хронічної обструктивної хвороби легень [287-288]. Переривчасту гіпоксичну гіпоксію успішно використовували для підготовки до операції коронарного шунтування зі штучним кровообігом у пацієнтів з ішемічною кардіоміопатією [289-290], при лікуванні метаболічного синдрому [70].

Використання переривчастої гіпоксичної гіпоксії, як методу, що не містить лікарських засобів, особливо ефективним і рекомендованим виявилось в акушерській практиці [291-296]. У дослідженні Чижова А.Я. зі співавт. було показано існування гіпоксичних циклів тривалістю 3-5 днів із 2-кратною різницею рівнів pO_2 в матковій тканині вагітних щурів порівняно з невагітними тваринами [297]. Такі фізіологічні гіпоксичні цикли сприяли ритмічній періодичній стимуляції метаболічних реакцій, спрямованих не тільки на підвищення стійкості до гіпоксії, але й на підтримку неспецифічної резистентності тканин плода і матки жіночого організму під час і після вагітності. Це дозволяє припустити, що переривчаста гіпоксична гіпоксія діє як природний біоритмічний процес, який має еволюційно вироблений фізіологічний механізм, спрямований на підвищення неспецифічної резистентності плода [298]. Клінічне застосування переривчастої гіпоксичної гіпоксії в акушерстві показало більш високі фізіологічні параметри зрілості новонароджених від матерів, які пройшли курс гіпокситерапії [293, 299]. Гіпокситерапія позитивно впливає на клінічну картину у вагітних перед кесаревим розтином [300-301], у жінок до і після гінекологічної операції [302]. У вагітних гіпокситерапія знижує ризик виникнення еклампсії або знижує тяжкість її перебігу при наявності тяжкої соматичної патології у вигляді гіпертонічної хвороби, нейроциркуляторної дистонії за гіпертонічним типом, при наявності супутніх захворювань нирок і печінки [294-295].

Отже, наведені дані свідчать про наступні тенденції в дослідженнях впливу переривчастої гіпоксичної гіпоксії на організм:

а) гіпоксія різних типів відіграє ключову роль майже у всіх звичайних патологіях і їх ускладненнях;

б) гіпоксія стимулює нейрогенез і необхідна для нормального розвитку нервової системи, проте надмірна гіпоксія призводить до травм мозку і патологічного розвитку різних органів;

в) попередні кондиціонування та адаптація до гіпоксії запобігає клінічним ускладненням перебігу чисельних соматичних хвороб та може бути запобігачим саногенним захистом щодо їх появи в майбутньому.

Очевидна тенденція щодо використання переривчастої гіпоксичної гіпоксії як ефективного механізму адаптації із саногеним впливом на організм. Однак метод переривчастих гіпоксичних тренувань і досі потребує проведення більш ретельних експериментальних і клінічних досліджень. Розуміючи важливість встановлення ролі нейроендокринних механізмів мозку у процесі адаптації до гіпоксичної гіпоксії та враховуючи недостатню кількість фундаментальних досліджень з цієї наукової проблеми [29, 37-38, 55-56, 68, 71-74, 268], питання щодо з'ясування механізмів участі вазопресинергічної системи гіпоталамуса в нейроендокринній відповіді мозку на багатоденну переривчасту дію гіпобаричної гіпоксичної гіпоксії та особливості відновлення морфофункціонального стану вазопресинергічних нейронів у постгіпоксичний період слід вважати актуальною науковою задачею, що потребує свого вирішення.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Експериментальні тварини та експериментальні групи

Дослідження проведені на 50 щурах (самцях) лінії Вістар масою 250-270 г. Тварини, використані в експериментах, були отримані з розплідника об'єднання ветеринарної медицини ПП «Біомодельсервіс» (м. Київ) та перебували в умовах природного освітлення при температурі повітря 20-25⁰ С, при світловому дні 7:00 – 19:00, з вільним доступом до їжі та води у віварії Запорізького державного медичного університету. Всі дослідження були проведені в осінньо-зимовий період.

Експериментальну частину дослідження виконували в суворій відповідності з національними «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах» (Україна, 2001), узгодженими з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових задач» (Страсбург, 1985) і «Положенням про використання тварин в біомедичних дослідженнях». Уся експериментальна частина була виконана на базі Навчального медико-лабораторного центру Запорізького державного медичного університету, який акредитовано на право проведення вимірювань, що знаходяться у сфері державного метрологічного нагляду (Свідоцтво про атестацію № 039/14 від 25 червня 2014 р., Свідоцтво про технічну компетентність № 033/18 від 26 грудня 2018 р.).

Тварини були поділені на три експериментальні групи: інтактні щури, які служили контролем (n=15), тварини, які піддавалися переривчастому впливу гіпоксичної гіпоксії (n=35), з яких частина (n=15) спостерігалася протягом 10-денного постгіпоксичного періоду.

В останній день експерименту тварин із 18.00 позбавляли їжі і наступного дня з 10.00 виводили з експерименту методом одномоментної декапітації під наркозом (етамінал натрію 40 мг/кг внутрішньочеревно).

2.2 Методика моделювання переривчастої гіпоксичної гіпоксії

Гіпоксичний вплив здійснювали у вентиляльованій барокамері об'ємом 0,5 м³. При цьому тварини щодня в один і той же час доби (з 10 до 16 години) розміщували у барокамері. Режим гіпоксичних впливів був наступним: 1-й день напруга кисню в барокамері відповідала висоті 1 км, на 2-й день – 2 км, на 3-й – 3 км, на 4-й – 4 км, на 5-й – 5 км, на 6-й і в наступні дні – 6 км. Гіпоксичні експозиції здійснювалися у м. Запоріжжя, розташованому на висоті 86 м вище рівня моря з нормальним вмістом кисню близько 21 %. При цьому підйом на висоту 6 км знижував рО₂ у повітрі до 75 мм рт. ст., що дорівнює 9,8% вмісту О₂ при нормальному атмосферному тиску. Рівень висоти контролювався за допомогою альтиметра. Цикл гіпоксичних впливів на висоті 6 км здійснювався протягом 10 днів. Подібна тривалість тренувань була обрана з урахуванням експериментальних даних, отриманих у дослідженнях співробітників кафедри патологічної фізіології під керівництвом професора Ю. М. Колесника, в яких було показано значне збільшення загальної резистентності у щурів під впливом гіпоксичних тренувань, і встановлено стимулюючий характер впливу дозованої гіпоксії на функціональний стан нейроендокринних утворень гіпоталамуса та її саногенний вплив на ендокринну функцію підшлункової залози за умов експериментального цукрового діабету [33, 37, 55-61, 303].

Таким чином, тривалість гіпоксичних впливів становила 15 днів із наступним 10-денним постгіпоксичним утримуванням експериментальних тварин.

2.3 Методика гістологічної підготовки матеріалу для дослідження гіпоталамуса

Мозок контрольних та експериментальних тварин після декапітації негайно вилучали та цілком занурювали у рідину Карнуа (по 5 з кожної групи) та рідину Буена (мозок решти тварин). Після 20-годинної фіксації при кімнатній температурі мозок промивали у проточній холодній воді протягом

2-3 годин. Наступним етапом проводили зневоднення мозку у висхідних концентраціях етанолу 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 %-1, 100 %-2, розчинах етанол 100 % + хлороформ 2:1, етанол 100 % + хлороформ 1:1, етанол 100 % + хлороформ 1:2, хлороформ, хлороформ + парапласт (MkCormick, США) 1:3 ($T = +37^{\circ}C$), на 1 годину поміщали в рідкий парапласт (MkCormick, США) ($T = +56^{\circ}C$) і потім укладали в парапластові блоки. Парапластові блоки (по 5 блоків із кожної експериментальної групи), фіксовані за Буеном, використовували у методиці виявлення мРНК методом полімеразної ланцюгової реакції. З решти блоків на ротаційному мікротомі Microm-325 (Microm Corp., Німеччина) готували серійні фронтальні зрізи гіпоталамуса товщиною 7 мкм для гістохімічного фарбування на РНК і товщиною 14 мкм для імунофлюоресцентного фарбування із розрахунку по 2 зрізи на окреме скельце. Для цього мозок у мікротомі орієнтували за координатами стереотаксичного атласу мозку щура Paxinos & Watson [304]. Об'єктами для подальших досліджень були серійні зрізи гіпоталамуса з супраоптичними (рис. 2.1) та паравентрикулярними ядрами (рис. 2.2).

2.4. Методика фарбування на РНК та морфометричного і денситометричного аналізу гістологічного матеріалу

Серійні зрізи гіпоталамуса завтовшки 7 мкм депарафінували та регідрували послідовною 5-хвилинною експозицією у о-ксилолі (двічі), низхідних концентраціях етанолу 96 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, та тричі у дистильованій воді. Для визначення вмісту нуклеїнових кислот, переважно РНК, гістологічні зрізи фарбували галоціанін-хромовими галунами за Ейнарсеном протягом 48 годин [305]. На наступному етапі зрізи мозку тричі промивали у дистильованій воді та проводили зневоднення у висхідних концентраціях етанолу 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 %, суміші 100 % етанолу та о-ксилолу (1:1), о-ксилолі (двічі) по 3 хвилини на кожному етапі. Зневоднені зрізи закріплювали в полімерне середовище EUKITT (O.Kindler GmbH, Німеччина) для подальшої світлової мікроскопії.

Дослідження морфометричних та денситометричних характеристик нейронів гіпоталамуса проводили на комп'ютерній системі цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина).

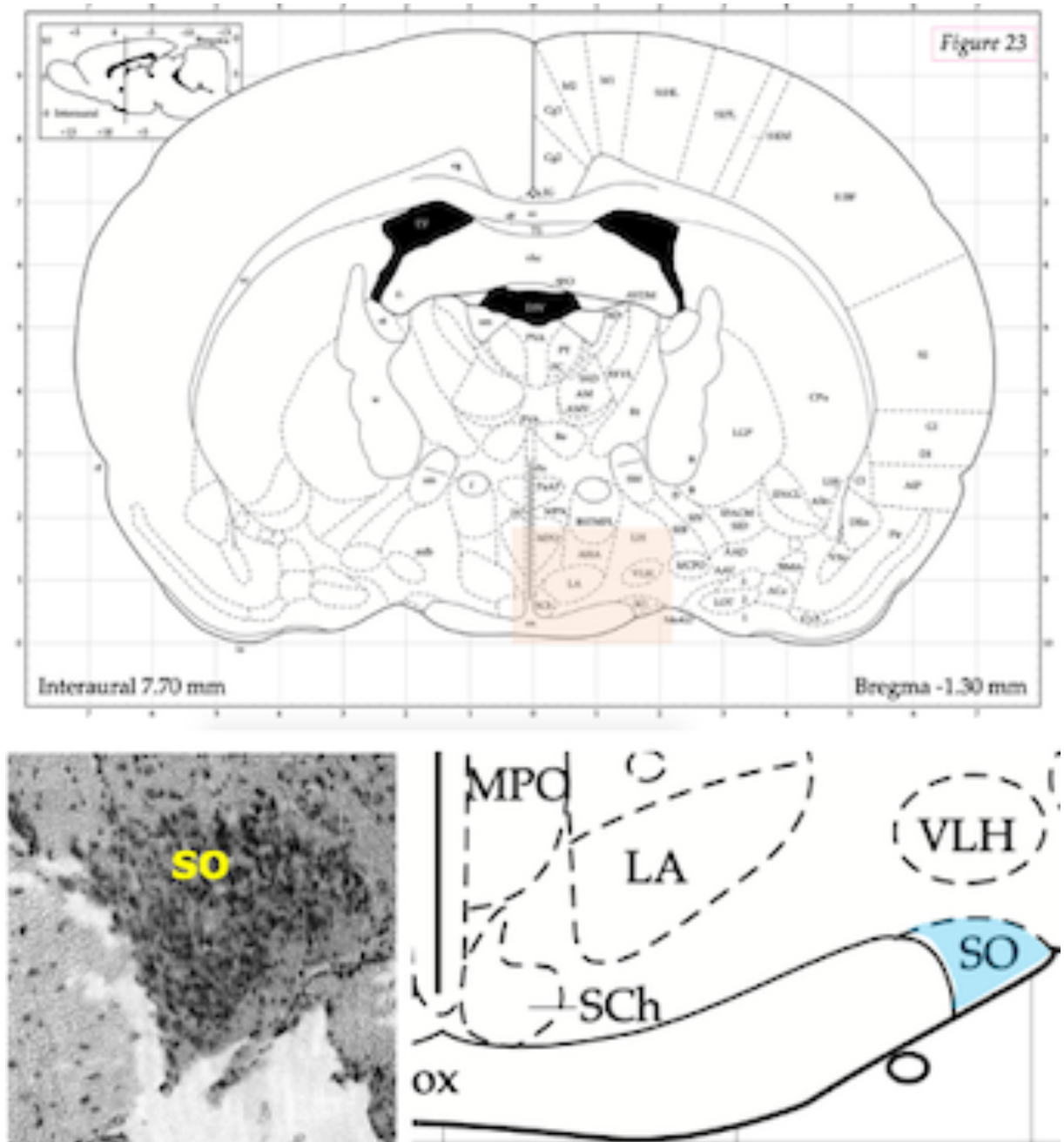


Рисунок 2.1 – Фронтальний зріз гіпоталамуса щура на рівні супраоптичного ядра гіпоталамуса (SO) за координатами атласу Paxinos & Watson [304].

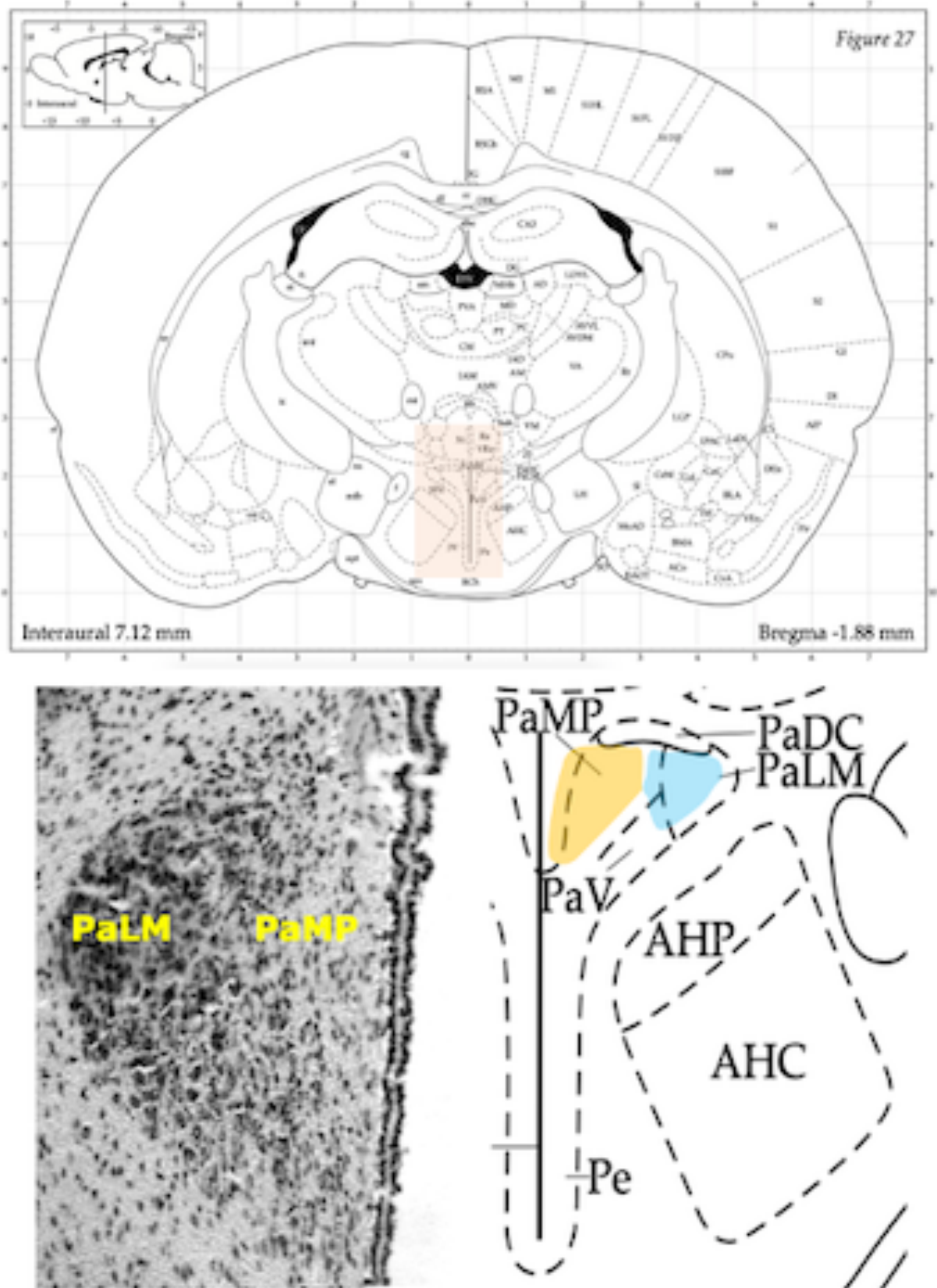


Рисунок 2.2 – Фронтальний зріз гіпоталамуса щура на рівні задньолатерального крупноклітинного суб'ядра (PaLM) та медіального дрібноклітинного суб'ядра (PaMP) паравентрикулярного ядра гіпоталамуса за координатами атласу Paxinos & Watson [304].

Зображення, отримане на мікроскопі Axioskop, за допомогою високочутливої відеокамери COHU-4722 (COHU Inc., США) вводили в комп'ютерну систему цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германія) і оцифровували за денситометричною шкалою з 256 градаціями сірого кольору. Дослідженню підлягали усі серійні зрізи гіпоталамуса із наявністю структур, що вивчалися.

Аналіз гістологічної реакції на РНК проводили у напівавтоматичному режимі: інтерактивно визначали нейрони, які містять ядрце, а в автоматичному режимі обчислювалися морфометричні параметри нейронів – площа (AREA) і еквівалентний діаметр клітин, їх ядер, ядерця і цитоплазми (рис. 2.3). Дослідженню піддавали не менш ніж 200 нейронів у кожній серії. Додатково для кожного нейрона в автоматичному режимі визначали денситометричні характеристики, які були обумовлені рівнем накопичення РНК: абсолютна (GreyCONT) та питома (GreyLOG) оптична густина.

Питома оптична густина відповідала концентрації РНК в об'єкті, що вимірювали, та визначалася за формулою:

$$\text{GreyLOG}_i = |\lg(D_i / D_0)| \text{ (одиниць оптичної густини } O_{OG}), \quad (2.1)$$

де D_i – показник оптичної густини ядра, або цитоплазми, або ядерця;

D_0 – показник оптичної густин міжклітинної речовини (так званий «фон» - неспецифічне забарвлення препарату).

Абсолютна оптична густина відповідала загальному вмісту РНК у об'єкті, що вимірювали, та визначалася за формулою:

$$\text{GreyCONT}_i = \text{AREA}_i * \text{GreyLOG}_i \text{ (одиниць оптичної густини } O_{OG}), \quad (2.2)$$

де AREA_i – площа (мкм^2) ядра, або цитоплазми, або ядерця;

GreyLOG_i – питома оптична густина ядра, або цитоплазми, або ядерця.

Усі зазначені характеристики визначали для кожного нейрона окремо, що дозволяло отримати його унікальну морфогістохімічну характеристику.

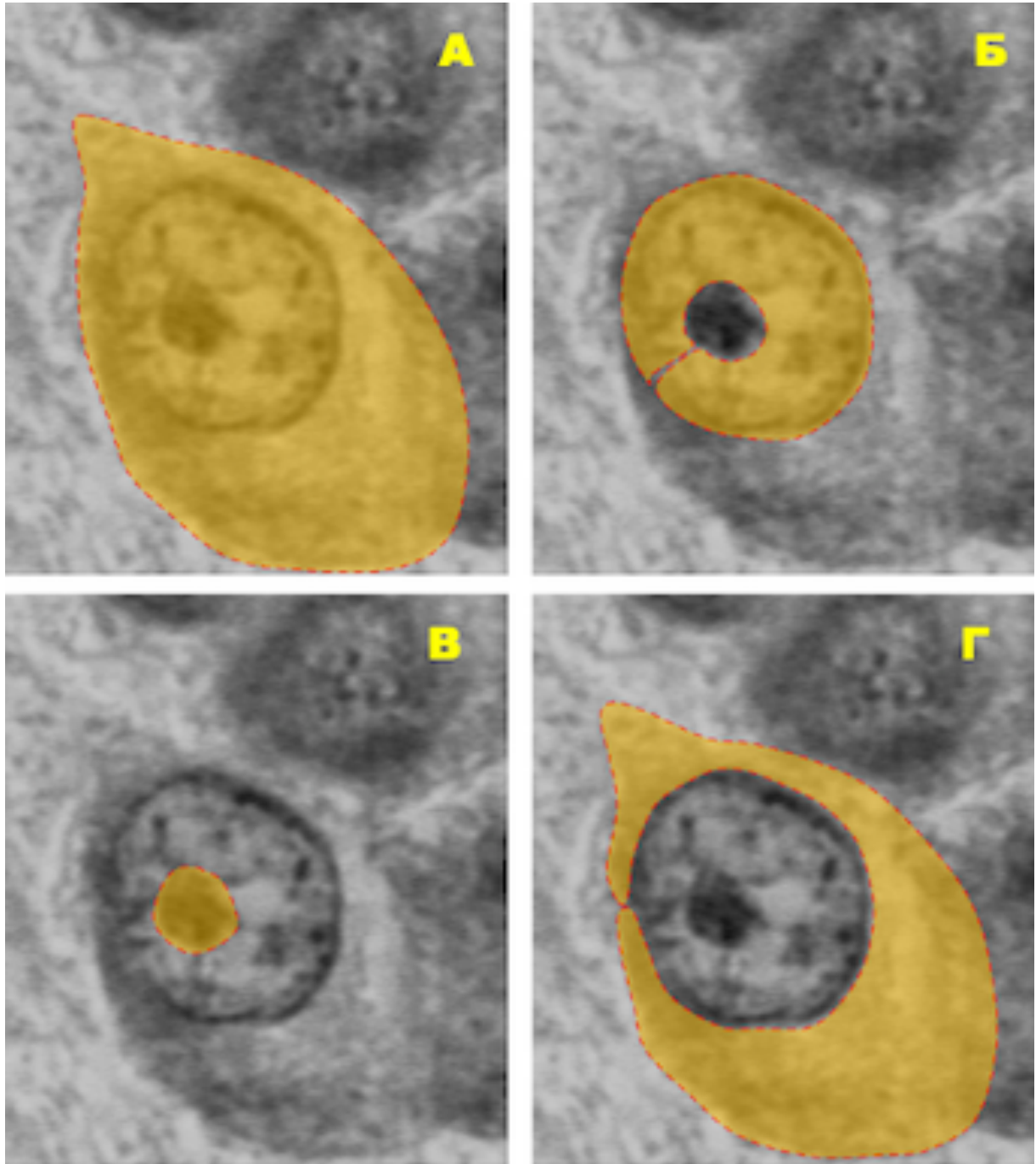


Рисунок 2.3 – Морфометричні та денситометричні параметри нейрона, які обчислювалися: площа нейроцита (А), площа ядра та вміст у ядрі РНК (Б), площа ядерця та вміст у ядерці РНК (В), площа цитоплазми та вміст у цитоплазмі РНК (Г).

2.5 Методика імуофлюоресцентного забарвлення та кількісний аналіз імуофлюоресцентної реакції

Серійні зрізи гіпоталамуса завтовшки 14 мкм занурювали у цитратний буферний розчин із рН=6,0 (Thermo Scientific, США) і піддавали процедурі депарафінування та демаскування в РТ-модулі (Thermo Scientific, США) у режимі нагрівання до 96°C (приблизно 20-25 хв.), з наступною 5-хвилинною експозицією та зниженням температури до 60°C, після чого депарафіновані зрізи двічі на 10 хвилин занурювали у підігрітий (Т=50°C) фосфатний буферний розчин із рН=7,4 (Sigma Chemical, США).

Для імуофлюоресцентного забарвлення в якості первинних антитіл використовували моноклональні антитіла (IgG) до вазопресину (sc-390723), білків cFos (sc-271243), HIF-1 α (sc-53546) і HIF-3 α (sc-390769) виробництва Santa Cruz Biotechnology (США), робочий розчин яких у фосфатному буфері (рН=7,4) доводили до співвідношення 1:200. На кожне наступне серійне скельце з депарафінованими гістологічними зрізами гіпоталамуса наносили окремі первинні антитіла у кількості 150 мкл на кожній зріз. Скельця з нанесеними первинними антитілами тримали в вологій інкубаційній камері при Т= +4° С протягом 20 годин, після чого тричі по 10 хвилин відмивали від надлишку антитіл у фосфатному буфері (рН=7,4).

В якості вторинних антитіл використовували мишачий IgG-каппа-зв'язуючий протеїн (sc-516140), кон'югований із FITC, виробництва Santa Cruz Biotechnology (США), робочий розчин якого у фосфатному буфері (рН=7,4) доводили до співвідношення 1:64. На кожний гістологічний зріз наносили 200 мкл вторинних антитіл та протягом 45 хвилин інкубували при Т=+36°C у термостаті. Після інкубації зрізи тричі відмивали у фосфатному буфері (рН=7,4), додавали 300 мкл суміші гліцерин/фосфатний буфер (9:1) на скельце зі зрізами і накривали покривним скельцем для подальшої мікроскопії.

Контроль специфічності зв'язування антитіл проводили аналогічним чином, за винятком інкубації з первинними антитілами.

Вивчення та аналіз зрізів проводили на флюоресцентному мікроскопі AxioImager M2 (Carl Zeiss, Німеччина) за допомогою 16-бітної монохромної відеокамери AxioCam-HRm (Carl Zeiss, Німеччина), із застосуванням високоемісійного світлофільтру 38HE (Carl Zeiss, Германия) з довжиною хвилі збудження $\lambda_{ex}=470/40$ нм та довжиною хвилі емісії $\lambda_{em}=525/50$ нм. Зображення, що отримували за допомогою відеокамери, записували у вигляді комп'ютерного файлу. При цьому уникали ефекту «вигорання» препарату, пов'язаного з поступовим руйнуванням молекули FITC під впливом тривалого ультрафіолетового опромінення. Уведене зображення з імунофлюоресценцією оцифровували за денситометричною шкалою з 256 градаціями сірого кольору. Аналіз зображення здійснювався в автоматичному режимі за допомогою пакету прикладних програм AxioVision 4.8.2 (Carl Zeiss, Німеччина).

При аналізі імунофлюоресцентної картини в автоматичному режимі виділялися зони зі статистично значущою флюоресценцією, яка відповідала скупченню імунопозитивного матеріалу в перикаріоні нейрона (рис. 2.4, жовтий трейсер) або в аксонах нейрона (рис. 2.4, червоний трейсер).

Дослідженню піддавали не менш ніж 200 стандартних полів у зоні гіпоталамічного ядра/суб'ядра в кожній експериментальній серії.

Кількісними параметрами аналізу імунофлюоресцентної картини були наступні показники:

1) абсолютна площа імунореактивного матеріалу (мкм^2) в перикаріоні окремих нейронів (NeuArea);

2) відносна площа імунореактивності в структурі гіпоталамуса (%), яка відповідала частці сумарної площі імунореактивного матеріалу в перикаріоні усіх нейронів у стандартному полі, яке є частиною гіпоталамічного ядра/суб'ядра, із загальною площею близько $40\,000\ \text{мкм}^2$ (AreaFrame);

3) концентрація імунореактивного матеріалу (в умовних одиницях імунофлюоресценції – O_{IF}) в перикаріоні окремих нейронів (NeuFluor), яка визначалася за формулою:

$$\text{NeuFluor}_i = |\lg(F_i / F_0)| (O_{I\Phi}), \quad (2.3)$$

де F_i – середній показник інтенсивності імуофлюоресценції імунореактивного матеріалу в перикаріоні окремого нейрону,

F_0 – середній показник неспецифічної імуофлюоресценції міжклітинної речовини – так званий «фон»;

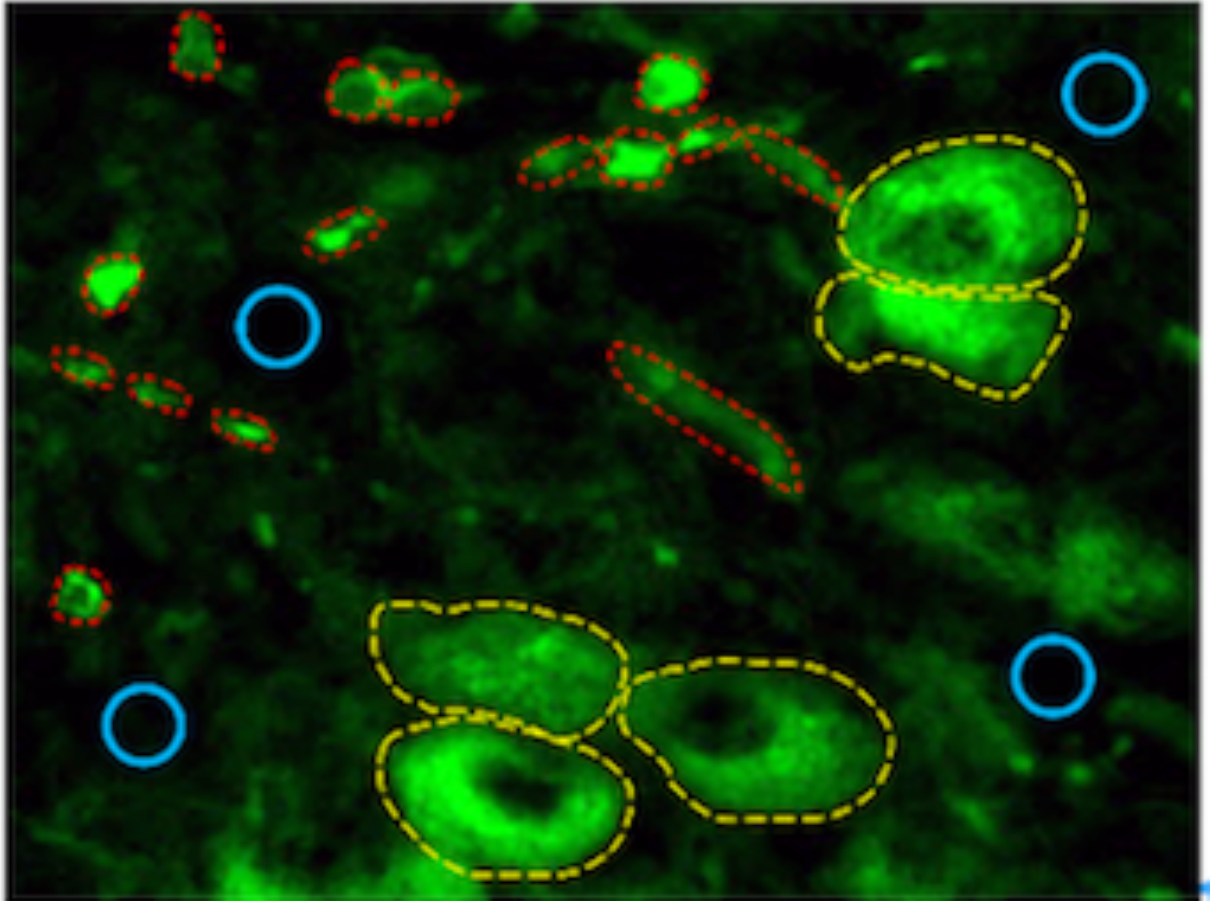


Рисунок 2.4 – Результати автоматичної інтерпретації імуофлюоресцентного забарвлення аналізу за допомогою пакету прикладних програм аналізу зображення AxioVision 4.8.2: статистично значуще скупчення імуопозитивного матеріалу в перикаріоні нейронів (жовтий трейсер), в аксонах нейронів (червоний трейсер) та зоні неспецифічної флюоресценції (сине коло).

4) загальний уміст імунореактивного матеріалу (в умовних одиницях імуофлюоресценції – $O_{I\Phi}$) в перикаріоні окремих нейронів (NeuFluorCont), яка визначалася за даними попередніх вимірювань за формулою:

$$\text{NeuFluorCont}_i = \text{NeuArea}_i * \text{NeuFluor}_i (O_{I\Phi}); \quad (2.4)$$

5) відносний вміст нейронального імунореактивного матеріалу (в умовних одиницях імунофлюоресценції – $O_{I\Phi}$) в структурі гіпоталамуса, який відповідав сумарному вмісту імунореактивного матеріалу в усіх нейронах у стандартному полі, яке є часткою гіпоталамічного ядра/суб'ядра, із загальною площею близько 40 000 μm^2 (AreaFrame);

6) сумарна площа імунореактивного матеріалу (μm^2) в аксонах нейронів (AxArea);

7) відносна площа імунореактивності (%) в аксонах нейронів в зоні гіпоталамічного ядра/суб'ядра, яка відповідала частці сумарної площі імунореактивного матеріалу в аксонах нейронів AxArea в стандартному полі із загальною площею близько 40 000 μm^2 (AreaFrame);

8) концентрація імунореактивного матеріалу (в умовних одиницях імунофлюоресценції – $O_{I\Phi}$) в аксонах нейронів (AxFluor), яка визначалася за формулою:

$$\text{AxFluor}_i = |\lg(F_i / F_0)| (O_{I\Phi}), \quad (2.5)$$

де F_i – середній показник інтенсивності імунофлюоресценції окремого скупчення імунореактивного матеріалу в аксонах,

F_0 – середній показник неспецифічної імунофлюоресценції міжклітинної речовини – так званий «фон»;

9) загальний вміст імунореактивного матеріалу (в умовних одиницях імунофлюоресценції – $O_{I\Phi}$) в аксонах нейронів (AxFluorCont) в зоні гіпоталамічного ядра/суб'ядра, яка визначалася за даними попередніх вимірювань за формулою:

$$\text{AxFluorCont}_i = \text{AxArea}_i * \text{AxFluor}_i (O_{I\Phi}); \quad (2.6)$$

10) відносний вміст аксонального імунореактивного матеріалу (в умовних одиницях імунофлюоресценції – $O_{I\Phi}$) в структурі гіпоталамуса, який відповідав загальному вмісту імунореактивного матеріалу в аксонах у стандартному полі, яке є частиною гіпоталамічного ядра/суб'ядра, із загальною площею близько 40 000 μm^2 (AreaFrame);

11) сумарний вміст імунореактивного матеріалу (в умовних одиницях імунофлюоресценції – O_{IF}) в ядрі або суб'ядрі гіпоталамуса, як сума показників відносного вмісту імунореактивного матеріалу, пов'язаного з нейронами та їх аксонами.

Усі зазначені параметри в сукупності дозволяли отримати унікальну характеристику синтезу та розподілу специфічного імунореактивного матеріалу в гіпоталамічному ядрі або суб'ядрі.

2.6 Методика полімеразної ланцюгової реакції та її кількісний аналіз

Для аналізу експресії генів використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР). Об'єктом дослідження в експериментальних тварин були фрагменти гіпоталамуса, залиті у парафінові блоки. Приготування зразка гіпоталамуса для проведення ЗТ-ПЛР здійснювали у три етапи.

На першому етапі проводили депарафінізацію тканини гіпоталамуса, для чого парафіновий блок подрібнювали у ступці в 1 мл 100 % о-ксилолу, вносили отриманий гомогенат у пробірку «Eppendorf» (Axugen, США) і інкубували протягом 5 хв. Після перемішування на міні-вортексі FV-2400 (США) протягом 1 хвилини гомогенат центрифугували для осадження тканини та обережно вилучали ксилол. До осаду додавали 1 мл 100 % о-ксилолу та інкубували протягом 5 хв. Після перемішування на вортексі гомогенат нагрівали протягом 3 хв. при $T=+50^{\circ}\text{C}$ для розплавлювання парафіну. Далі зразок центрифугували протягом 2 хв. при кімнатній температурі та видаляли ксилол, не порушуючи осаду. Далі тричі проводили процедуру вилучення з гомогенату залишків о-ксилолу, додаючи на кожному етапі 1 мл 100 %, 96 % та 70 % етанолу, відповідно, перемішуючи суміш на вортексі протягом 5 хвилин, центрифугуючи протягом 2 хвилин при 14000 об/хв для осадження тканини, та обережно видаляючи супернатант, не порушуючи осаду. Отриманий осад мозкової тканини висушували в

роторному випарнику ТОМУ-120С (США) протягом 15-30 хв для видалення залишку етанолу.

На другому етапі з мозкової тканини виділяли тотальну РНК з використанням набору «Trizol RNA Prep 100» («ИЗОГЕН», Росія). Для цього в пробірці об'ємом 1,5 мл вносили по 100 мкл подрібненої мозкової тканини та додавали 1 мл Trizol reagent, зміст перемішували до утворення гомогенної емульсії та інкубували протягом 5 хвилин при $T=+4^{\circ}\text{C}$. Потім додавали 200 мкл хлороформу, перемішували зміст до утворення гомогенної емульсії та інкубували протягом 5 хвилин при $T=+4^{\circ}\text{C}$. Після центрифугування при 14000 об/хв протягом 5 хвилин для розділення фаз верхню прозору фазу з РНК обережно переносили в стерильну пробірку загальним об'ємом 1,5 мл, не порушуючи пограничну між фазами білу плівку з ДНК та білками. В отриманий зразок додавали рівний об'єм ізопропанолу (приблизно 600 мкл), інтенсивно перемішували зміст пробірок та поміщали пробірки в морозильну камеру ($T=-20^{\circ}\text{C}$) на 30 хв. Після наступного центрифугування протягом 15 хвилин при 14000 об/хв з пробірки повністю видаляли супернатант шляхом перевертання пробірки, що оберігало зразок від втрати РНК. У пробірку з осадом додавали 1 мл холодного 75 % етанолу, перемішували зміст пробірки центрифугували протягом 5 хвилин при 14000 об/хв, вилучали супернатант перевертанням пробірки та просушували осад в роторному випарнику протягом 3 хвилин при $T=+65^{\circ}\text{C}$. До сухого осаду додавали 50-100 мкл реагенту ExtraGene E, та двічі суспендували зміст на вортексі протягом 15-20 с при кімнатній температурі з перервою на 15-20 хв.

На третьому етапі здійснювалася зворотна транскрипція (синтез кДНК) за допомогою набору «Набор реагентов для проведения обратной транскрипции (ОТ)» («СИНТОЛ», Росія) згідно протоколу до набору. Для цього для кожного зразка готували реакційну суміш в пробірці на льоду у складі: 2 мкл тотальної РНК, 1 мкл праймеру Random-6, 11 мкл деіонізованої води, вільної від нуклеаз. У пробірку зі зразком додавали 25 мкл реакційної суміші та 1 мкл зворотної транскриптази MMLV-RT. Суміш

перемішували та інкубували протягом 45 хвилин при $T=+45^{\circ}\text{C}$ в термостаті. По закінченні зупиняли реакцію прогріванням протягом 5 хвилин при $T=+92^{\circ}\text{C}$, після чого переносили пробірки на лід.

Визначення рівня експресії генів *HIF-1 α* і *HIF-3 α* та проведення полімеразно-ланцюгової реакції в режимі реального часу здійснювали на ампліфікаторі CFX96 Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad, США) з використанням набору Maxima SYBR Green / ROX qPCR MasterMix (2x) (Thermo Scientific, США). Специфічні пари праймерів для аналізу досліджуваних і референсного генів були підібрані за допомогою програмного забезпечення Primer-BLAST (NIH, США) та виготовлені фірмою Metabion (Німеччина) (табл. 2.1). В якості референс-гену для визначення відносного значення зміни рівня експресії досліджуваних генів був використаний ген глицеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (GAPDH).

Таблиця 2.1 - Специфічні праймери використані в ЗТ-ПЛР в режимі реального часу

Ген	Нуклеотидна послідовність праймера	$T_{\text{пл}}$, $^{\circ}\text{C}$	Довжина продукту, нуклеотидів
<i>HIF-1α</i>	F = GGC GAG AAC GAG AAG AAA AAT AGG	62	24
	R = TCG ACG TTC GGA ACT CAT CC	62	20
<i>HIF-3α</i>	F = CAC GCT TTG GAC TCT GAT GC	59	20
	R = GCT CAG CAA AGT GTG GAT GC	60	20
<i>Gapdh</i>	F = GCC TGG AGA AAC CTG CCA AG	61	20
	R = GCC TGC TTC ACC ACC TTC T	59	19

Примітка. *HIF-1 α* — hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit; *HIF-3 α* — hypoxia-inducible factor 3, alpha subunit; *Gapdh* — glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; F — прямий праймер; R — зворотний праймер; $T_{\text{пл}}$ — температура плавлення.

Приготування реакційної суміші проводили згідно протоколу набору: додавали на одну пробірку 12,5 мкл Maxima SYBR Green / ROX qPCR Master

Міх (2x) та суміш прямого і зворотного праймерів по 0,3 мкМ кожного. Після ретельного перемішування суміші її розподіляли у відповідних обсягах у пробірки для ПЛР. Додавали кДНК (≤ 500 нг/реакція) та доводили об'єм суміші до 25 мкл додаванням деіонізованої води. Реакційну суміш ретельно перемішували без утворення бульбашок, які заважають детекції флюоресценції. Зразки розміщували в ампліфікаторі і запускали програму за протоколом процедур: ініціююча денатурація 95 °С – 10 хв; далі 50 циклів: денатурація – 95 °С, 15 с; віджиг праймерів – 55-64 °С, 30 с; елонгація — 72 °С, 30 с. Реєстрація інтенсивності флюоресценції відбувалася автоматично наприкінці стадії елонгації кожного циклу по каналу SybrGreen.

Для вираження відносного рівня експресії генів використовували порівняльний Ct метод ($\Delta\Delta Ct$ метод) [306]. Розрахунки проводили за формулами: ΔCt (гена-мішені) = Ct (гена-мішені) – Ct (гена-калібратора / АСТ1); $\Delta\Delta Ct$ = ΔCt (гена-мішені) – ΔCt (базисного гена). Відносний рівень експресії виражали в $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Статистичний аналіз даних ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ (Bio-Rad, США). Підібрано оптимальні умови ЗТ-ПЛР для досягнення лінійної залежності між числом циклів і кількістю продуктів ПЛР. Усі реакції ампліфікації повторювали тричі.

2.7 Методи статистичного аналізу експериментальних даних

Математичний аналіз і статистичну обробку даних (перевірка гіпотези на нормальність розподілу, статистичне оцінювання і визначення критеріїв достовірності відмінностей між порівнюваними вибірками) проводили за допомогою програмного пакета EXCEL 2003 (Microsoft Corp., США) з інтегрованою програмною надбудовою AtteStat [307] і за допомогою програми статистичного аналізу «STATISTICA» (StatSoft Inc., США, ліцензія №АХХR712D833214FAN5). Гіпотезу про нормальність розподілу експериментальних даних перевіряли критерієм Шапіро-Уілкі (Shapiro-Wilk test). Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної

вибірки (M), її дисперсії і помилки середньої (m). Для виявлення достовірності відмінностей результатів досліджень у експериментальних і контрольних групах щурів визначали коефіцієнт Ст'юдента (t), після чого визначали ймовірність відмінності вибірок (p) і довірчий інтервал середньої за таблицями розподілу Ст'юдента. Достовірними вважали значення, для яких $p < 0,05$. Статистичні данні у таблицях представляли у вигляді середньої арифметичної та її помилки $M \pm m$, а у графіках на рисунках у вигляді середньої арифметичної та її довірчого інтервалу, який розраховувався як множина помилки середньої (m) та коефіцієнту Ст'юдента (t) для $p = 0,05$ відповідно кількості спостережень (n), яка дорівнює сумі спостережень у групах порівняння.

РОЗДІЛ 3

ВПЛИВ ПЕРЕРИВЧАСТОЇ ГІПОКСІЇ НА СТАН ВАЗОПРЕСИНЕРГІЧНИХ НЕЙРОНІВ СУПРАОПТИЧНОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСА

Цей розділ містить результати дослідження функціонального стану нейронів супраоптичного ядра гіпоталамуса (СОЯ) у щурів лінії Вістар в нормі, при дії переривчастої гіпоксії та в постгіпоксичний період через 10 діб. Для цього були вивчені морфометричні показники нейронів, їх цитоплазми, ядер і ядерець (вимір їх площі і діаметрів), і денситометричні показники цитоплазми нейронів, їх ядер і ядерець (вимірювання вмісту РНК). Відомо, що СОЯ складається з двох популяцій нейронів, одна з яких синтезує вазопресин, а друга – окситоцин. При цьому на світлооптичному рівні ці популяції нейронів не відрізняються за своїми морфометричними показниками. Тому для оцінки функціонального стану вазопресинергічної системи СОЯ були виміряні показники накопичення вазопресину в нейронах і їх аксонах в експериментальних тварин. Додатковими факторами, які відображають вплив гіпоксичних навантажень на вазопресинергічну систему гіпоталамуса, були вимір накопичення в області СОЯ продуктів активації гена, індукованого гіпоксією: білків HIF-1 α і HIF-3 α , а також гена ранньої активації пептидергічних нейронів – білка cFOS.

3.1 Морфологічні та денситометричні характеристики нейронів супраоптичного ядра гіпоталамуса

СОЯ у контрольних тварин представлені крупноклітинними нейронами і при фарбуванні за Ейнарсоном характеризувалися чіткими контурами цитоплазматичної та ядерної мембрани (рис. 3.1). Ядра клітин містили дрібні зерна хроматину, дифузно розподіленого по нуклеоплазмі, і чітко диференційоване ядерце. Цитоплазма нейронів становила $61,4 \pm 0,8$ % від

площі перікаріона нейронів, а ядро займало $38,6 \pm 0,8$ % площі клітини і відрізнялося на 10,8 % більш високою концентрацією РНК порівняно з цитоплазмою (табл. 3.1). Ядро нейронів СОЯ займало $1,8 \pm 0,2$ % площі клітини і характеризувалося найбільш високою концентрацією РНК, величина якої більш ніж в 4 рази перевищувала даний показник в цитоплазмі клітин. По периферії нейронів СОЯ розташовувалися гліальні клітини, які характеризувалися значно меншими розмірами ядер, не містили ядерця, і мали слабо забарвлену цитоплазму.

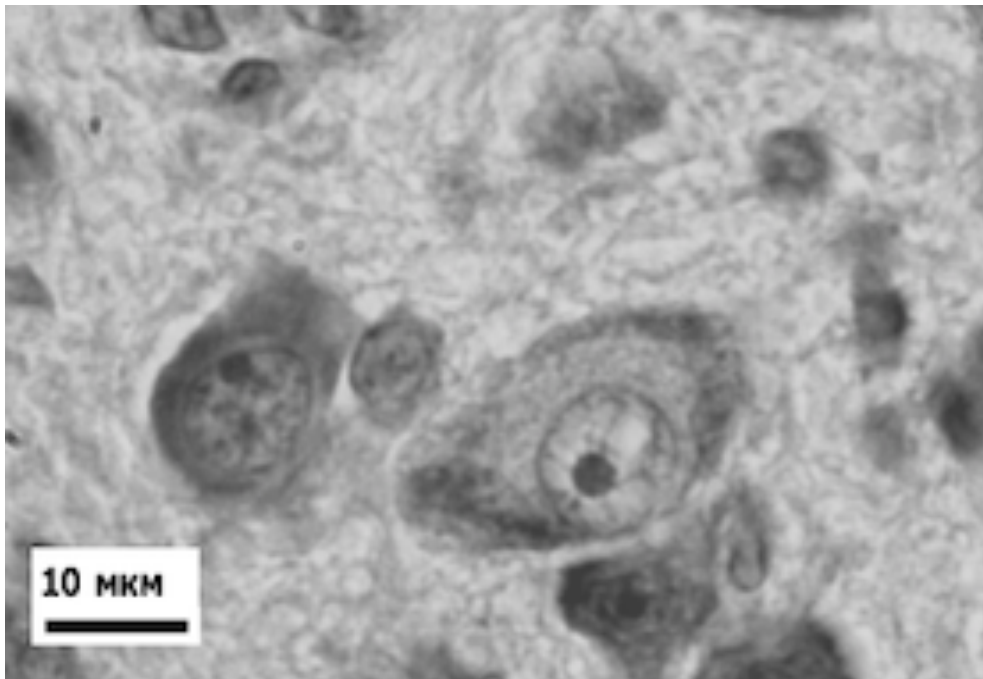


Рисунок 3.1 - Нейрони супраоптичного ядра гіпоталамуса в нормі.
Забарвлення за Ейнарсеном.

Гіпоксичні тренування призводили до збільшення розмірів нейронів СОЯ на $13,3 \pm 2,0$ % ($p < 0,001$), головним чином – за рахунок збільшення площі цитоплазми нейронів на $30,7 \pm 3,1$ % ($p < 0,001$). Цитоплазма нейронів блідо фарбувалася, що обумовлено розпадом базofilної речовини внаслідок зникнення РНК і протеїнів цитоплазми. Поширений протеоліз білків супроводжувався набуханням зі збільшенням розмірів цитоплазми нервової клітини. Остання набувала округлої форми. При світловій мікроскопії

відзначалася вакуолізація цитоплазми. У клітинах відзначався різного ступеня вираженості пікноз ядра, яке зменшувалося в розмірах, характеризувалося нерівними фестончастими контурами і містило грудочки хроматину з ознаками конденсації (рис. 3.2). Чіткі контури ядра стиралися, згодом ставали розмитими.

Таблиця 3.1 - Морфометричні і денситометричні характеристики нейронів супраоптичного ядра гіпоталамуса ($M \pm m$)

Характеристики	Контроль	Гіпоксичні впливи (15 днів)	Постгіпоксичний період (10 днів)
	1	2	3
Площа нейронів, мкм^2	177,25 \pm 4,38 ^{2,3}	200,84 \pm 3,60 ^{1,3}	216,01 \pm 3,75 ^{1,2}
Площа цитоплазми, мкм^2	111,05 \pm 3,89 ^{2,3}	145,17 \pm 3,43 ¹	145,72 \pm 3,36 ¹
Вміст РНК в цитоплазмі, Оог	19,86 \pm 0,90 ^{2,3}	9,01 \pm 0,39 ^{1,3}	10,52 \pm 0,37 ^{1,2}
Площа ядра, мкм^2	66,21 \pm 1,09 ^{2,3}	55,66 \pm 0,83 ^{1,3}	72,36 \pm 1,85 ^{1,2}
Вміст РНК в ядрі, Оог	13,27 \pm 0,45 ^{2,3}	5,32 \pm 0,16 ^{1,3}	7,20 \pm 0,21 ^{1,2}
Площа ядерця, мкм^2	2,91 \pm 0,21 ^{2,3}	4,85 \pm 0,07 ^{1,3}	3,63 \pm 0,16 ^{1,2}
Вміст РНК в ядерці, Оог	2,30 \pm 0,17 ^{2,3}	0,73 \pm 0,02 ¹	0,80 \pm 0,04 ¹
Ядерно-цитоплазматичний коефіцієнт	0,386 \pm 0,008 ^{2,3}	0,286 \pm 0,006 ^{1,3}	0,341 \pm 0,007 ^{1,2}

Примітка. Достовірність відмінностей $p < 0,05$ відносно показників контролю (¹), гіпоксичних тренувань (²), постгіпоксичного періоду (³).

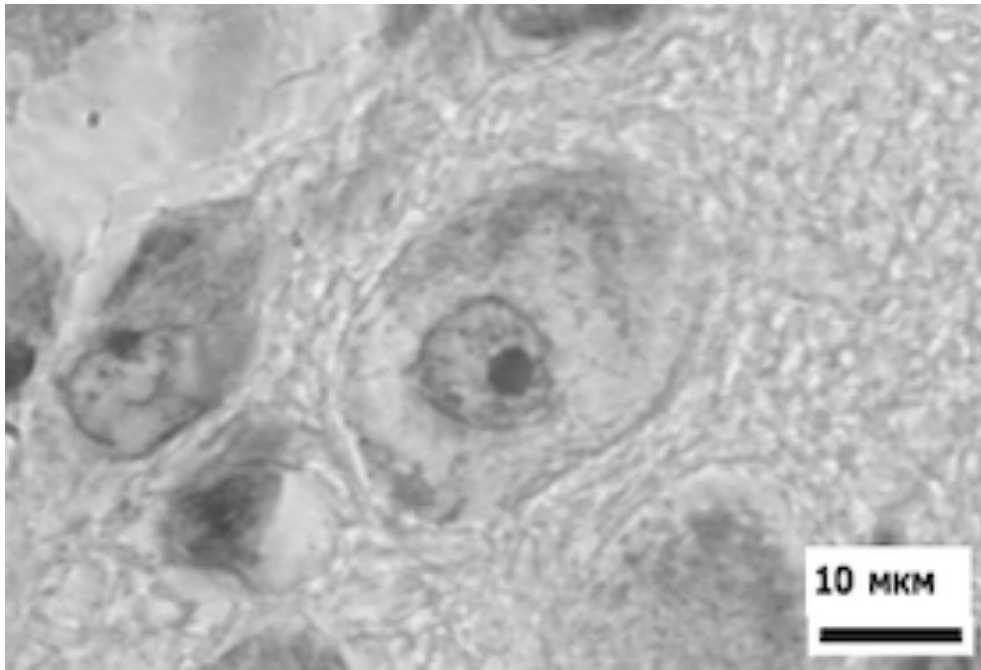


Рисунок 3.2 - Нейрони супраоптичного ядра гіпоталамуса після циклу гіпоксичних впливів. Забарвлення за Ейнарсеном.

Збільшення розмірів нейронів і їх цитоплазми супроводжувалося зменшенням вмісту РНК в цитоплазмі на $54,6 \pm 2,0$ % ($p < 0,001$) і зменшенням даного показника в ядрі нейронів на $60,0 \pm 1,2$ % ($p < 0,05$), що пояснювало особливості морфологічної картини СОЯ при світловій мікроскопії. Гіпоксичні впливи призводили також до зменшення вмісту РНК на $68,3 \pm 0,9$ % ($p < 0,05$) в ядерцях нейронів СОЯ.

Таким чином, зміни в нейронах СОЯ, що відбувалися під впливом переривчастої гіпоксичної гіпоксії, свідчать про дистрофічні зміни в нейроцитах і зниження синтезу в клітинах РНК, як одного з важливих показників активності пластичного обміну в нейронах.

Мікроскопічний аналіз нейронів СОЯ в постгіпоксичному періоді показав морфологічну картину, в значній мірі наближену до контролю (рис. 3.3). Зрідка зустрічалися нейрони з ознаками пікнозу ядра і вакуолізацією цитоплазми. У більшості випадків нейрони мали чіткі контури цитоплазми і ядерної мембрани, ядра містили чітко диференційоване ядерце.

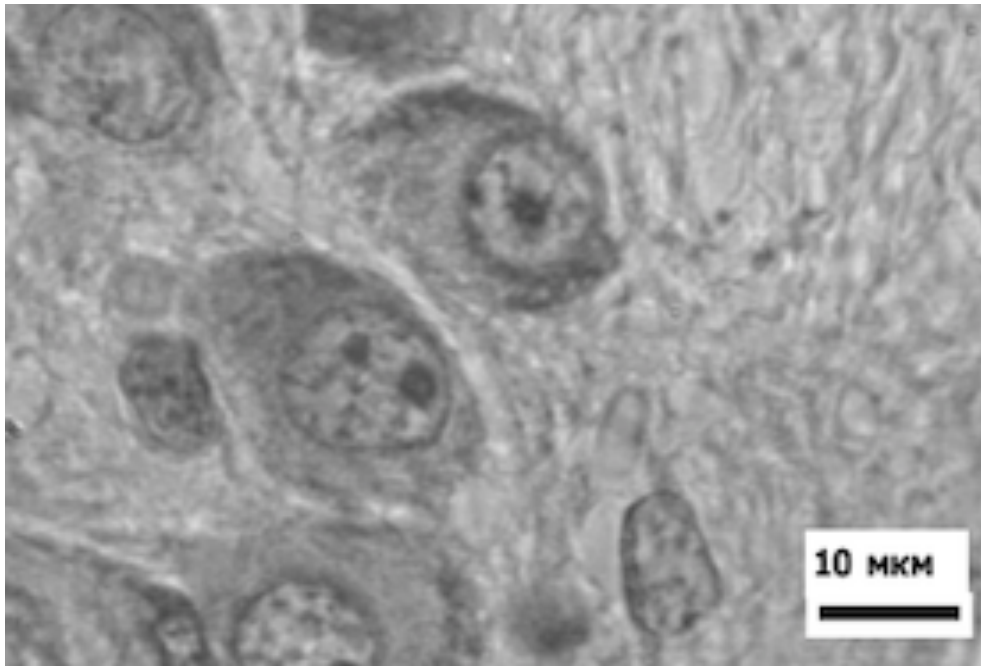


Рисунок 3.3 - Нейрони супраоптичного ядра гіпоталамуса через 10 днів після закінчення циклу гіпоксичних впливів. Забарвлення за Ейнарсоном.

Морфометричний аналіз нейронів СОЯ в постгіпоксичному періоді, а саме через 10 днів після закінчення циклу гіпоксичних впливів, показав, що площа нейронів додатково збільшилася на $7,5 \pm 1,9\%$ ($p < 0,005$), що на $21,9 \pm 2,1\%$ ($p < 0,001$) було вище показників контролю (табл. 3.1, рис. 3.4).

При цьому площа цитоплазми нейронів практично не збільшилася і залишалася на $31,2 \pm 2,3\%$ вищою ($p < 0,001$) показників контролю. Хоча при цьому відзначалося наростання вмісту РНК в цитоплазмі порівняно з періодом закінчення гіпоксичних впливів на $16,7 \pm 4,3\%$ ($p < 0,001$), порівняно з контролем вміст РНК залишався на $47,0 \pm 1,9\%$ нижче ($p < 0,001$).

Постгіпоксичний період характеризувався значним відновленням площі ядер нейронів, показник якої на $9,2 \pm 2,8\%$ перевищував ($p < 0,001$) показники контролю, із частковим відновленням ядерно-цитоплазматичного коефіцієнта. В ядрах нейронів спостерігалось зростання вмісту РНК на $35,4 \pm 3,9\%$ ($p < 0,01$), проте даний показник залишався на $43,7 \pm 1,6\%$ нижчим ($p < 0,001$), ніж у контролі. У постгіпоксичному періоді, порівняно з періодом гіпоксичних

вплив, величина площі ядерця нейронів зменшувалася на $25,2 \pm 3,3\%$ ($p < 0,001$) без статистично значущих змін показника вмісту РНК ($p > 0,05$).

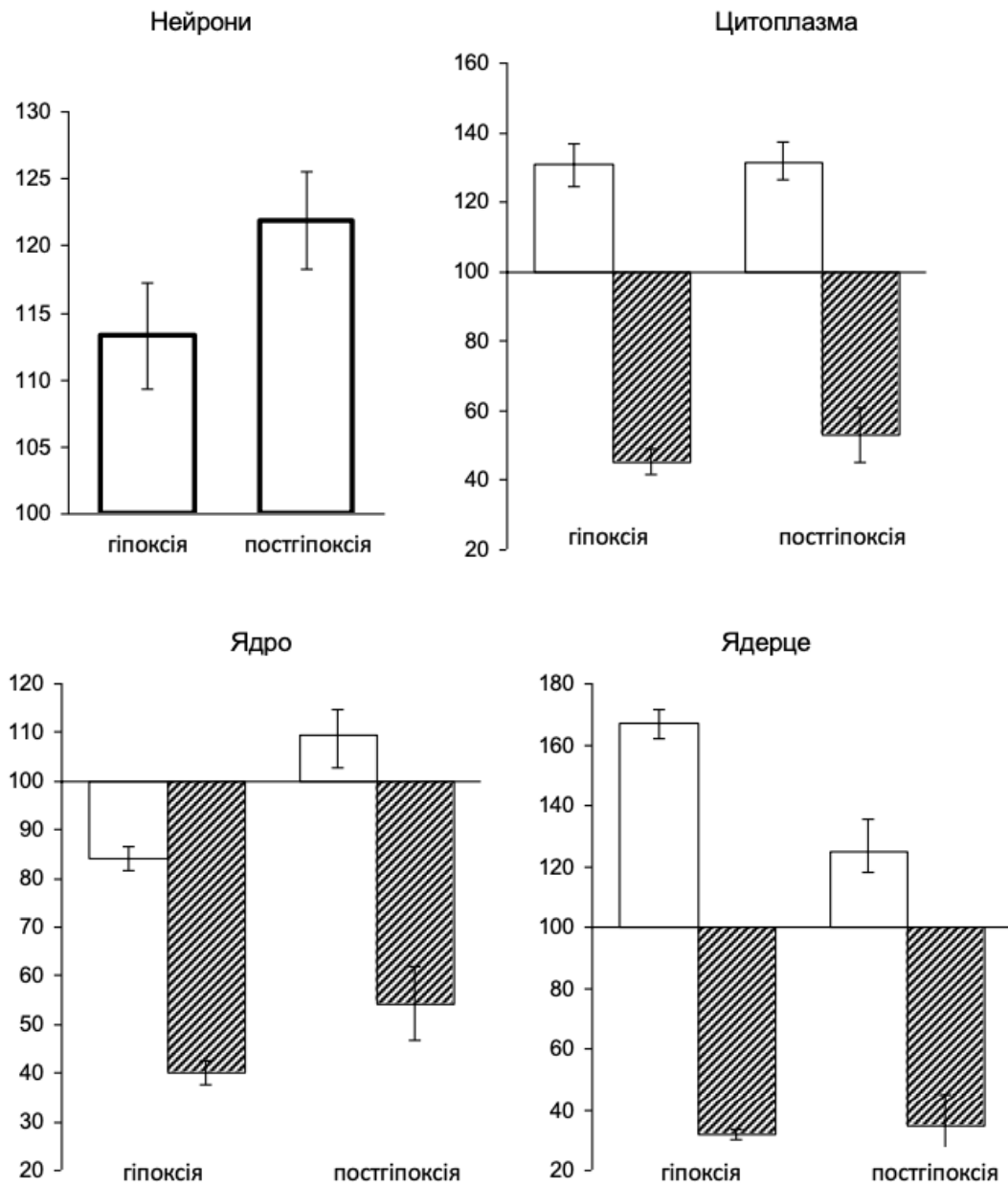


Рисунок 3.4 - Динаміка морфометричних показників нейронів супраоптичного ядра гіпоталамуса в експериментальних тварин (світлі стовпчики – площа, штриховані стовпчики – вміст РНК, показники контролю прийняті за 100%).

Отже, 10-денний постгіпоксичний період характеризувався зменшенням дистрофічних змін у нейроцитах і тенденцією до відновлення морфогістохімічних характеристик нейронів СОЯ.

Таким чином, характер змін морфогістохімічних і денситометричних характеристик нейронів СОЯ у відповідь на дію переривчастої гіпоксичної гіпоксії однозначно демонструє формування дистрофічних змін в нейроцитах, які не зникають і в віддалений 10-денний період після закінчення гіпоксичних впливів.

3.2. Вазопресинергічна система супраоптичного ядра гіпоталамуса

Вазопресин є одним з двох основних нейрогормонів, який синтезується в СОЯ [19, 20]. За допомогою реакції непрямой імунофлюоресценції вазопресинергічні нейрони добре ідентифікуються в ділянці СОЯ не тільки в перикаріоні нейроцитів, а й в аксонах нейронів (рис. 3.5).

Кількісний аналіз імунофлюоресцентної реакції показав, що гіпоксичні впливи призводили до збільшення в нейронах площі матеріалу, імунореактивного до вазопресину, на 11,1 % ($p < 0,001$) (табл. 3.2). При цьому в нейронах спостерігалось зменшення концентрації вазопресину в цитоплазмі на 34,3 %, зниження вмісту нейрогормону в нейроцитах на 26,0 %, що призводило до зменшення загального вмісту вазопресину в СОЯ практично в 2 рази. В аксонах супраоптичних нейронів гіпоксичні впливи стимулювали накопичення нейросекреторного матеріалу, імунореактивного до вазопресину (табл. 3.3). При цьому в аксонах в ділянці СОЯ в 1,6 рази збільшувалася площа імунореактивного матеріалу і на 24,1 % зростав сумарний вміст вазопресину.

Дана обставина свідчить про підвищення секреторної активності вазопресинергічних нейронів СОЯ у відповідь на гіпоксичну стимуляцію. Однак привертає увагу той факт, що приріст на 24 % вмісту вазопресину в аксонах СОЯ не компенсує 2-кратного зниження вмісту самого нейрогормона в нейроцитах (рис. 3.6). Отже, переривчаста дія гіпоксичної гіпоксії

призводить до зниження біосинтезуючих процесів в нейронах СОЯ при збереженні їх секреторної активності.

Таблиця 3.2 - Показники синтезу вазопресину в перикаріоні нейронів супраоптичного ядра гіпоталамуса ($M \pm m$)

Характеристики	Контроль	Гіпоксичні впливи (15 днів)	Постгіпоксичний період (10 днів)
	1	2	3
Площа імунореактивного матеріалу в нейроні, мкм ²	157,1±2,7 ^{2,3}	174,6±2,9 ¹	176,4±3,9 ¹
Площа імунореактивності до вазопресину в СОЯ, %	22,07±2,61	19,61±1,98 ³	25,82±1,85 ²
Концентрація вазопресину в цитоплазмі, O _{IФ}	0,579±0,012 ²	0,380±0,014 ^{1,3}	0,546±0,023 ²
Вміст вазопресину в нейроні, O _{IФ}	90,59±2,49 ²	67,08±2,96 ^{1,3}	94,87±4,39 ²
Вміст вазопресину в СОЯ, O _{IФ}	1234,2±166,8 ²	673,3±69,4 ^{1,3}	1375,4±101,2 ²

Примітка. Достовірність відмінностей $p < 0,05$ по відношенню до показників контролю (¹), гіпоксичних тренувань (²), постгіпоксичного періоду (³).

У постгіпоксичному періоді змін величини площі імунореактивності до вазопресину в нейронах СОЯ не відзначалося. При цьому в нейронах спостерігалось відновлення до параметрів контрольних тварин (які не піддавалися гіпоксичним впливам) концентрації вазопресину в цитоплазмі, вмісту гормону в нейронах і загального вмісту вазопресину в СОЯ.

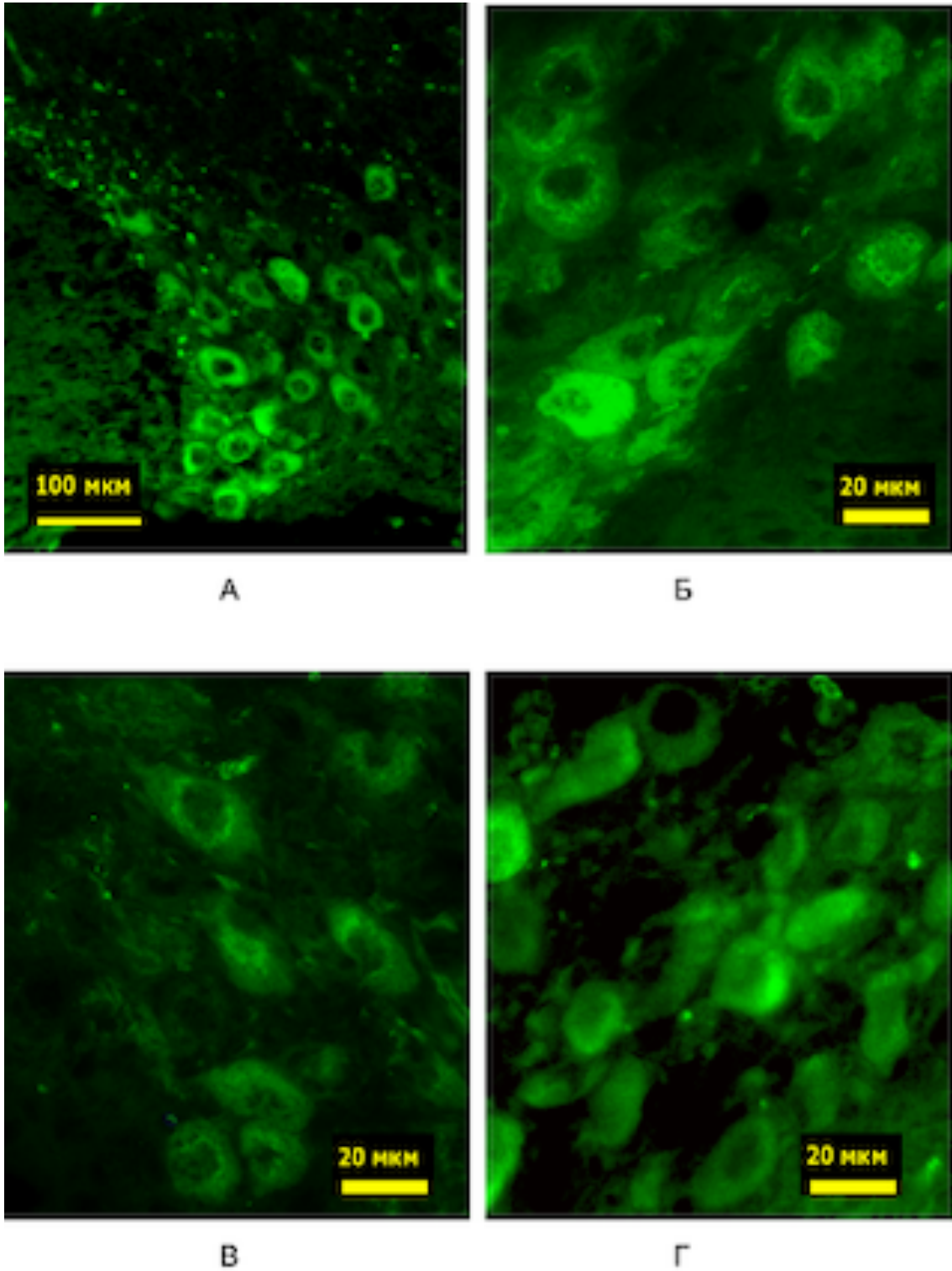


Рисунок 3.5 - Вазопресинергічні нейрони СОЯ у контрольних тварин (А, Б), після 15 днів гіпоксичних впливів (В) і через 10 днів постгіпоксичного періоду (Г). Реакція непрямой імунофлюоресценції з антитілами до [Arg⁸]-вазопресину щура.

Таблиця 3.3 - Показники секреції вазопресину в аксонах нейронів супраоптичного ядра гіпоталамуса ($M \pm m$)

Характеристики	Контроль	Гіпоксичні впливи (15 днів)	Постгіпоксичний період (10 днів)
	1	2	3
Сумарна площа імуно-реактивного матеріалу в аксонах, мкм ²	185,9±10,9 ²	297,6±17,8 ^{1,3}	219,4±14,5 ²
Площа імунореактивності до вазопресину в аксонах СОЯ, %	1,96±0,11 ²	3,13±0,19 ^{1,3}	2,31±0,15 ²
Концентрація вазопресину в аксонах, ОІФ	0,582±0,040 ^{2,3}	0,420±0,021 ¹	0,374±0,037 ¹
Вміст вазопресину в аксонах СОЯ, ОІФ	102,4±6,9	127,1±10,3 ³	86,0±11,2 ²

Примітка. Достовірність відмінностей $p < 0,05$ по відношенню до показників контролю (1), гіпоксичних тренувань (2), постгіпоксичного періоду (3).

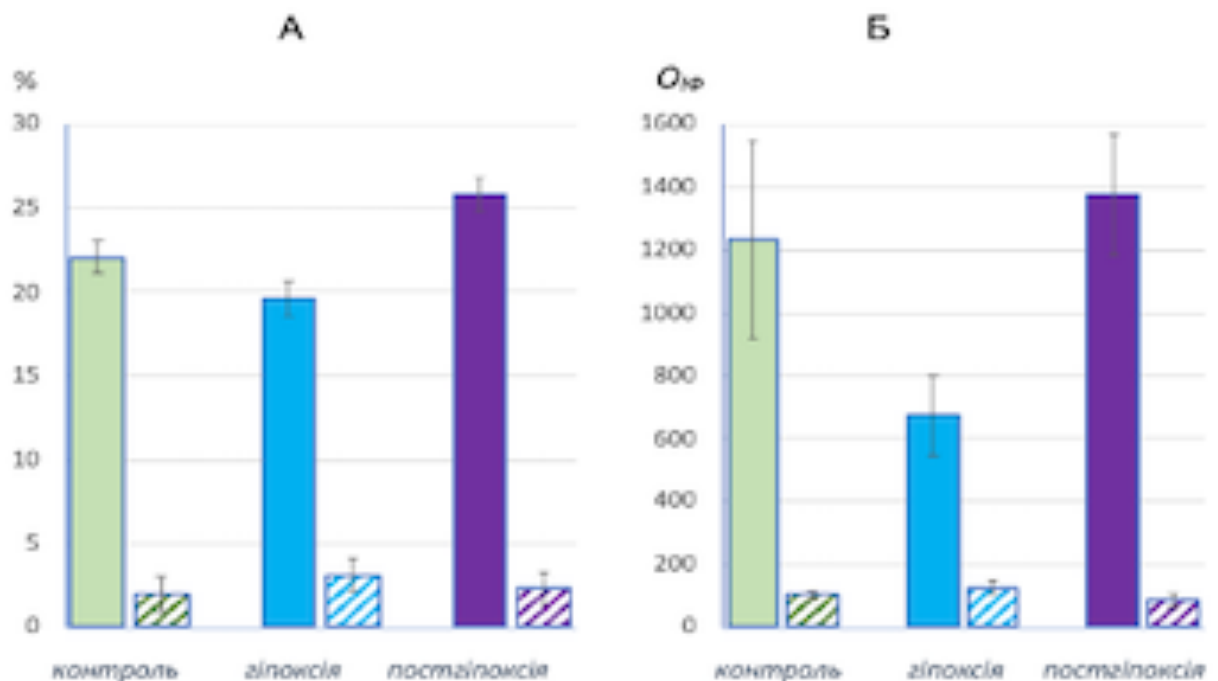


Рисунок 3.6 - Відносна площа імунофлуоресценції (А) і сумарного вмісту вазопресину (Б) в СОЯ, зайнята нейронами (суцільне забарвлення) і аксонами (заштриховане забарвлення).

Ця обставина може свідчити про відновлення процесів біосинтезу вазопресину в супраоптичних нейронах по закінченню 10-денного періоду відсутності гіпоксичних навантажень на організм експериментальних тварин.

Таке ж відновлення параметрів вмісту вазопресину зазначалося в постогіпоксичний період в аксонах нейронів в ділянці СОЯ. Очевидно, що припинення гіпоксичних впливів призводило до відновлення інтенсивності секреції вазопресину з нейронів в аксони і супроводжувалося зменшенням вмісту вазопресину порівняно з гіпоксичним періодом.

3.3. Експресія білка cFos в нейронах супраоптичного ядра гіпоталамуса

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 (*cAMP-responsive element binding protein*) і CREM (*cAMP-responsive element modulator*) [308, 309]. Ще на початку 90-х років 20-го століття було доведено, що білок c-Fos є маркером функціональної активності нейронів [310], а рівень його експресії в нейросекреторних нейронах пов'язаний із підвищенням секреції вазопресину, окситоцину, кортикотропін-рилізинг гормону, дофаміну і ряду інших нейропептидів [311], що визначають ефективність нейроендокринної відповіді на дію чинників навколишнього середовища. При цьому білок c-Fos включає каскад активації внутрішньоклітинних і позаклітинних молекулярних месенджерів, що забезпечують нейрональну пластичність, необхідну для навчання, формування пам'яті і когнітивних функцій [198, 308].

За допомогою реакції непрямой імуофлюоресценції з первинними антитілами до білка cFos і вторинними антитілами, кон'югованими з FITC, в нейронах СОЯ були ідентифіковані зони накопичення білка (рис. 3.7А)

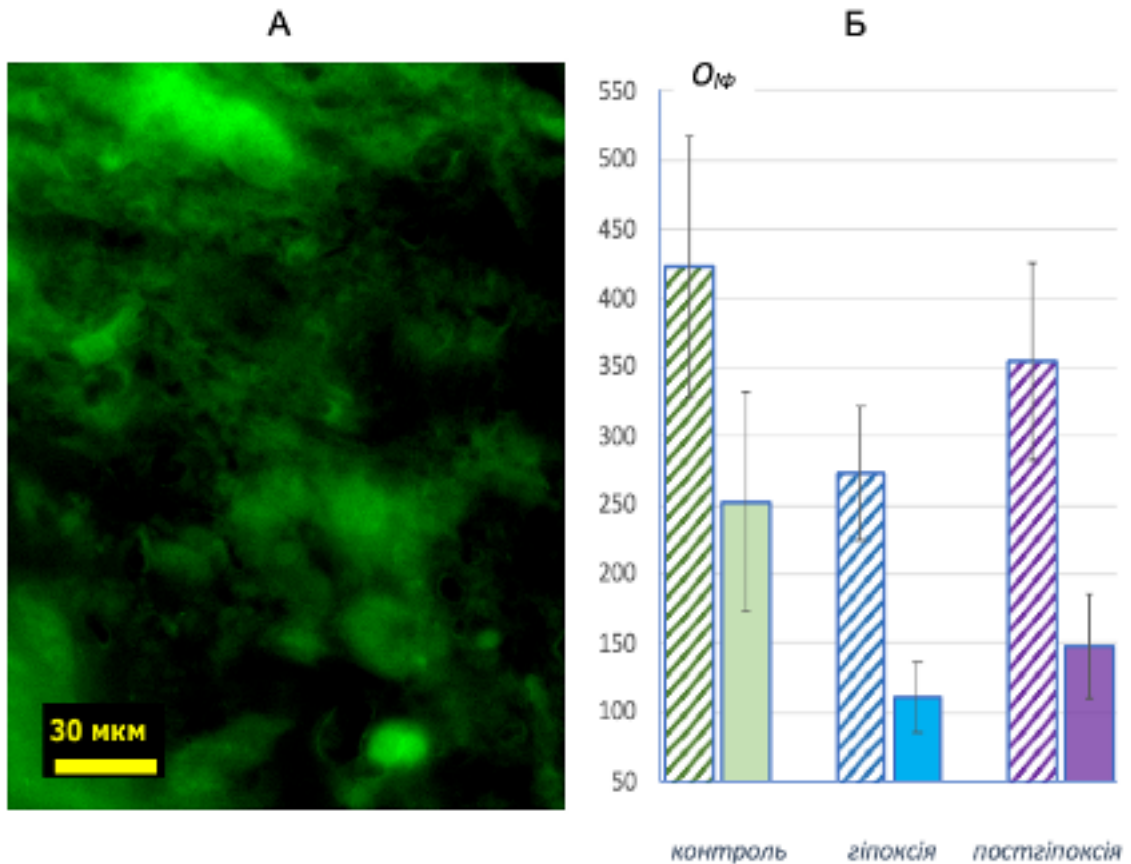


Рисунок 3.7 - Реакція непрямой імуофлюоресценції з антитілами до білка cFos (А), показники площі імунореактивності (мкм², заштриховане забарвлення) і вміст білка cFos (O_{IФ}, суцільне забарвлення) в СОЯ.

Слід зазначити, що в основному імуофлюоресценція до білка cFos носила дифузний характер розподілу в нейронах, хоча зустрічалися поодинокі нейрони з повністю забарвленою цитоплазмою.

Гіпоксичні впливи призводили до скорочення площі імунореактивності до білка cFos в СОЯ на 35,3%, зменшення його концентрації в нейронах на 31,0% і зниження його вмісту в СОЯ у 2,3 рази відносно контролю (табл. 3.4, рис. 7Б).

Виходячи з фізіологічної ролі білка cFos, як індикатора ранньої нейросекреторної відповіді, зміни показників його синтезу в умовах гіпоксичних впливів слід розглядати як істотне пригнічення синтезувальної функції пептидергічних нейронів СОЯ.

Таблиця 3.4 - Показники експресії білка cFos в супраоптичному ядрі гіпоталамуса ($M \pm m$)

Характеристики	Контроль	Гіпоксичні впливи (15 днів)	Постгіпоксичний період (10 днів)
	1	2	3
Сумарна площа імунореактивного матеріалу в СОЯ, мкм^2	422,4 \pm 49,7 ²	273,2 \pm 25,8 ¹	353,9 \pm 37,4
Відносна площа імунореактивності в СОЯ, %	4,67 \pm 0,55 ²	3,02 \pm 0,28 ¹	3,91 \pm 0,41
Концентрація cFos в нейронах, O_{IF}	0,562 \pm 0,044 ^{2,3}	0,380 \pm 0,016 ¹	0,387 \pm 0,019 ¹
Вміст cFos в СОЯ, O_{IF}	252,5 \pm 41,7 ^{2,3}	111,3 \pm 13,6 ¹	148,6 \pm 19,9 ¹

Примітка. Достовірність відмінностей $p < 0,05$ відносно показників контролю (¹), гіпоксичних тренувань (²), постгіпоксичного періоду (³).

По закінченні постгіпоксичного періоду спостерігалось практично повне відновлення показників імунореактивності до білка cFos в СОЯ. Разом із тим, концентрація білка cFos в нейронах змінювалася і залишалася на 30,0 % нижчою, ніж у контролі, як і вміст білка в СОЯ – на 41,1 % менший, ніж у контролі. Отримані дані свідчать, що навіть через 10 днів після

закінчення гіпоксичних впливів, відновлення процесів біосинтезу нейропептидів в СОЯ не відбувається в повній мірі.

3.4 Експресія білків HIF-1 α і HIF-3 α в нейронах супраоптичного ядра гіпоталамуса

Вважається, що реакцією клітин на гіпоксію є підвищення концентрації білків сімейства факторів, індукованих гіпоксією, а саме білків HIF-1 α і HIF-3 α , які у свою чергу, є провідними транскрипційними регуляторами генів ссавців, відповідальних за реакцію на нестачу кисню [231, 312]. Зокрема, білок HIF-1 α змінює експресію генів, що контролюють транспорт глюкози і гліколіз, та забезпечує швидку адаптацію клітин до умов гіпоксії [202, 312-313].

За допомогою реакції непрямої імуофлюоресценції з первинними антитілами до білків HIF і вторинними антитілами, кон'югованими з FITC, в нейронах СОЯ були ідентифіковані зони накопичення білків HIF-1 α і HIF-3 α (рис. 3.8).

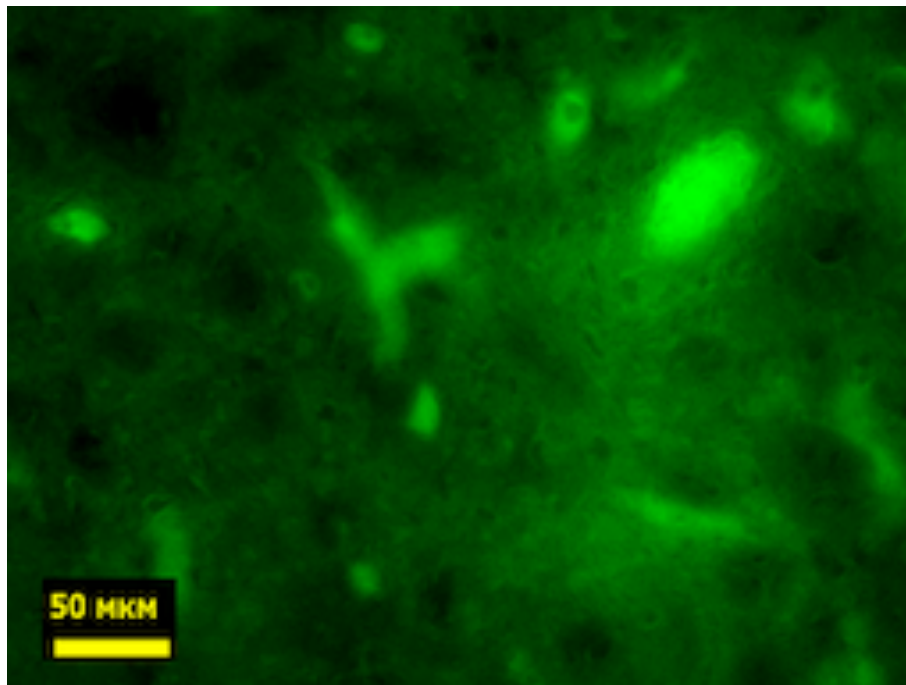


Рисунок 3.8 - Ідентифікація білка HIF-1 α в СОЯ. Реакція непрямої імуофлюоресценції з антитілами до білка HIF-1 α .

Імунофлюоресценція до білків HIF носила дифузний характер розподілу в нейрочитах, а нейронів із повністю забарвленою цитоплазмою практично не відзначалося. Кількісний аналіз імунофлюоресцентної реакції показав, що у контрольних тварин площа матеріалу, імунореактивного до білка HIF-1 α , на 68,8 % ($p < 0,001$) переважала над площею імунореактивності до HIF-3 α , так як і вміст білка HIF-1 α на 63,0 % був вищим, ніж вміст білка HIF-3 α в нейрочитах СОЯ (рис. 3.9).

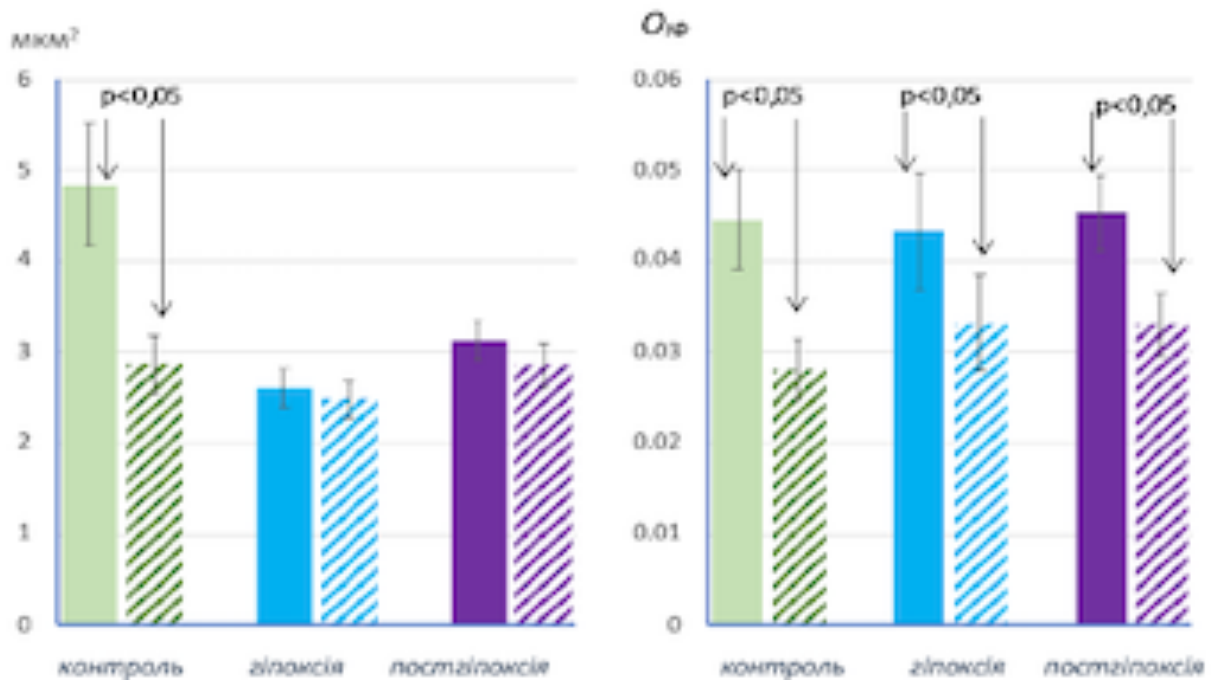


Рисунок 3.9 - Площа імунореактивного матеріалу (μm^2) і вміст в нейронах СОЯ ($O_{1Ф}$) білків HIF-1 α (суцільне забарвлення) і HIF-3 α (заштриховане забарвлення).

Гіпоксичні впливи призводили до зменшення в нейронах СОЯ на 46,2 % площі матеріалу, імунореактивного до білка HIF-1 α , без зміни його вмісту в нейрочитах (табл. 3.5). Подібні зміни відзначалися і з боку білка HIF-3 α , площа імунореактивного матеріалу до якого в нейронах зменшувалася на 13,6 % ($p < 0,05$) (табл. 3.6). Характерно, що показники площі імунореактивності до білків в нейронах СОЯ практично не відрізнялися, проте вміст білка HIF-1 α залишався на 30,3 % вищим, ніж вміст білка HIF-3 α (рис. 3.9).

Таблиця 3.5 - Показники експресії білка HIF-1 α в супраоптичному ядрі гіпоталамуса (M \pm m)

Характеристики	Контроль	Гіпоксичні впливи (15 днів)	Постгіпоксичний період (10 днів)
	1	2	3
Площа імунореактивного матеріалу в нейронах, мкм ²	4,835 \pm 0,357 ^{2,3}	2,601 \pm 0,113 ^{1,3}	3,125 \pm 0,113 ^{1,2}
Вміст HIF-1 α в нейронах, O _{IF}	0,044 \pm 0,002	0,043 \pm 0,003	0,045 \pm 0,002

Примітка. Достовірність відмінностей $p < 0,05$ відносно показників контролю (¹), гіпоксичних тренувань (²), постгіпоксичного періоду (³).

По закінченні постгіпоксичного періоду в нейронах СОЯ площа матеріалу, імунореактивного до білка HIF-1 α , збільшувалася на 20,1 % ($p < 0,05$), але залишалася на 35,4 % нижчою ($p < 0,001$), ніж у контролі. У нейронах спостерігалось відновлення площі матеріалу, імунореактивного до білка HIF-3 α . При цьому показник вмісту білка HIF-3 α в нейроцитах не зазнавав суттєвих змін, але за рахунок меншого розкиду статистичних показників ставав достовірно вищим (на 18,0 %, $p < 0,05$), ніж у контролі. Слід зазначити, що і в постгіпоксичному періоді вміст білка HIF-1 α в нейронах СОЯ залишався на 36,4 % вищим, ніж уміст білка HIF-3 α (рис. 3.9).

Отримані дані про вміст білків HIF-1 α і HIF-3 α в нейронах СОЯ в проведеному експерименті показали, що супраоптичні нейрони практично не реагують на гіпоксичний стимул підвищенням експресії білків сімейства HIF, що, ймовірно, пов'язано з особливостями їх участі в механізмах адаптації до гіпоксії.

Таблиця 3.6 - Показники експресії білка HIF-3 α в супраоптичному ядрі гіпоталамуса (M \pm m)

Характеристики	Контроль	Гіпоксичні впливи (15 днів)	Постгіпоксичний період (10 днів)
	1	2	3
Площа імунореактивного матеріалу в нейронах, мкм ²	2,864 \pm 0,164 ²	2,475 \pm 0,107 ^{1,3}	2,858 \pm 0,126 ²
Вміст HIF-3 α в нейронах, E _{1f}	0,027 \pm 0,001 ³	0,033 \pm 0,002	0,033 \pm 0,001 ¹

Примітка. Достовірність відмінностей $p < 0,05$ по відношенню до показників контролю (¹), гіпоксичних тренувань (²), постгіпоксичного періоду (³).

Висновок

Проведені дослідження виявили особливості реакції крупноклітинних нейронів супраоптичного ядра гіпоталамуса на багатоденну переривчасту дію гіпоксичної гіпоксії і особливості перебігу постгіпоксичного періоду.

Було встановлено, що гіпоксичні впливи призводять до дистрофічних змін у нейронах супраоптичного ядра гіпоталамуса і зниження в клітинах концентрації РНК. Нейрони СОЯ реагували на гіпоксію зменшенням імунореактивності до маркерних білків HIF-1 α і HIF-3 α , але достовірної зміни вмісту даних білків в нейроцитах не спостерігалось. У той же час, істотно зменшувалася в СОЯ імунореактивність до білка ранньої нейросекреторної відповіді cFos, знижувалася концентрація білка в нейронах і сумарний його вміст у СОЯ. Нейросекреторна відповідь нейронів СОЯ на гіпоксичні впливи характеризувалася обмеженням імунореактивності до вазопресину в нейронах, зменшенням концентрації гормону в нейроцитах і сумарного вмісту в СОЯ, що свідчило про обмеження процесів біосинтезу вазопресину в крупноклітинних нейронах СОЯ. Разом із тим, в аксонах нейронів в ділянці

СОЯ гіпоксичні впливи збільшували імунореактивність і сумарний вміст вазопресину, що на тлі гальмування синтезуючої функції вазопресинергічних нейронів СОЯ, вочевидь, вказувало на певне гальмування нейросекреції нейрогормона із накопиченням у аксонах.

По закінченні 10-денного постгіпоксичного періоду відзначалася часткова редукція дистрофічних змін в нейронах СОЯ, проте рівень РНК в нейроцитах не відновлювався. У постгіпоксичний період в СОЯ частково відновлювалася експресія білка cFos і імунореактивність до білків HIF-1 α і HIF-3 α . У нейроцитах і в аксонах нейронів СОЯ практично повністю відновлювалися параметри імунореактивності до вазопресину і вміст нейрогормона.

Таким чином, багатоденний режим переривчастої гіпоксичної гіпоксії призводить до пригнічення в нейронах синтезу вазопресину при помірному прискоренні процесів нейросекреції. У той же час, в постгіпоксичний період спостерігається стійка тенденція до відновлення морфогістохімічних характеристик і нейросекреторної функції супраоптичних нейронів.

Результати досліджень, наведені в цьому розділі, опубліковані в роботах [314-321].

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ ПЕРЕРИВЧАСТОЇ ГІПОКСІЇ НА СТАН ВАЗОПРЕСИНЕРГІЧНИХ НЕЙРОНІВ ЗАДНЬОЛАТЕРАЛЬНОГО КРУПНОКЛІТИННОГО СУБ'ЯДРА ПАРАВЕНТРИКУЛЯРНОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСА

Цей розділ містить результати дослідження функціонального стану нейронів задньолатерального крупноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса (злкПВЯ) у щурів лінії Вістар у нормі, при дії переривчастої гіпоксії та через 10 діб постгіпоксичного періоду. Для цього були вивчені морфометричні показники нейронів, їх цитоплазми, ядер і ядерець (вимір їх площі), і денситометричні характеристики цитоплазми нейронів, їх ядер і ядерець (вимірювання вмісту РНК). У експериментальних тварин оцінено ступінь показників накопичення вазопресину в перикаріоні нейронів злкПВЯ і в їх аксонах. Додатковими факторами, які відображають вплив гіпоксичних навантажень на вазопресинергічну систему гіпоталамуса, було дослідження накопичення в області злкПВЯ продуктів активації гена, індукованого гіпоксією – білків HIF-1 α і HIF-3 α , а також гена ранньої активації пептидергічних нейронів – білка cFOS.

4.1 Морфологічні та денситометричні характеристики нейронів задньолатерального крупноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса

Паравентрикулярне ядро гіпоталамуса характеризується складною цитоархітектонікою з включенням в нього суб'ядер, які сформовані скупченням як нейронів великих розмірів (крупноклітинні суб'ядра), так і нейронів невеликих розмірів (дрібноклітинні суб'ядра) [19, 101]. Крупноклітинна частина паравентрикулярного ядра складається з чотирьох суб'ядер: переднього, медіального, задньомедіального і задньолатерального [19]. Останні два є двома частинами найбільшою частини ПВЯ - латерального

крупноклітинного суб'ядра і відрізняються, головним чином, за ознакою пептиду, який у них синтезується: в задньомедіальному крупноклітинному суб'ядрі синтезується окситоцин, а в задньолатеральному крупноклітинному суб'ядрі – вазопресин.

Нейрони злкПВЯ у контрольних тварин характеризувалися чіткими контурами цитоплазматичної та ядерної мембран (рис. 4.1). Ядра нейроцитів містили дрібні зерна хроматину, дифузно розподіленого по нуклеоплазмі, і чітко диференційоване ядерце.

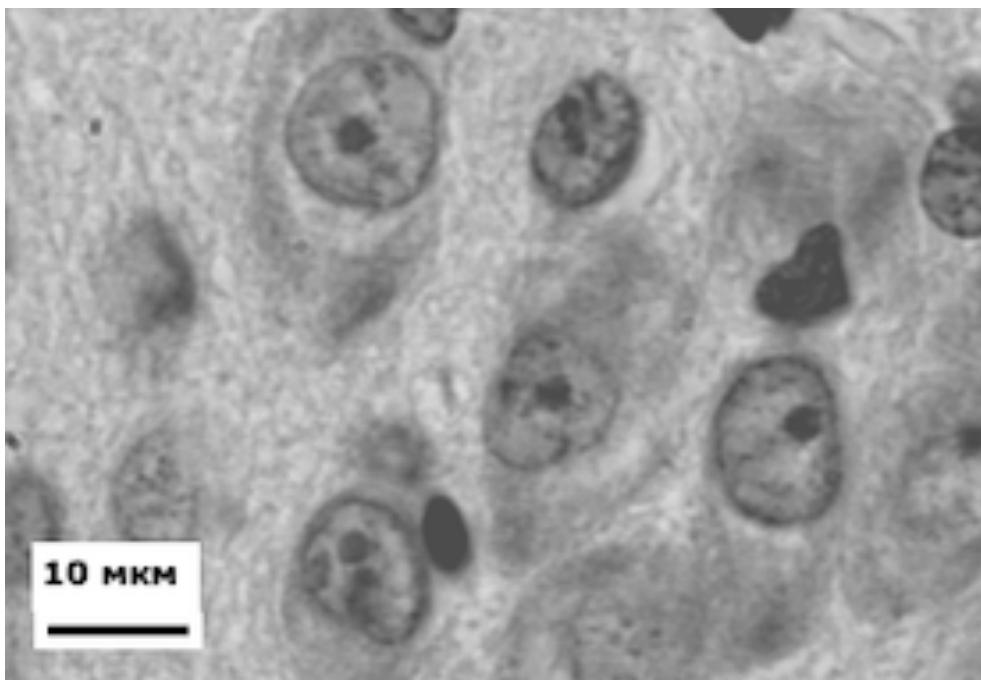


Рисунок 4.1 - Нейрони задньолатерального крупноклітинного суб'ядра ПВЯ в нормі. Забарвлення за Ейнарсеном.

Цитоплазма нейронів становила $58,0 \pm 0,7\%$ від площі перикаріона нейронів, а ядро займало $42,0 \pm 0,7\%$ площі клітини і відрізнялося на 55 % більш високою концентрацією РНК порівняно з цитоплазмою. Ядра нейронів займали $1,8 \pm 0,2\%$ площі клітини і характеризувалися найбільш високою концентрацією РНК, величина якої в 4,3 раза перевищувала даний показник в цитоплазмі клітин. По периферії нейронів злкПВЯ розташовувалися

поодинокі гліальні клітини, які характеризувалися значно меншими розмірами ядер, не містили ядерець, і мали слабо забарвлену цитоплазму.

Морфометричний аналіз нейронів злкПВЯ показав, що гіпоксичні тренування призводили до збільшення площі нейронів на $14,1 \pm 2,6\%$ ($p < 0,001$), головним чином – за рахунок збільшення площі цитоплазми нейронів на $23,8 \pm 3,7\%$ ($p < 0,001$), без зміни площі ядер нейроцитів (табл. 4.1, рис. 4.2). При цьому в нейроцитах зменшувалася ($p < 0,001$) величина ядерно-цитоплазматичного коефіцієнта.

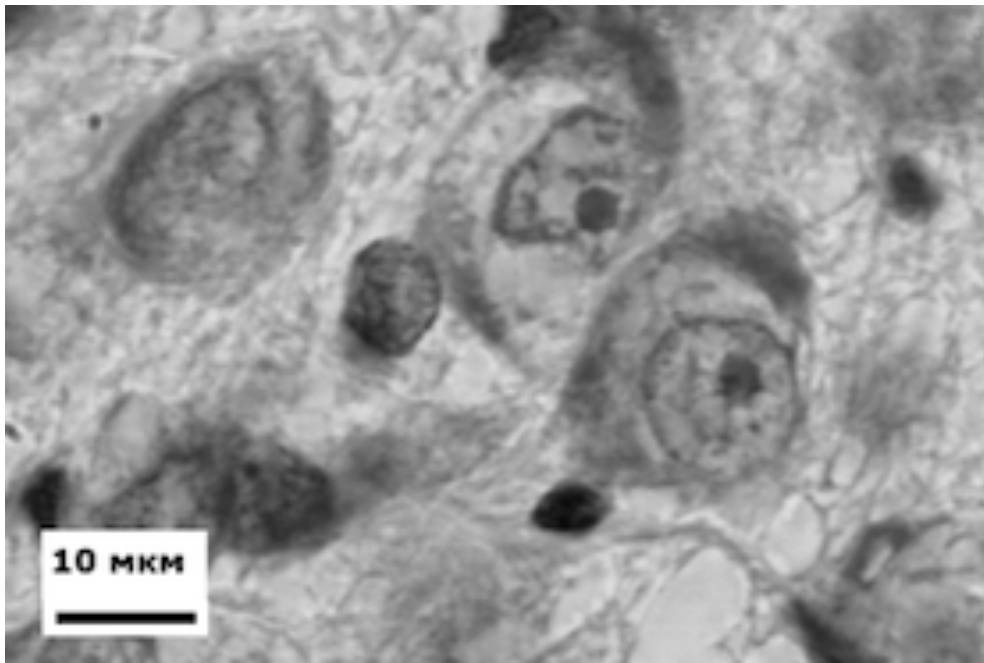


Рисунок 4.2 - Нейрони задньолатерального крупноклітинного суб'ядра ПВЯ після гіпоксичних впливів. Забарвлення за Ейнарсоном.

Збільшення розмірів нейронів і їх цитоплазми супроводжувалося незначним зростанням на $6,1 \pm 3,7\%$ ($p < 0,001$) вмісту РНК в цитоплазмі поєданого зі зменшенням цього показника в ядрі нейронів на $41,0 \pm 1,7\%$ ($p < 0,001$). При цьому гіпоксичні тренування призводили до збільшення площі ядерець нейронів у 2,7 раза ($p < 0,001$) і зниження вмісту в них РНК на $16,6 \pm 7,5\%$ ($p < 0,05$).

Морфометричний аналіз нейронів злкПВЯ в постгіпоксичному періоді, а саме через 10 днів після закінчення циклу гіпоксичних впливів, показав, що площа нейронів продовжувала наростати порівняно з періодом гіпоксичних тренувань, і додатково збільшилася на $7,5 \pm 2,6\%$ ($p < 0,05$) за рахунок збільшення площі ядра нейроцитів на $19,2 \pm 3,9\%$ ($p < 0,001$) (табл. 4.1, рис. 4.3).

Таблиця 4.1 - Морфометричні і денситометричні характеристики нейронів задньолатерального крупноклітинного суб'ядра ПВЯ ($M \pm m$)

Характеристики	Контроль	Гіпоксичні впливи (15 днів)	Постгіпоксичний період (10 днів)
	1	2	3
Площа нейронів, мкм^2	$171,53 \pm 2,75^{2,3}$	$195,70 \pm 4,49^{1,3}$	$210,47 \pm 5,03^{1,2}$
Площа цитоплазми, мкм^2	$100,80 \pm 2,42^{2,3}$	$124,86 \pm 3,68^1$	$127,66 \pm 4,12^1$
Вміст РНК в цитоплазмі, Оог	$13,03 \pm 0,46$	$13,81 \pm 0,48$	$13,15 \pm 0,72$
Площа ядра, мкм^2	$70,73 \pm 1,17^3$	$71,30 \pm 1,33^3$	$84,96 \pm 1,44^{1,2}$
Вміст РНК в ядрі, Оог	$14,26 \pm 0,32^{2,3}$	$8,42 \pm 0,24^{1,3}$	$12,13 \pm 0,41^{1,2}$
Площа ядерця, мкм^2	$2,31 \pm 0,07^{2,3}$	$6,40 \pm 0,14^{1,3}$	$4,45 \pm 0,21^{1,2}$
Вміст РНК в ядерці, Оог	$1,28 \pm 0,06$	$1,06 \pm 0,09^3$	$1,51 \pm 0,12^2$
Ядерно-цитоплазматичний коефіцієнт	$0,420 \pm 0,007^2$	$0,376 \pm 0,006^{1,3}$	$0,418 \pm 0,007^2$

Примітка. Достовірність відмінностей $p < 0,05$ відносно показників контролю (¹), гіпоксичних тренувань (²), постгіпоксичного періоду (³).

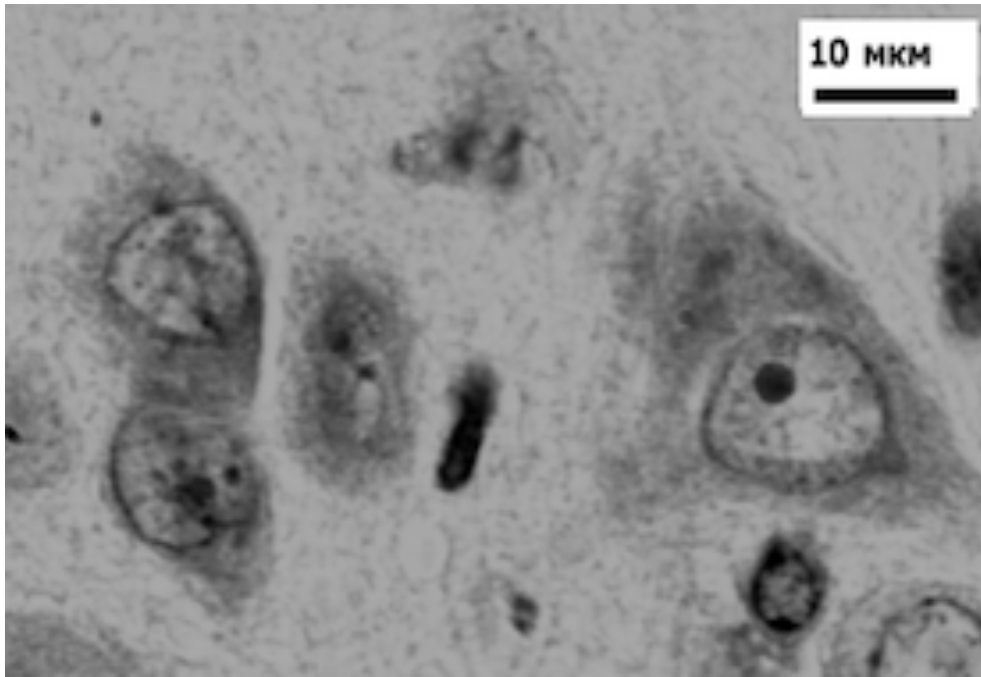


Рисунок 4.3 - Нейрони задньолатерального крупноклітинного суб'ядра ПВЯ через 10 днів після закінчення циклу гіпоксичних впливів. Забарвлення за Ейнарсеном.

Це призводило до відновлення величини ядерно-цитоплазматичного коефіцієнта до показників контролю.

У постгіпоксичному періоді спостерігалось часткове відновлення вмісту РНК в ядрі нейронів злкПВЯ, де величина показника збільшувалася на $44,1 \pm 4,8$ % ($p < 0,001$) порівняно з гіпоксичним періодом, але, тим не менше, залишалася на $15,0 \pm 2,9$ % нижчою ($p < 0,001$), ніж у контролі (рис. 4.4). При цьому в постгіпоксичному періоді, порівняно з періодом гіпоксичних тренувань, на $30,4 \pm 3,3$ % зменшився ($p < 0,001$) показник площі ядерця нейронів. Проте, даний показник залишався практично у 2 рази вищим, ніж у контролі. Примітно, що в постгіпоксичному періоді на $41,6 \pm 11,2$ % зростав вміст РНК в ядерцях нейронів, що на $18,1 \pm 9,3$ % перевищувало ($p < 0,001$) показники контролю.

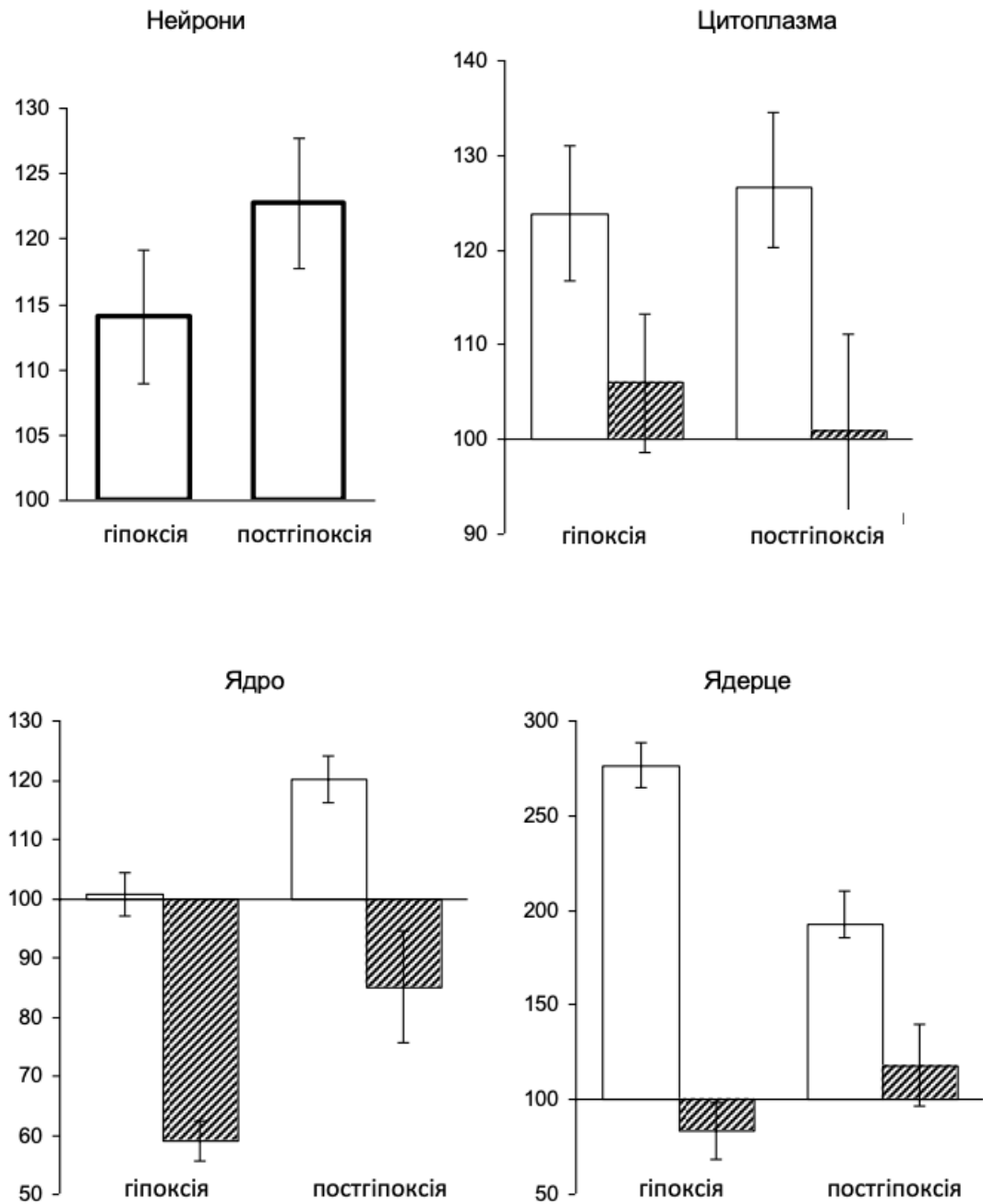


Рисунок 4.4 - Динаміка морфометричних показників нейронів задньолатерального крупноклітинного суб'ядра ПВЯ в експериментальних тварин (світлі стовпчики – площа, штриховані стовпчики – вміст РНК, показники контролю прийняті за 100%).

4.2. Вазопресинергічна система задньолатерального крупноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса

Кількісний аналіз імунофлюоресцентної реакції показав, що гіпоксичні впливи призводили до збільшення імунореактивності до вазопресину як в перикаріоні нейронів злкПВЯ (табл. 4.2 рис. 4.5), так і в аксонах нейронів (табл. 4.3).

Таблиця 4.2 - Показники синтезу вазопресину в перикаріоні нейронів задньолатерального крупноклітинного суб'ядра ПВЯ ($M \pm m$)

Характеристики	Контроль	Гіпоксичні впливи (15 днів)	Постгіпоксичний період (10 днів)
	1	2	3
Площа імунореактивного матеріалу в нейроні, $\mu\text{км}^2$	163,0 \pm 3,2 ²	181,3 \pm 6,7 ^{1,3}	152,3 \pm 3,9 ²
Площа імунореактивності до вазопресину в злкПВЯ, %	20,35 \pm 3,18	27,47 \pm 4,26	21,31 \pm 2,05
Концентрація вазопресину в цитоплазмі, $O_{1\Phi}$	0,358 \pm 0,056 ²	0,908 \pm 0,027 ^{1,3}	0,435 \pm 0,022 ²
Вміст вазопресину в нейроні, $O_{1\Phi}$	73,21 \pm 14,01 ²	156,61 \pm 5,15 ^{1,3}	64,53 \pm 3,31 ^{1,2}
Вміст вазопресину в злкПВЯ, $O_{1\Phi}$	655,7 \pm 71,8 ^{2,3}	3863,5 \pm 732,0 ^{1,3}	906,0 \pm 48,0 ^{1,2}

Примітка. Достовірність відмінностей $p < 0,05$ відносно показників контролю (¹), гіпоксичних тренувань (²), постгіпоксичного періоду (³).

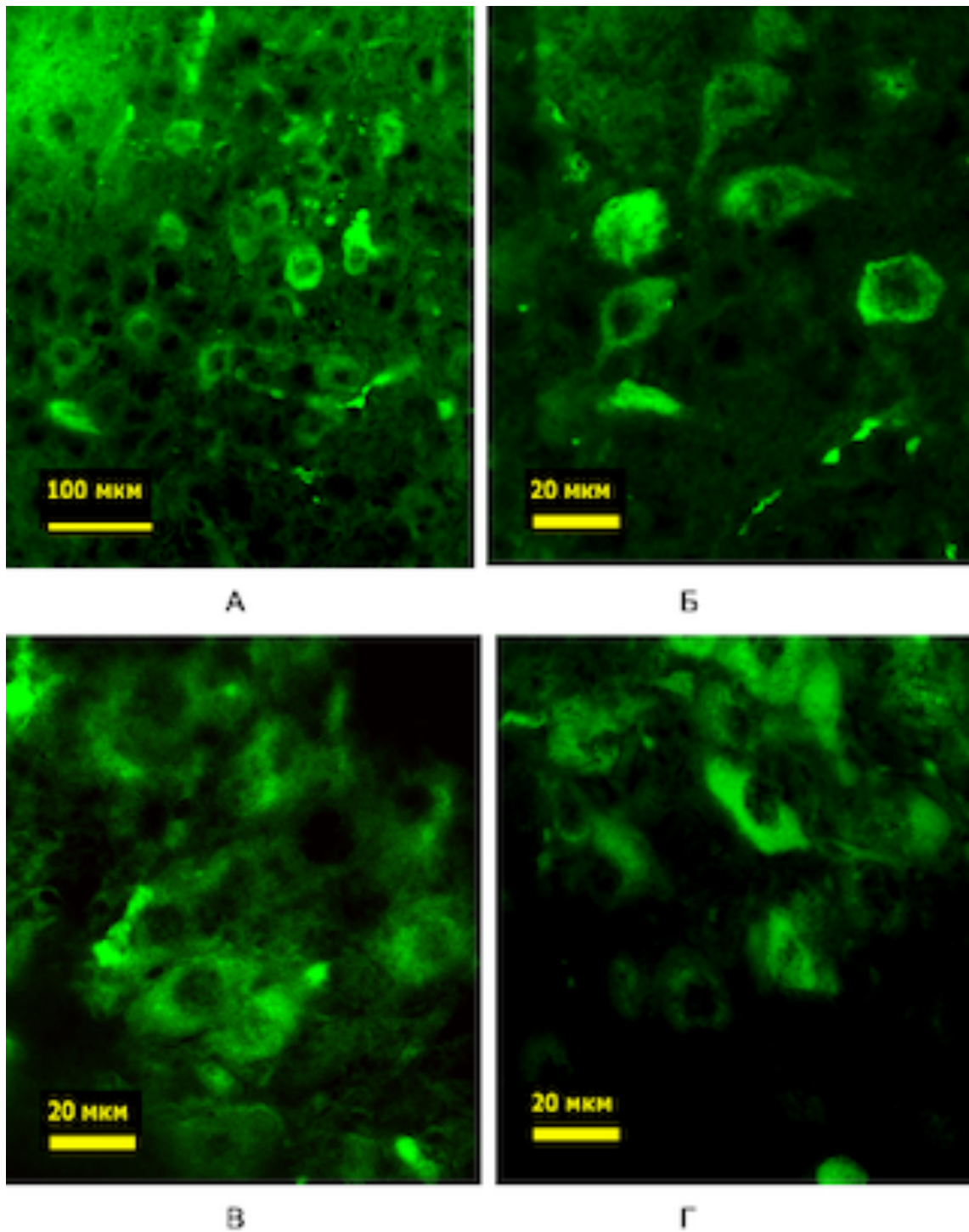


Рисунок 4.5 - Вазопресинергічні нейрони задньолатерального крупноклітинного суб'ядра ПВЯ у контрольних тварин (А, Б), після 15 днів гіпоксичних впливів (В) і через 10 днів постгіпоксичного періоду (Г). Реакція непрямой імунофлюоресценції з антитілами до [Arg⁸]-вазопресину щура.

Таблиця 4.3 - Показники секреції вазопресину в аксонах нейронів задньолатерального крупноклітинного суб'ядра ПВЯ ($M \pm m$)

Характеристики	Контроль	Гіпоксичні впливи (15 днів)	Постгіпоксичний період (10 днів)
	1	2	3
Сумарна площа імунореактивного матеріалу в аксонах, мкм ²	184,5±22,8 ^{2,3}	1023,2±42,3 ^{1,3}	345,4±27,1 ^{1,2}
Площа імунореактивності до вазопресину в аксонах злкПВЯ, %	2,804±0,347 ^{2,3}	3,612±0,149 ^{1,3}	4,556±0,357 ^{1,2}
Концентрація вазопресину в аксонах, ОІФ	0,349±0,028	0,432±0,037	0,383±0,032
Вміст вазопресину в аксонах в злкПВЯ, ОІФ	71,7±11,7 ^{2,3}	437,9±41,8 ^{1,3}	132,8±16,7 ^{1,2}

Примітка. Достовірність відмінностей $p < 0,05$ відносно показників контролю (¹), гіпоксичних тренувань (²), постгіпоксичного періоду (³).

Хоча гіпоксичні впливи не приводили до зміни відносної площі імунореактивності до вазопресину в ділянці злкПВЯ (рис. 4.6), проте в окремих нейронах площа імунореактивності збільшувалася на $11,2 \pm 4,1$ % ($p < 0,001$). Це могло свідчити про те, що гіпоксичні впливи не призводили до збільшення числа крупноклітинних нейронів, що синтезують вазопресин, однак посилювали процеси синтезу гормону в окремих нейроцитах.

У цитоплазмі нейронів злкПВЯ відзначалося підвищення концентрації вазопресину у 2,5 раза і його вмісту в нейронах у 2,1 раза відносно контролю. При цьому сумарний вміст вазопресину в злкПВЯ після гіпоксичних впливів збільшувався практично в 6 разів (рис. 4.6). Це свідчило про істотну активацію синтезу вазопресину в крупноклітинних нейронах злкПВЯ при гіпоксії.

Гіпоксичні впливи призводили до наростання площі матеріалу, імунореактивного до вазопресину, в аксонах нейронів в ділянці злкПВЯ на $28,8 \pm 5,3$ % ($p < 0,05$) відносно контролю. За рахунок цього сумарний вміст нейрогормону в аксонах нейронів злкПВЯ підвищувався у 6,1 раза, тобто, в тому ж кількісному співвідношенні, що і вміст вазопресину в самих нейронах. Отримані дані свідчать про те, що вплив гіпоксичної гіпоксії протягом 15 днів активує синтез вазопресину в крупноклітинних нейронах злкПВЯ і стимулює процеси його нейросекреції в аксони.

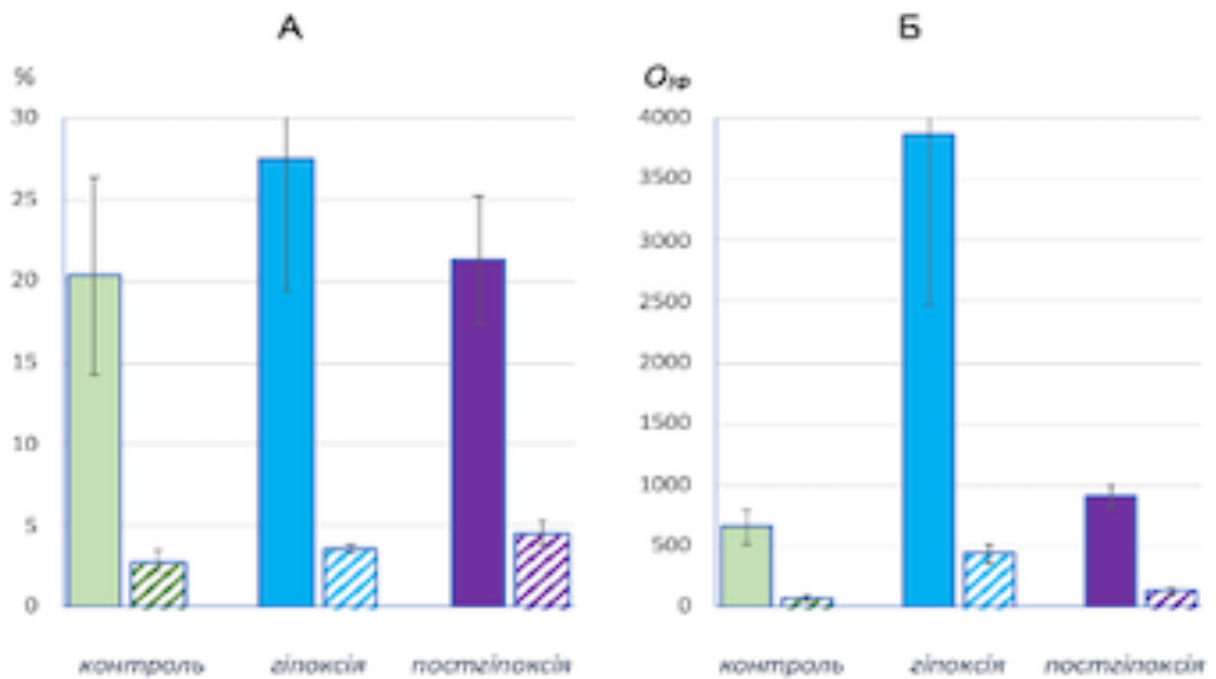


Рисунок 4.6 - Відносна площа імунофлюоресценції (А) і сумарного вмісту вазопресину (Б) в злкПВЯ, зайнята нейронами (суцільне забарвлення) і аксонами (заштриховане забарвлення).

Постгіпоксичний період характеризувався зниженням до рівня контрольних показників площі імунореактивного до вазопресину, концентрації нейрогормону в цитоплазмі і його вмісту в нейронах злкПВЯ. При цьому сумарний вміст вазопресину в злкПВЯ хоча і зменшувався порівняно з гіпоксичним періодом, залишався на $38,2 \pm 7,3$ % більшим ($p < 0,05$), ніж в контролі. В аксонах нейронів в ділянці злкПВЯ постгіпоксичний період характеризувався зниженням величини площі матеріалу, імунореактивного до

вазопресину, на 66 %, і зменшенням вмісту вазопресину в ділянці аксонів на 70 % відносно показників гіпоксичного періоду. При цьому величина імунореактивності і вміст вазопресину залишалися в 1,8 раза вищим ($p < 0,005$), ніж у контролі.

Таким чином, постгіпоксичний період характеризувався поступовим зниженням процесів біосинтезу вазопресину і нейросекреції в злкПВЯ, проте функціональні показники вазопресинергічної системи задньолатерального крупноклітинного суб'ядра ПВЯ зберігалися достовірно вищими, ніж у контрольних тварин.

4.3. Експресія білка cFos в нейронах задньолатерального крупноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса

Реакції непрямой імунofлюоресценції з первинними антитілами до білка cFos і вторинними антитілами, кон'югованими з FITC, виявила зони накопичення білка в ділянці нейронів злвПВЯ (рис. 4.7А).

Розподіл імунореактивності до білка cFos в нейрочитах в основному носив дифузний характер. Гіпоксичні впливи призводили до підвищення площі імунореактивності до білка cFos у ділянці злкПВЯ на $41,4 \pm 10,0$ % ($p < 0,01$) і підвищення концентрації білка cFos у нейронах на $31,4 \pm 7,1$ % ($p < 0,01$) (табл. 4,4, рис. 4.7Б). Внаслідок цього вміст білка cFos в злкПВЯ під впливом гіпоксичних впливів збільшувався в 1,8 раза ($p < 0,01$).

Через 10 днів після закінчення гіпоксичних впливів показники імунореактивності до білка c-Fos як і раніше залишалися на високому рівні і статистично не відрізнялися від тих величин, які визначалися на момент закінчення гіпоксичних впливів. При цьому показник концентрації білка c-Fos у нейронах злкПВЯ мав тенденцію до зниження ($p = 0,059$).

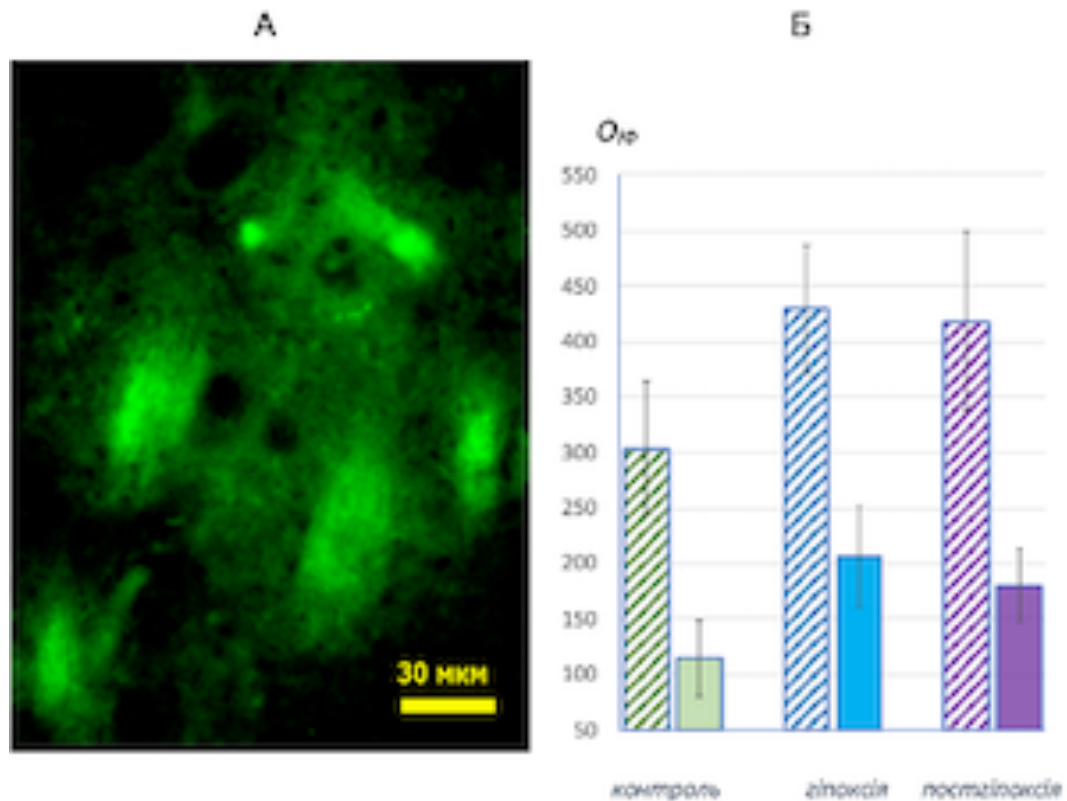


Рисунок 4.7 - Реакція непрямой імунофлуоресценції з антитілами до білка cFos (А), показники площі імунореактивності (мкм², заштриховане забарвлення) і вміст білка cFos (O_{IF}, суцільне забарвлення) в задньолатеральному крупноклітинному суб'яздрі ПВЯ.

Отримані результати свідчать про те, що гіпоксичні впливи стимулюють у нейронах злкПВЯ синтез білка ранньої нейросекреторної відповіді c-Fos і зберігають підвищений його синтез протягом 10-ти днів постгіпоксичного періоду. Підвищення синтезу білка cFos у нейросекреторних нейронах задньолатерального крупноклітинного суб'яздра ПВЯ, ймовірно, свідчить про збільшення експресії генів, що визначають структуру основного нейрогормона, синтезованого в злкПВЯ – вазопресину. Підтвердженням подібного припущення є результати попереднього розділу, який демонструє наростання синтезу і секреції вазопресину в злкПВЯ. Збереження високого рівня експресії білка cFos у злкПВЯ в постгіпоксичний період свідчить про високий рівень функціонального резерву крупноклітинних нейронів ПВЯ до

синтезу вазопресину, незважаючи на те, що через 10 днів після закінчення гіпоксичних впливів вміст нейрогормона зменшується.

Таблиця 4.4 - Показники експресії білка cFos в задньолатеральному крупноклітонному суб'ядрі ПВЯ ($M \pm m$)

Характеристики	Контроль	Гіпоксичні впливи (15 днів)	Постгіпоксичний період (10 днів)
	1	2	3
Сумарна площа імунореактивного матеріалу в злкПВЯ, мкм ²	304,0±31,1 ^{2,3}	429,8±30,5 ¹	418,5±42,7 ¹
Відносна площа імунореактивності в злкПВЯ, %	3,36±0,34 ^{2,3}	4,75±0,34 ¹	4,63±0,47 ¹
Концентрація cFos в нейронах, O _{1ф}	0,359±0,025 ^{2,3}	0,471±0,025 ¹	0,420±0,022 ¹
Вміст cFos в злкПВЯ, O _{1ф}	114,9±18,2 ^{2,3}	206,4±24,8 ¹	180,5±17,8 ¹

Примітка. Достовірність відмінностей $p < 0,05$ відносно показників контролю (1), гіпоксичних тренувань (2), постгіпоксичного періоду (3).

4.4 Експресія білків NIF-1 α і NIF-3 α в нейронах задньолатерального крупноклітонного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса

За допомогою реакції непрямой імуофлюоресценції з первинними антитілами до білків NIF і вторинними антитілами, кон'югованими з FITC, у нейронах злкПВЯ були ідентифіковані зони накопичення білків NIF-1 α і NIF-3 α (рис. 4.8). Імуофлюоресценція до білків NIF носила дифузний характер розподілу в нейронах, у більшості випадків цитоплазма нервових клітин була практично повністю забарвлена.

Кількісний аналіз імунофлуоресцентної реакції показав, що у контрольних тварин в нейронах злкПВЯ площа матеріалу, імунореактивного до білка HIF-1 α , на 42,9 % перевищувала ($p < 0,005$) площу імунореактивності до білка HIF-3 α , а вміст білка HIF-1 α був на 30,0 % вищим ($p < 0,01$), ніж білка HIF-3 α (рис. 4.9).

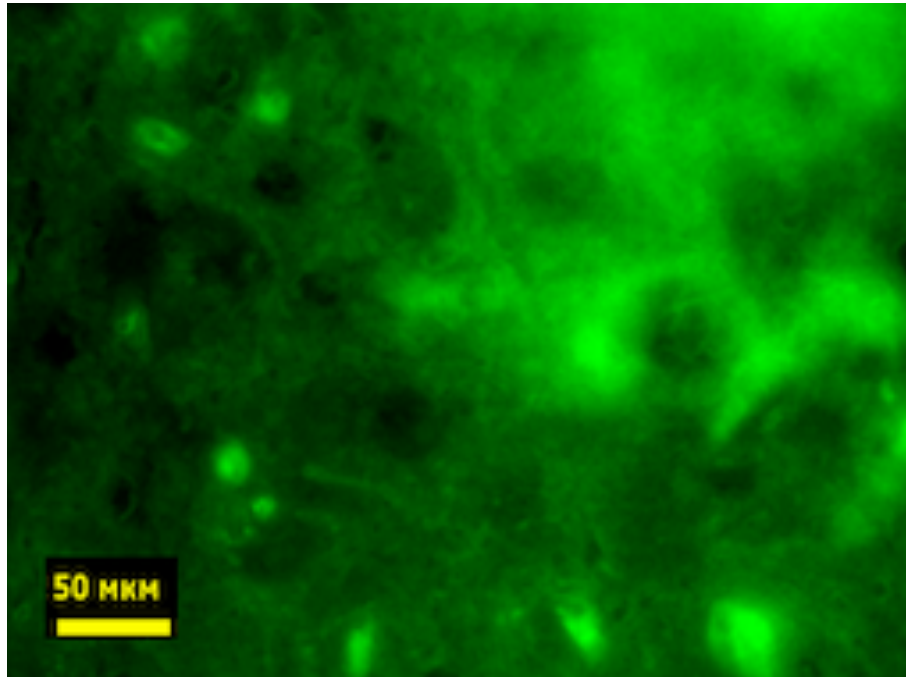


Рисунок 4.8 - Ідентифікація білка HIF-1 α в задньолатеральному крупноклітинному суб'ядрі ПВЯ. Реакція непрямой імунофлуоресценції з антитілами до білка HIF-1 α .

Гіпоксичні впливи призводили до збільшення площі імунореактивності до білка HIF-1 α в нейронах злкПВЯ в 1,5 раза ($p < 0,005$), поєднаного зі зростанням його вмісту в нейронах у 3,4 раза ($p < 0,001$) порівняно з контрольними тваринами (табл. 4.5). Водночас, у нейронах злкПВЯ у 2 рази збільшувалася ($p < 0,001$) площа імунореактивності до білка HIF-3 α і в 3 рази зростав ($p < 0,001$) вміст білка в нейронах (табл. 4.6). Зростання в злкПВЯ імунореактивності до білків сімейства HIF при переривчастій дії гіпоксичної гіпоксії призводило до рівнозначних показників площі імунофлуоресцентного матеріалу, проте вміст білка HIF-1 α в нейронах практично в 1,5 раза був вищим ($p < 0,01$), ніж білка HIF-3 α .

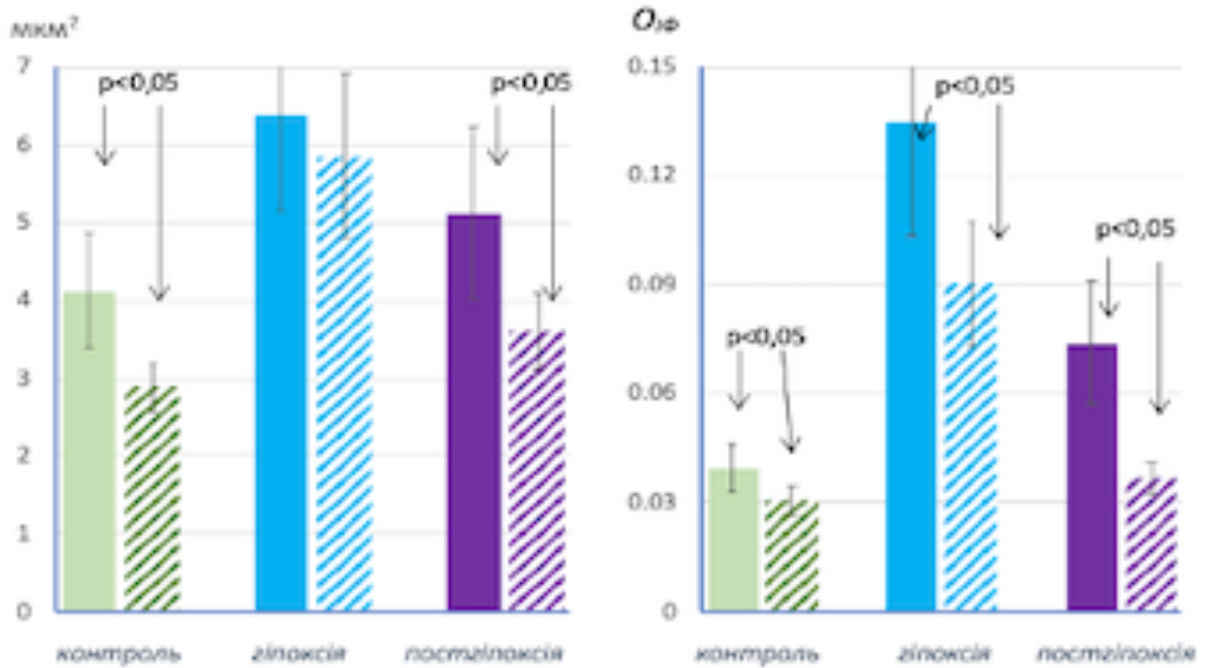


Рисунок 4.9 - Площа імунореактивного матеріалу ($\mu\text{км}^2$) і вміст у нейронах задньолатерального крупноклітинного суб'ядра ПВЯ ($O_{1\Phi}$) білків HIF-1 α (суцільне забарвлення) і HIF-3 α (заштриховане забарвлення).

Постгіпоксичний період характеризувався зменшенням площі імунореактивності до білка HIF-1 α в нейронах злКПВЯ до рівня показників контролю. При цьому на 55% зменшувався ($p < 0,002$) вміст білка HIF-1 α в нейронах порівняно з гіпоксичним періодом. Однак, даний показник залишався практично у 2 рази вищим ($p < 0,001$), ніж у контрольних тварин. Подібні зміни відзначалися з боку динаміки експресії білка HIF-3 α в злКПВЯ: в постгіпоксичний період площа імунореактивності до білка в нейронах знижувалася на 39% ($p < 0,001$), а вміст білка HIF-3 α в нейронах порівняно з гіпоксичним періодом зменшувався на 60% ($p < 0,001$). При цьому вміст білка HIF-3 α в нейронах злКПВЯ на $20,0 \pm 7,2\%$ перевищував ($p < 0,05$) показники в контролі.

Отже, отримані дані свідчили про високу реактивність крупноклітинних нейронів злКПВЯ до дії гіпоксичного стимулу у вигляді підвищення синтезу ключових біомаркерів реакції на гіпоксію – білків сімейства HIF, і збереження підвищеної функціональної активності злКПВЯ в постгіпоксичний період.

Таблиця 4.5 - Показники експресії білка HIF-1 α в задньолатеральному крупноклітинному суб'ядрі ПВЯ ($M \pm m$)

Характеристики	Контроль	Гіпоксичні впливи (15 днів)	Постгіпоксичний період (10 днів)
	1	2	3
Площа імунореактивного матеріалу в нейронах, мкм ²	4,117 \pm 0,392 ²	6,385 \pm 0,652 ¹	5,116 \pm 0,584
Вміст HIF-1 α в нейронах, O ₁ Ф	0,039 \pm 0,003 ^{2,3}	0,134 \pm 0,016 ^{1,3}	0,073 \pm 0,008 ^{1,2}

Примітка. Достовірність відмінностей $p < 0,05$ відносно показників контролю (¹), гіпоксичних тренувань (²), постгіпоксичного періоду (³).

Таблиця 4.6 - Показники експресії білка HIF-3 α в задньолатеральному крупноклітинному суб'ядрі ПВЯ ($M \pm m$)

Характеристики	Контроль	Гіпоксичні впливи (15 днів)	Постгіпоксичний період (10 днів)
	1	2	3
Площа імунореактивного матеріалу в нейронах, мкм ²	2,882 \pm 0,169 ^{2,3}	5,859 \pm 0,548 ^{1,3}	3,607 \pm 0,259 ^{1,2}
Вміст HIF-3 α в нейронах, E ₁ Ф	0,030 \pm 0,002 ^{2,3}	0,090 \pm 0,009 ^{1,3}	0,036 \pm 0,002 ^{1,2}

Примітка. Достовірність відмінностей $p < 0,05$ відносно показників контролю (¹), гіпоксичних тренувань (²), постгіпоксичного періоду (³).

Висновок

Проведені дослідження виявили особливості реакції вазопресинергічних крупноклітинних нейронів задньолатерального крупноклітинного суб'ядра

ПВЯ на багатоденну переривчасту дію гіпоксичної гіпоксії і особливості перебігу постгіпоксичного періоду. Було встановлено, що багатоденні гіпоксичні впливи стимулюють функціональну активність вазопресинергічних нейронів задньолатерального крупоклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса, що супроводжується підвищенням синтезу вазопресину у нейронах та посиленням процесів нейросекреції. Підтвердженням підвищення функціональної активності крупноклітинних вазопресинергічних нейронів на гіпоксичний стимул було посилення експресії білків HIF-1 α , HIF-3 α і білка cFos, а також накопичення в нейроцитах РНК. Важливо, що через 10 днів після закінчення гіпоксичних впливів основні показники нейросекреторної активності нейронів злПВЯ зберігалися підвищеними порівняно з контрольними показниками і свідчили про збереження високої функціональної активності крупноклітинних вазопресинергічних нейронів у постгіпоксичний період. Характер отриманих змін функціональної активності нейронів злПВЯ у відповідь на гіпоксичні впливи і у постгіпоксичний період можуть свідчити про залучення крупноклітинних вазопресинергічних нейронів у процеси нейроендокринної адаптації до гіпоксії.

Результати досліджень, наведені в цьому розділі, опубліковані в роботах [315-319, 321-327].

РОЗДІЛ 5

ВПЛИВ ПЕРЕРИВЧАСТОЇ ГІПОКСІЇ НА СТАН ВАЗОПРЕСИНЕРГІЧНИХ НЕЙРОНІВ МЕДІАЛЬНОГО ДРІБНОКЛІТИННОГО СУБ'ЯДРА ПАРАВЕТРИКУЛЯРНОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСА

Цей розділ містить результати дослідження стану нейронів медіального дрібноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса (мдПВЯ) у щурів лінії Вістар в нормі і при впливі переривчастої гіпоксії, для чого було вивчено морфометричні характеристики з вимірюванням площі нейронів, їх цитоплазми, ядра та ядерця, денситометричні показники з визначенням вмісту РНК в цитоплазмі нейронів, ядрі і ядерці, оцінені параметри синтезу вазопресину в нейронах мдПВЯ і його транспорту в аксони. Додатковими характеристиками, які відображають вплив гіпоксичних навантажень на вазопресинергічну систему гіпоталамуса, були вимір накопичення в ділянці мдПВЯ продуктів активації гена, індукованого гіпоксією, білків NIF-1 α і NIF-3 α , а також гена ранньої активації пептидергічних нейронів – білка cFOS.

5.1. Морфологічні та денситометричні дослідження нейронів медіального дрібноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса

Відомо, що паравентрикулярне ядро гіпоталамуса характеризується складною цитоархітектонікою, а його дрібноклітинна частина складається з п'яти суб'ядер: переднього, перивентрикулярного, дорсального, латерального і медіального [19, 101]. Разом із тим, клітинний склад останнього теж неоднорідний і включає поодинокі великі нейрони, для яких характерна здатність синтезувати вазопресин, у той час як домінуюча частина дрібноклітинних нейронів синтезують кортикотропін-релізінг гормон (кортиколіберин) [134, 153, 328]. За даними морфометричного аналізу популяції нейронів мдПВЯ можна виділити три типи нейронів: дрібні

нейрони, нейрони середньої величини і великі нейрони, площа перикаріону яких становить понад 85 мкм^2 , і їх популяція в мдПВЯ становить від 10 % до 15 % від загальної чисельності клітинного складу [51, 224] (рис. 5.1).

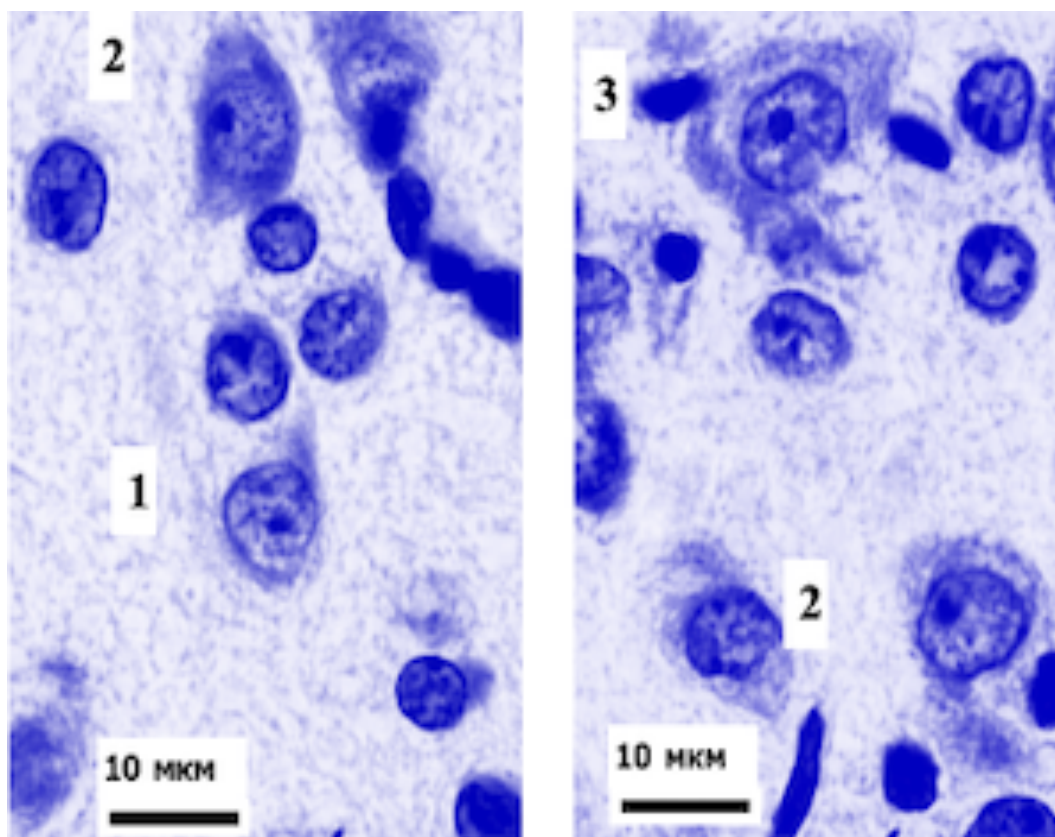


Рисунок 5.1 - Нейрони медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ: дрібні (1), середньої величини (2) і великі (3). Забарвлення за Ейнарсоном.

Вважається, що наявність в ділянці мдПВЯ великих нейронів обумовлена топографічною близькістю латерального крупноклітинного суб'ядра ПВЯ, задньолатеральну ділянці якого формує окреме суб'ядро, і його реакцію на гіпоксичні впливи ми показали в попередньому розділі. Вважають, що формування подібної цитоархітектоніки мдПВЯ обумовлено міграцією великих вазопресинергічних нейронів із сусіднього задньолатерального крупноклітинного суб'ядра ПВЯ в процесі його формування як нейроанатомічного утворення в ембріогенезі [19, 329].

Проте, методами подвійного фарбування показано, що вазопресинергічні нейрони мдПВЯ мають здатність синтезувати кортиколіберин і транспортувати цей нейропептид у портальний кровоток

гіпофіза через зовнішню зону серединного підвищення, в той час як нейросекрет від крупноклітинних нейронів задньолатерального суб'ядра ПВЯ надходить у нейрогіпофіз через внутрішню зону серединного підвищення [19, 329]. Це дає можливість нейропептидам, синтезованим у мдПВЯ, в тому числі й вазопресину, регулювати в аденогіпофізі синтез і секрецію тропних гормонів.

У контрольних тварин досліджувана популяція нейронів медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ характеризувалася переважанням цитоплазми над ядром, на відміну від популяції дрібних нейронів, де клітинне ядро було домінуючим. Цитоплазма нейронів становила $56,3 \pm 0,9$ % від площі перикаріонів нейронів із вмістом РНК у 2,1 раза меншим, ніж в ядрі (табл. 5.1). Ядерце нейронів займало $2,3 \pm 0,1$ % площі клітини і характеризувалося найбільш високою концентрацією РНК ($0,402 \pm 0,015$ Оог), величина якого в 4,4 раза перевищувала даний показник в цитоплазмі клітин ($0,092 \pm 0,003$ Оог).

Морфометричний аналіз мдПВЯ показав, що гіпоксичні впливи призводили до збільшення площі нейронів на $10,6 \pm 2,2$ % ($p < 0,001$), головним чином за рахунок збільшення площі цитоплазми нейронів на $23,4 \pm 3,4$ % ($p < 0,001$) (табл. 5.1, рис. 5.2). При цьому відзначалося деяке зниження площі ядер клітин на $6,0 \pm 1,9$ % ($p < 0,05$) і, як наслідок, зменшення ядерно-цитоплазматичного коефіцієнту ($p < 0,001$). Збільшення розмірів нейронів і їх цитоплазми супроводжувалося наростанням вмісту РНК в цитоплазмі на $36,8 \pm 7,5$ % ($p < 0,001$) в поєднанні зі зменшенням даного показника в ядрі нейронів на $27,0 \pm 2,7$ % ($p < 0,05$). При цьому гіпоксичні впливи не впливали на величину площі ядерця нейронів і вмісту в них РНК ($p > 0,05$).

На основі отриманих даних, які показали збільшення морфометричних параметрів нейронів і накопичення в їх цитоплазмі РНК після проведених гіпоксичних впливів, можна зробити висновок про те, що переривчаста гіпоксія приводила до помірної гіпертрофії нейронів медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ і підвищення в них синтезуючої активності.

Таблиця 5.1 - Морфометричні і денситометричні характеристики нейронів медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ ($M \pm m$)

Характеристики	Контроль	Гіпоксичні впливи (15 днів)	Постгіпоксичний період (10 днів)
	1	2	3
Площа нейронів, мкм^2	88,72±1,76 ^{2,3}	98,08±1,97 ^{1,3}	123,22±2,46 ^{1,2}
Площа цитоплазми, мкм^2	50,02±1,21 ^{2,3}	61,71±1,71 ^{1,3}	75,47±2,14 ^{1,2}
Вміст РНК в цитоплазмі, Оог	4,505±0,160 ^{2,3}	6,162±0,338 ¹	5,880±0,285 ¹
Площа ядра, мкм^2	38,70±0,83 ^{2,3}	36,37±0,73 ^{1,3}	47,74±0,77 ^{1,2}
Вміст РНК в ядрі, Оог	9,498±0,264 ^{2,3}	6,936±0,260 ^{1,3}	8,648±0,311 ^{1,2}
Площа ядерця, мкм^2	2,05±0,11 ³	1,93±0,10 ³	3,26±0,18 ^{1,2}
Вміст РНК в ядерці, Оог	0,817±0,055	0,713±0,055 ³	0,911±0,049 ²
Ядерно-цитоплазматичний коефіцієнт	0,438±0,005 ^{2,3}	0,380±0,007 ¹	0,397±0,006 ¹

Примітка. Достовірність відмінностей $p < 0,05$ відносно показників контролю (1), гіпоксичних тренувань (2), постгіпоксичного періоду (3).

Морфометричний аналіз нейронів мдПВЯ в постгіпоксичному періоді, а саме через 10 днів після закінчення циклу гіпоксичних впливів, показав, що площа нейронів продовжувала наростати і додатково збільшилася на 25,1±2,1 % ($p < 0,001$), головним чином – за рахунок збільшення площі цитоплазми нейронів на 22,3±3,4 % ($p < 0,001$), а порівняно з контрольною

групою площа нейронів збільшилася на $38,9 \pm 2,8\%$, а площа цитоплазми клітин – на $50,9 \pm 4,3\%$ ($p < 0,001$) (рис. 5.3).

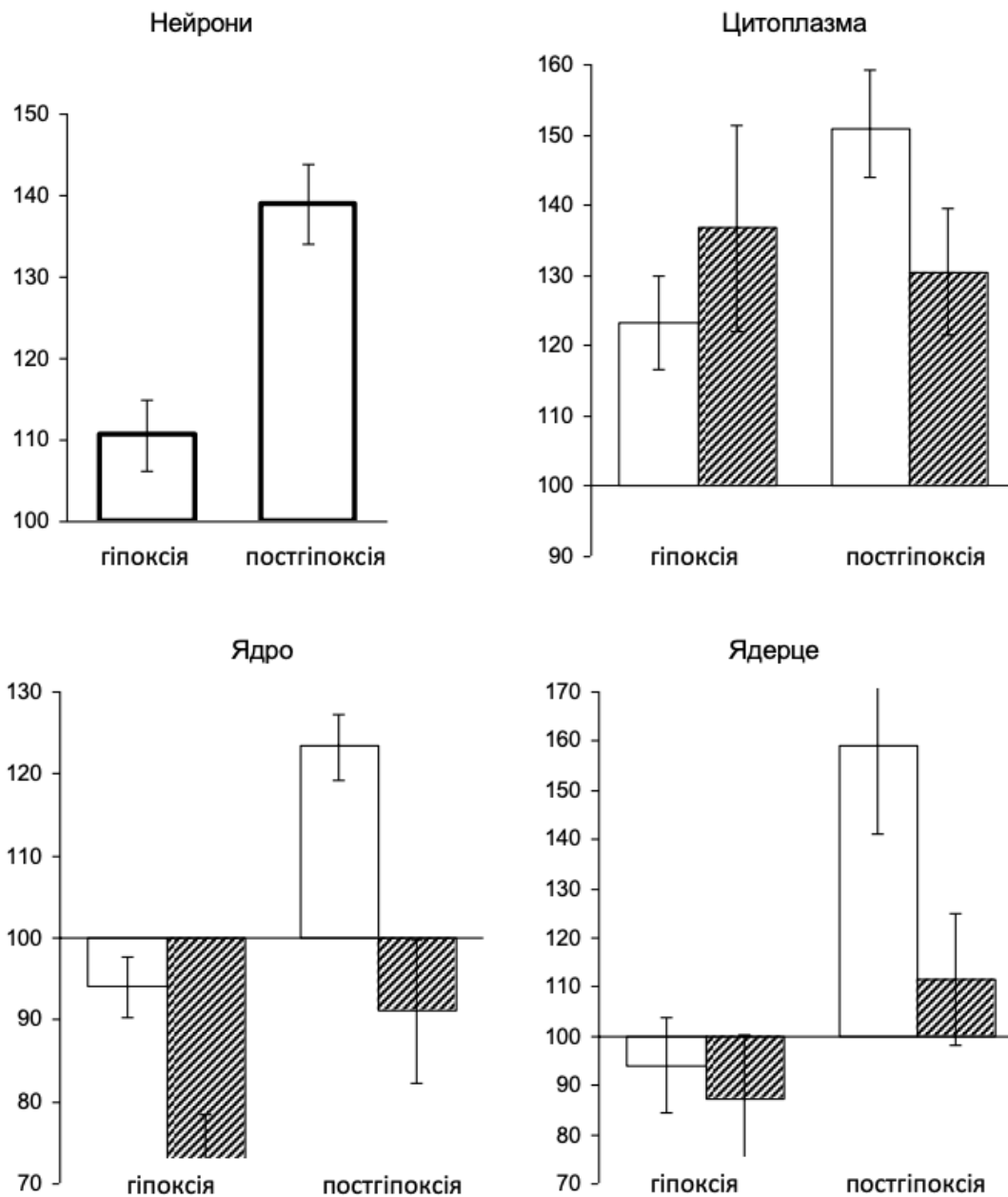


Рисунок 5.2. Динаміка морфометричних показників нейронів медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ в експериментальних тварин (світлі стовпчики – площа, штриховані стовпчики – вміст РНК, показники контролю прийняті за 100%).

При цьому відзначалося збільшення площі ядер клітин порівняно з періодом гіпоксичних впливів на $31,2 \pm 2,1\%$ ($p < 0,001$), а порівняно з контрольною групою площа ядер клітин збільшилася на $23,4 \pm 2,0\%$ ($p < 0,05$).

Ядерно-цитоплазматичний коефіцієнт порівняно з періодом гіпоксичних впливів достовірно не змінювався.

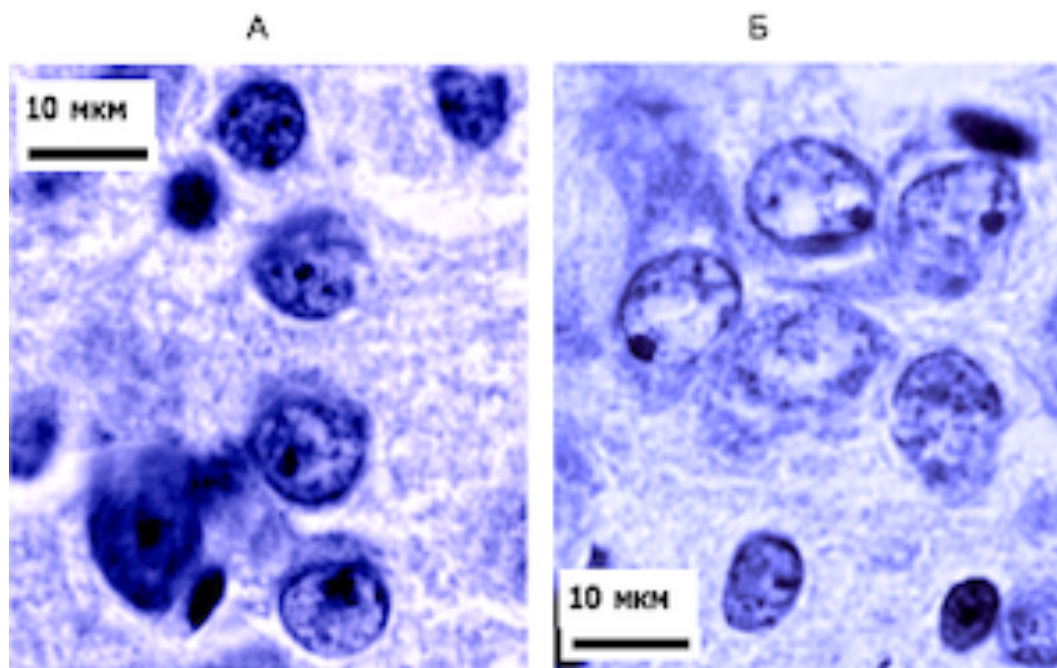


Рисунок 5.3 - Нейрони медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ після гіпоксичних впливів (А) і в постгіпоксичний період (Б). Забарвлення за Ейнарсоном.

Збільшення розмірів нейронів і їх цитоплазми в постгіпоксичному періоді, порівняно з періодом гіпоксичних впливів, не впливало на величину вмісту РНК в цитоплазмі, але приводило до збільшення даного показника в ядрі нейронів мдПВЯ на $24,7 \pm 4,4$ % ($p < 0,005$). При цьому в постгіпоксичному періоді, порівняно з періодом гіпоксичних впливів, в 1,7 раза збільшувалася ($p < 0,001$) площа ядерць нейронів і на $27,9 \pm 6,8$ % зростав ($p < 0,01$) вміст РНК.

На основі отриманих даних, які показали збільшення морфометричних параметрів нейронів і накопичення в їх цитоплазмі РНК, можна зробити висновок про те, що в постгіпоксичному періоді зберігся ефект гіпоксичних впливів, що призводило до помірної гіпертрофії нейронів медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ і підвищення в них біосинтезуючої активності.

5.2 Вазопресинергічна система медіального дрібноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса

Кількісний аналіз імунофлюоресцентної реакції показав, що гіпоксичні впливи призводили до збільшення імунореактивності до вазопресину як в перикаріоні нейронів медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ, так і в аксонах нейронів в ділянці мдПВЯ (табл. 5.2, рис. 5.4).

Таблиця 5.2 - Показники синтезу вазопресину в перикаріоні нейронів медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ ($M \pm m$)

Характеристики	Контроль	Гіпоксичні впливи (15 днів)	Постгіпоксичний період (10 днів)
	1	2	3
Площа імунореактивного матеріалу в нейронах, $\mu\text{км}^2$	$72,0 \pm 1,7^2$	$114,3 \pm 2,4^{1,3}$	$66,4 \pm 2,5^2$
Площа імунореактивності до вазопресину в мдПВЯ, %	$18,55 \pm 3,71^{2,3}$	$38,75 \pm 1,68^{1,3}$	$2,27 \pm 0,21^{1,2}$
Концентрація вазопресину в цитоплазмі, $O_{1\Phi}$	$0,345 \pm 0,020^{2,3}$	$0,864 \pm 0,023^1$	$0,867 \pm 0,078^1$
Вміст вазопресину в нейроні, $O_{1\Phi}$	$25,57 \pm 1,81^{2,3}$	$100,27 \pm 3,80^{1,3}$	$60,35 \pm 6,49^{1,3}$
Вміст вазопресину в мдПВЯ, $O_{1\Phi}$	$630,7 \pm 116,6^2$	$3986,9 \pm 459,1^{1,3}$	$384,4 \pm 65,9^2$

Примітка. Достовірність відмінностей $p < 0,05$ відносно показників контролю (¹), гіпоксичних тренувань (²), постгіпоксичного періоду (³).

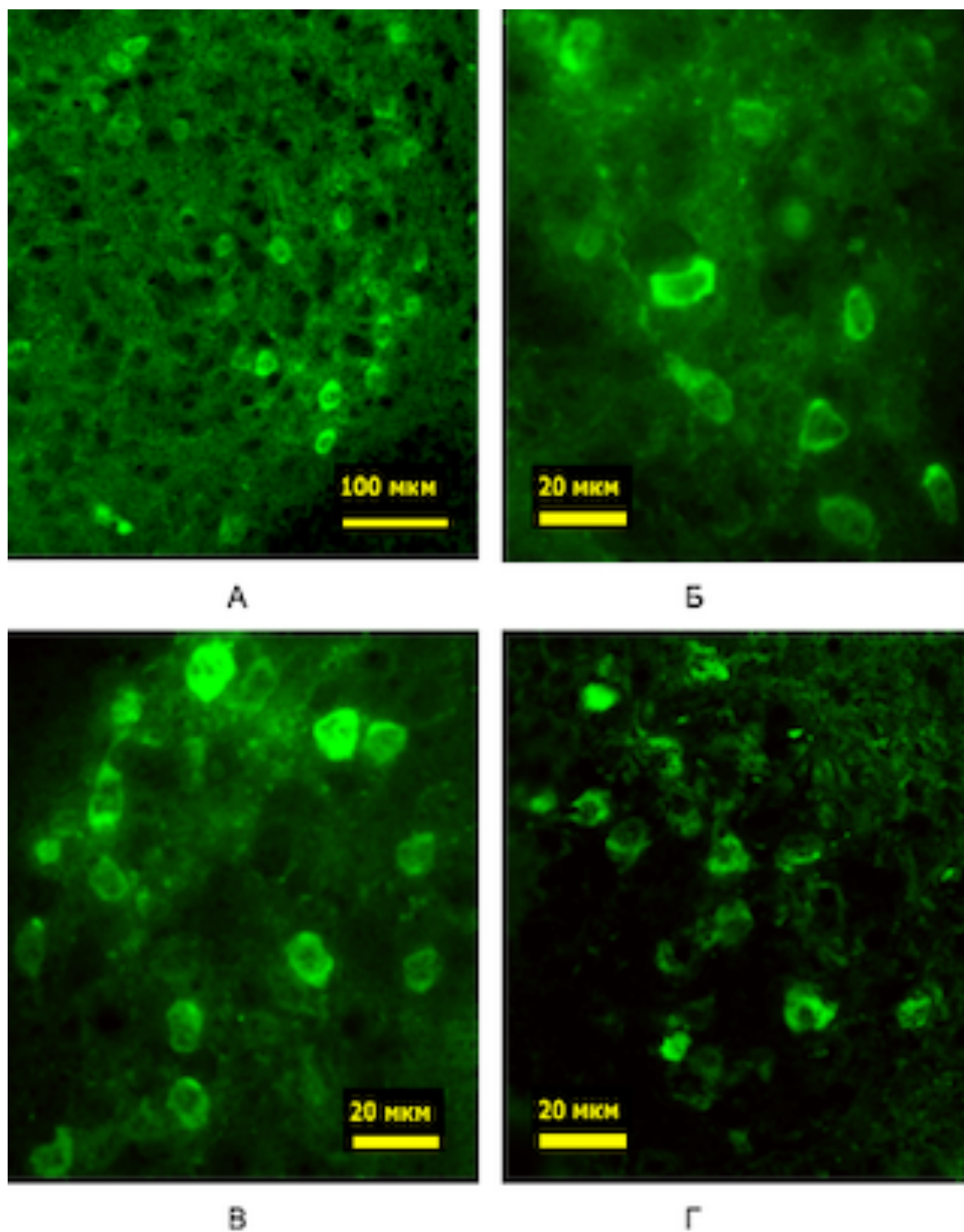


Рисунок 5.4 - Вазопресинергічні нейрони медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ у контрольних тварин (А, Б), після 15 днів гіпоксичних впливів (В) і через 10 днів постгіпоксичного періоду (Г). Реакція непрямой імунофлюоресценції з антитілами до [Arg⁸]-вазопресину щура.

Під дією гіпоксичних впливів у нейронах в 1,6 раза збільшувалася ($p < 0,001$) площа матеріалу, імунореактивного до вазопресину, а відносна

площа імунофлюоресценції в мдПВЯ зростала на 22,5 % ($p < 0,001$), що свідчило про збільшення пулу нейронів, що синтезують вазопресин у відповідь на гіпоксичні впливи. Внаслідок гіпоксичних впливів у перикаріоні нейронів мдПВЯ у 2,5 раза збільшувалася концентрація матеріалу, імунореактивного до вазопресину, а вміст нейрогормона зростав у 4 рази.

В результаті в мдПВЯ сумарний вміст вазопресину збільшувався в 6,3 раза порівняно з показниками контролю. Отримані дані свідчили про те, що гіпоксичні впливи стимулювали збільшення в медіальному дрібноклітинному суб'єдрі ПВЯ популяції вазопресин-синтезуючих нейронів і зростання синтезу вазопресину в структурі (рис. 5.5).

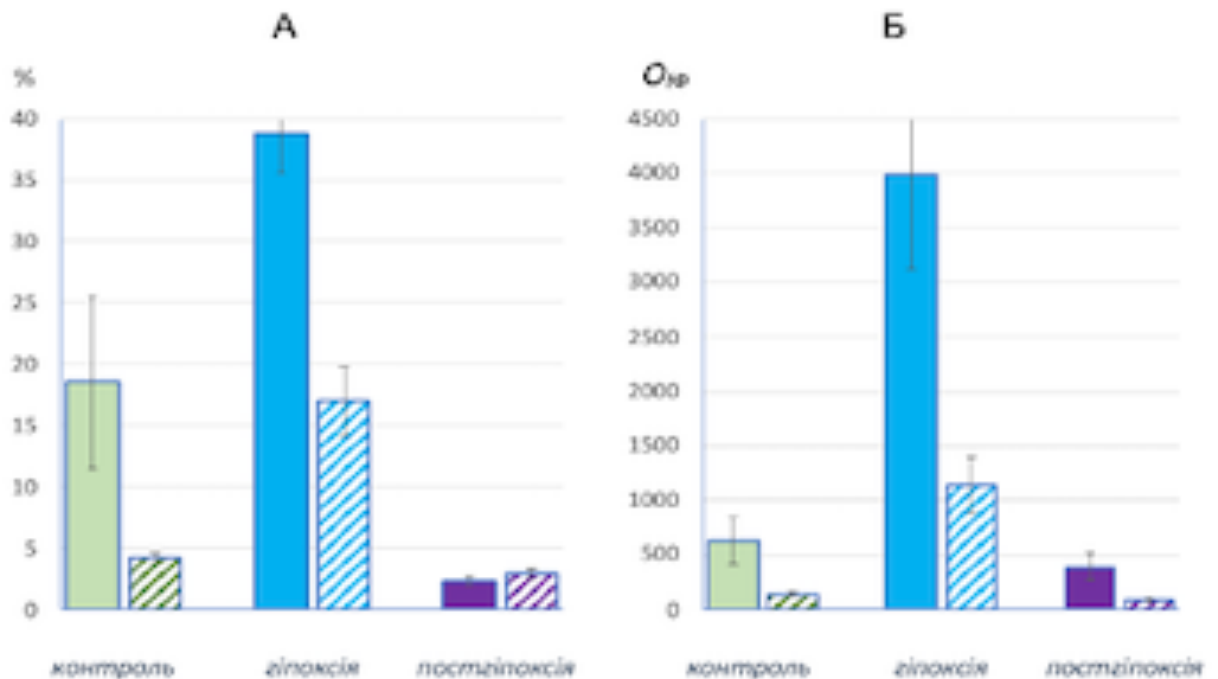


Рисунок 5.5 -Відносна площа імунофлюоресценції (А) і сумарного вмісту вазопресину (Б) в перикаріоні нейронів мдПВЯ (суцільне забарвлення) і їх аксонах (заштриховане забарвлення).

Під дією гіпоксичних впливів в ділянці мдПВЯ відбувалося 10-кратне наростання імунореактивності до вазопресину в аксонах нейронів (табл. 5.3). При цьому відносна площа імунореактивності в аксонах в ділянці мдПВЯ збільшувалася в 4 рази порівняно з контрольними показниками, а вміст імунореактивного вазопресину в аксонах нейронів зростав у 8 разів. Це

свідчило про те, що поряд із посиленням біосинтезу вазопресину, гіпоксичні впливи стимулювали процес нейросекреції з нейронів в аксони.

Таблиця 5.3 - Показники секреції вазопресину в аксонах нейронів медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ ($M \pm m$)

Характеристики	Контроль	Гіпоксичні впливи (15 днів)	Постгіпоксичний період (10 днів)
	1	2	3
Сумарна площа імунореактивного матеріалу в аксонах, мкм ²	312,4±17,9 ^{2,3}	3109,7±273,2 ^{1,3}	224,7±14,6 ^{1,2}
Площа імунореактивності до вазопресину в аксонах мдПВЯ, %	4,165±0,238 ^{2,3}	16,972±1,491 ^{1,3}	2,964±0,193 ^{1,2}
Концентрація вазопресину в аксонах, O _{IF}	0,462±0,043	0,366±0,033	0,397±0,021
Вміст вазопресину в аксонах в мдПВЯ, O _{IF}	140,9±8,0 ^{2,3}	1139,7±132,0 ^{1,3}	89,6±6,9 ^{1,2}

Примітка. Достовірність відмінностей $p < 0,05$ відносно показників контролю (1), гіпоксичних тренувань (2), постгіпоксичного періоду (3).

У постгіпоксичний період відбувалося зменшення площі імунореактивного матеріалу в нейронах мдПВЯ практично у 2 рази порівняно з гіпоксичним періодом, і даний показник відновлювався до рівня контролю. Внаслідок цього в нейроцитах на 40 % знижувався ($p < 0,001$) вміст вазопресину порівняно з гіпоксичним періодом, але відносно показників контролю даний показник був в 2,4 рази вищим ($p < 0,001$).

Характерно, що в постгіпоксичному періоді відносна площа імунореактивності в мдПВЯ, яка припадає на вазопресинергічні нейрони,

скорочувалася в 17 разів і була в 7 разів меншою, ніж в контролі. Дані результати вказували на те, що в постгіпоксичний період істотно зменшувалася частка дрібноклітинних нейронів мдПВЯ, які брали участь в 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 зменшенням площі матеріалу, імунореактивного до вазопресину, в аксонах нейронів мдПВЯ, причому даний показник ставав на 28 % нижчим ($p < 0,001$), а його відносна величина в структурі зменшувалася в 1,4 раза ($p < 0,001$) відносно показників контролю.

Істотне скорочення імунореактивного матеріалу в аксонах нейронів у постгіпоксичний період призводило до зменшення сумарного вмісту вазопресину в аксонах в ділянці мдПВЯ, і даний показник становив лише 63,5 % ($p < 0,001$) від величини у контрольних тварин. Таким чином, можна зробити висновок, що в постгіпоксичний період в мдПВЯ зниження біосинтезу вазопресину поєднувалося з обмеженням процесів нейросекреції.

5.3. Експресія білка cFos у нейронах медіального дрібноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса

Реакції непрямой імунофлюоресценції з первинними антитілами до білка cFos і вторинними антитілами, кон'югованими з FITC, виявили зони накопичення білка в ділянці нейронів мдПВЯ (рис. 5.6А). У більшості імунопозитивних до білка cFos нейроцитах імунореактивний матеріал займав практично всю ділянку цитоплазми. При цьому у контрольних тварин тільки $4,14 \pm 0,32$ % загальної площі мдПВЯ була імунопозитивною до білка cFos (табл. 5.4).

Гіпоксичні впливи в мдПВЯ не призводили до статистично достовірної зміни площі імунореактивності до білка cFos і відносної частки імунопозитивних нейроцитів в структурі ($p > 0,05$). Однак, концентрація білка

cFos у нейронах мдПВЯ збільшувалася на $26,5 \pm 6,3\%$ ($p < 0,05$), що призводило до наростання його вмісту в структурі на $37,1 \pm 11,9\%$ ($p < 0,05$) (рис. 5.6Б).

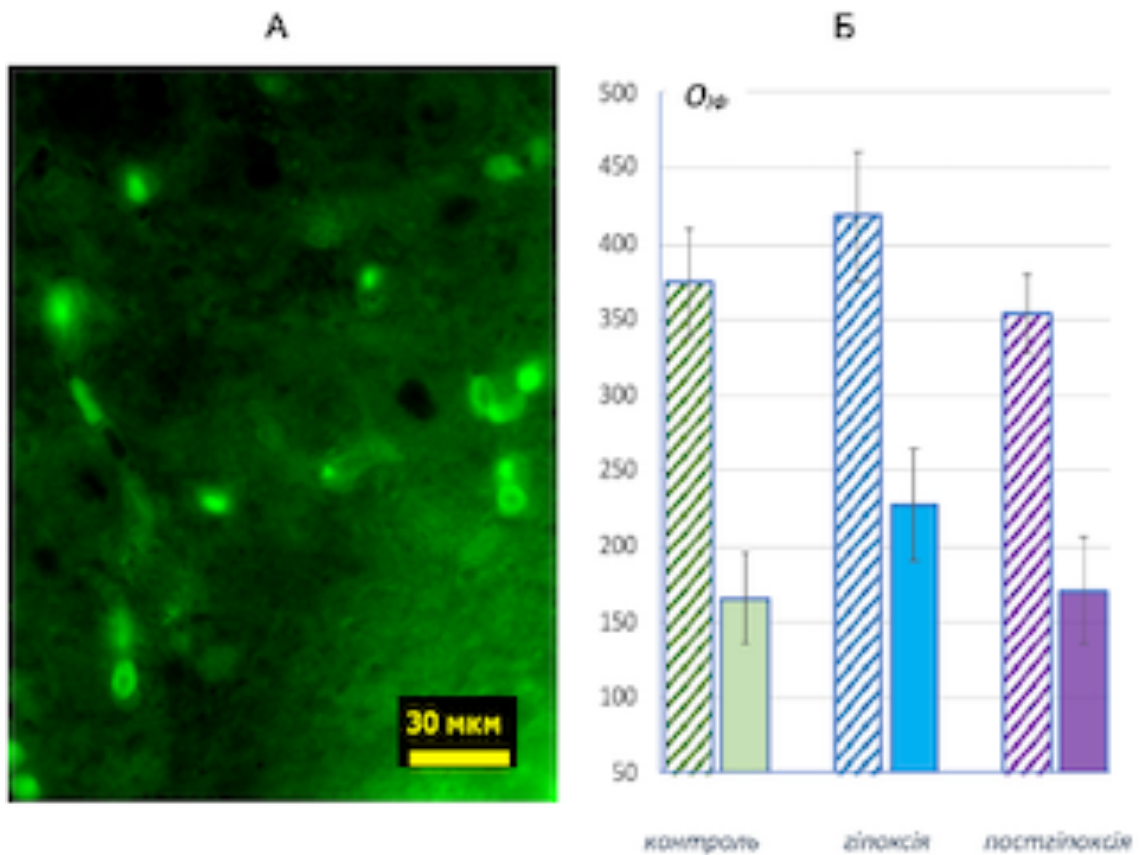


Рисунок 5.6 - Реакція непрямой імунофлуоресценції з антитілами до білка cFos (А), показники площі імунореактивності ($\mu\text{м}^2$, заштриховане забарвлення) і вміст білка cFos (O_{IF} , суцільне забарвлення) у медіальному дрібноклітинному суб'єдрі ПВЯ.

У постгіпоксичний період площа імунореактивності до білка cFos в ділянці мдПВЯ зберігалася в межах показників контролю, але у зв'язку з її динамічними змінами в експерименті демонструвала статистично значуще скорочення порівняно з періодом гіпоксичних впливів – зниження на 15,3 % ($p < 0,02$). У нейронах мдПВЯ знижувалася концентрація білка cFos і зменшувався його вміст в структурі, значення яких досягали показників контролю.

Таблиця 5.4 - Показники експресії білка cFos у медіальному дрібноклітинному суб'ядрі ПВЯ ($M \pm m$)

Характеристики	Контроль	Гіпоксичні впливи (15 днів)	Постгіпоксичний період (10 днів)
	1	2	3
Сумарна площа імунореактивного матеріалу в мдПВЯ, мкм ²	374,2±18,7	418,3±22,2 ³	354,3±13,7 ²
Відносна площа імунореактивності в мдПВЯ, %	4,14±0,32	4,63±0,24	3,92±0,26
Концентрація cFos у нейронах, O _{1ф}	0,421±0,037 ²	0,533±0,026 ^{1,3}	0,449±0,021 ²
Вміст cFos у мдПВЯ, O _{1ф}	165,7±15,9 ²	227,2±19,8 ^{1,3}	170,5±18,5 ²

Примітка. Достовірність відмінностей $p < 0,05$ відносно показників контролю (1), гіпоксичних тренувань (2), постгіпоксичного періоду (3).

Таким чином, гіпоксичні впливи стимулювали в нейронах мдПВЯ синтез білка cFos, що свідчило про активацію нейросекреторних процесів у нейронах і підтверджувалося посиленням синтезу і секреції вазопресину, про що було зазначено раніше. У той же час, припинення гіпоксичної стимуляції знижувало рівень синтезу білка cFos в постгіпоксичний період і, ймовірно, означало функціональне відновлення нейросекреторної активності нейронів мдПВЯ до природних контрольних показників.

5.4. Експресія білків HIF-1 α і HIF-3 α в нейронах медіального дрібноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса

За допомогою реакції непрямой імунофлюоресценції з первинними антитілами до білків HIF і вторинними антитілами, кон'югованими з FITC, в нейронах мдПВЯ були ідентифіковані зони накопичення білків HIF-1 α і HIF-3 α (рис. 5.7). Імунофлюоресценція до білків HIF носила дифузний характер розподілу в нейронах, в більшості випадків цитоплазма нервових клітин була практично повністю забарвленою.

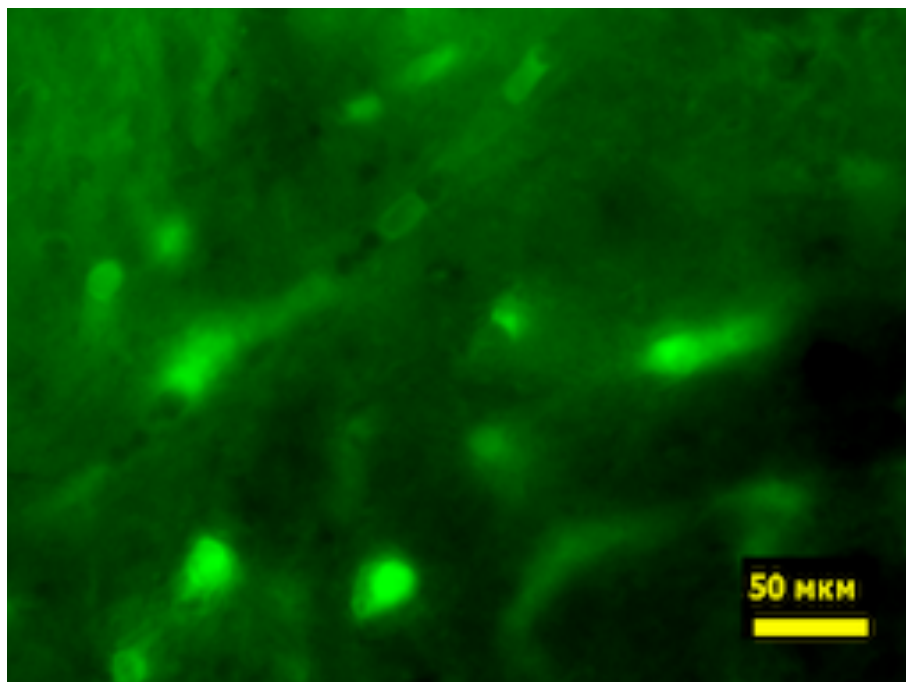


Рисунок 5.7 - Ідентифікація білка HIF-1 α в медіальному дрібноклітинному суб'ядрі ПВЯ. Реакція непрямой імунофлюоресценції з антитілами до білка HIF-1 α .

Кількісний аналіз імунофлюоресцентної реакції показав, що у контрольних тварин у нейронах мдПВЯ площа матеріалу, імунореактивного до білка HIF-1 α , займала $2,670 \pm 0,099$ % загальної площі структури і на 12,0 % перевищувала ($p < 0,02$) показники імунореактивності до білка HIF-3 α (табл. 5.5, 5.6, рис. 5.8). Крім того, вміст білка HIF-1 α в нейронах мдПВЯ був на 23,2% вищим ($p < 0,001$), ніж вміст білка HIF-3 α .

Таблиця 5.5 - Показники експресії білка HIF-1 α в медіальному дрібноклітинному суб'ядрі ПВЯ (M \pm m)

Характеристики	Контроль	Гіпоксичні впливи (15 днів)	Постгіпоксичний період (10 днів)
	1	2	3
Площа імунореактивного матеріалу в нейронах, мкм ²	2,670 \pm 0,099 ^{2,3}	4,237 \pm 0,375 ¹	4,553 \pm 0,312 ¹
Вміст HIF-1 α в нейронах, O ₁ F	0,200 \pm 0,011 ^{2,3}	0,493 \pm 0,032 ^{1,3}	0,396 \pm 0,033 ^{1,2}

Примітка. Достовірність відмінностей $p < 0,05$ відносно показників контролю (1), гіпоксичних тренувань (2), постгіпоксичного періоду (3).

Таблиця 5.6 - Показники експресії білка HIF-3 α в медіальному дрібноклітинному суб'ядрі ПВЯ (M \pm m)

Характеристики	Контроль	Гіпоксичні впливи (15 днів)	Постгіпоксичний період (10 днів)
	1	2	3
Площа імунореактивного матеріалу в нейронах, мкм ²	2,351 \pm 0,077 ³	2,615 \pm 0,152 ³	3,308 \pm 0,140 ^{1,2}
Вміст HIF-3 α в нейронах, O ₁ F	0,145 \pm 0,007 ^{2,3}	0,253 \pm 0,017 ¹	0,263 \pm 0,016 ¹

Примітка. Достовірність відмінностей $p < 0,05$ відносно показників контролю (1), гіпоксичних тренувань (2), постгіпоксичного періоду (3).

Гіпоксичні впливи призводили до наростання площі імунореактивності до білка HIF-1 α в 1,6 раза ($p < 0,001$) і наростання у 2,5 раза його вмісту в нейронах (табл. 5.5). У той же час, гіпоксичні впливи не впливали на

параметри площі імунореактивності до білка HIF-3 α , проте на 73,5% ($p < 0,001$) збільшували його вміст в мдПВЯ.

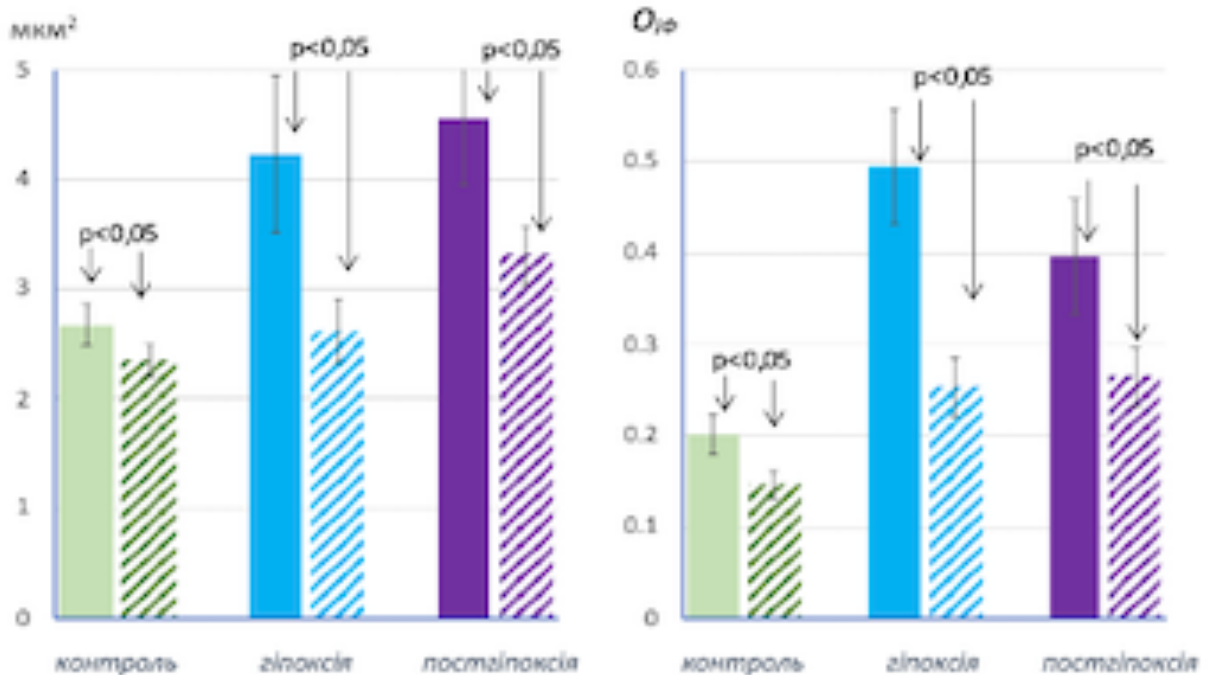


Рисунок 5.8 - Площа імунореактивного матеріалу (мкм²) і вміст в нейронах медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ (O_{IФ}) білків HIF-1 α (суцільне забарвлення) і HIF-3 α (заштриховане забарвлення).

При цьому вміст у нейронах мдПВЯ білка HIF-1 α був у 2 рази вищим ($p < 0,001$), ніж білка HIF-3 α . Отримані дані свідчили про високу реактивність нейросекреторних клітин медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ на гіпоксичний стимул, а посилення в них синтезу і секреції вазопресину, показані раніше, очевидно могли бути пов'язані з регулюючим впливом білків сімейства HIF на активність гена вазопресину.

У постгіпоксичний період в ділянці мдПВЯ площа імунореактивності до білка HIF-1 α не скорочувалася порівняно з періодом гіпоксичних впливів, а вміст білка в нейронах хоч і дещо зменшувався, але, тим не менш, залишився у 2 рази вищим, ніж в контролі. Поряд із цим в ділянці мдПВЯ спостерігалася збільшення імунореактивності до білка HIF-3 α , величина якої

на 40,1 % перевищувала ($p < 0,001$) показники контролю. При цьому збільшення імунореактивності не відобразалося на вмісті даного білка в структурі ($p > 0,05$). Отримані дані, ймовірно, свідчили про збереження високого рівня реактивності нейронів мдПВЯ до гіпоксичного стимулу і в найближчий постгіпоксичний період.

Висновок

Проведені дослідження виявили особливості реакції дрібноклітинних вазопресинергічних нейронів медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ на багатоденну переривчасту дію гіпоксичної гіпоксії і особливості перебігу постгіпоксичного періоду. Була встановлена висока реактивність нейросекреторних клітин мдПВЯ до дії гіпоксичного стимула, що проявлялося збільшенням у структурі імунореактивності до специфічних маркерів клітинної реакції на гіпоксію – білків сімейства HIF, і зростанням їх вмісту. Характерно, що і найближчий постгіпоксичний період (10 днів) демонстрував високий рівень експресії білків HIF-1 α і HIF-3 α в вазопресинергічних нейронах медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ, що, мабуть, свідчить про формування системного структурного сліду адаптації до гіпоксії в цьому важливому, з точки зору механізмів інтегральної нейросекреторної відповіді на стрес, відділі мозку, викликаного природними факторами.

Результати досліджень, наведені в цій главі, опубліковані в роботах [315-318, 321-325, 330].

РОЗДІЛ 6

ВПЛИВ ПЕРЕРИВЧАСТОЇ ГІПОКСІЇ НА ЕКСПРЕСІЮ мРНК ДО БІЛКА HIF-1 α І HIF-3 α В МЕДІОБАЗАЛЬНОМУ ГІПОТАЛАМУСІ

Цей розділ містить результати дослідження, присвячені вивченню експресії генів *hif-1 α* і *hif-3 α* в медіобазальному гіпоталамусі у щурів лінії Вістар в нормі і при дії переривчастої гіпоксичної гіпоксії, для чого була виміряна концентрація мРНК до білків HIF-1 α і HIF-3 α і проведено порівняння з показниками вмісту самих білків в ділянці супраоптичного ядра гіпоталамуса, а також задньолатерального крупноклітинного і медіального дрібноклітинного суб'ядер паравентрикулярного ядра гіпоталамуса, вивченими в попередніх розділах цього дослідження.

Результати проведених досліджень показали, що гіпоксичні впливи приводять практично до 13-кратного підвищення концентрації мРНК до білка HIF-1 α в медіобазальному гіпоталамусі (табл. 6.1, рис. 6.1).

Таблиця 6.1 - Показники концентрації білків HIF-1 α і HIF-3 α в медіобазальному гіпоталамусі (M \pm m)

Характеристики	Контроль	Гіпоксичні впливи (15 днів)	Постгіпоксичний період (10 днів)
	1	2	3
Білок HIF-1 α , у. од.	1,00 \pm 0,43 ^{2,3}	12,80 \pm 1,53 ^{1,3}	2,50 \pm 0,61 ^{1,2}
Білок HIF-3 α , у. од.	1,00 \pm 0,26 ²	8,56 \pm 0,84 ^{1,3}	1,25 \pm 0,33 ²

Примітка. Достовірність відмінностей $p < 0,05$ відносно показників контролю (¹), гіпоксичних тренувань (²), постгіпоксичного періоду (³).

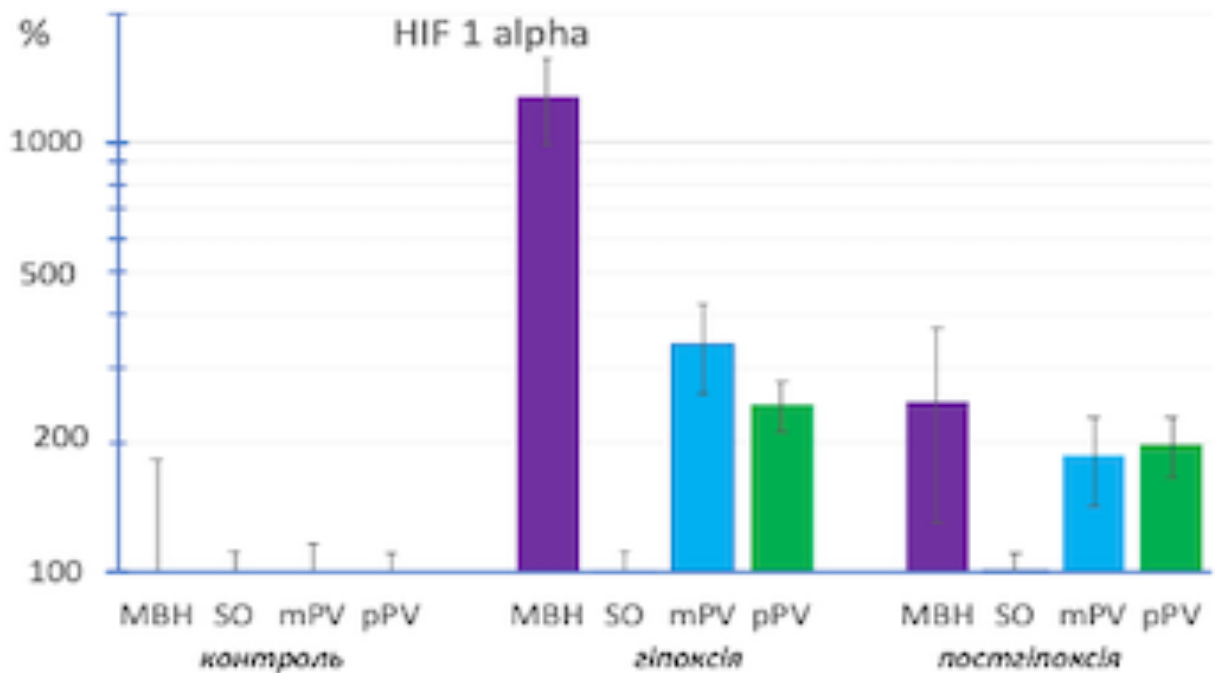


Рисунок 6.1 - Відносні (контроль = 100%) зміни концентрації мРНК до білка HIF-1 α в медіобазальному гіпоталамусі (MBH) і вмісту білка HIF-1 α в супраоптичному ядрі (SO), задньолатеральному крупноклітинному суб'ядрі (mPV) і медіальному дрібноклітинному суб'ядрі (pPV) паравентрикулярного ядра гіпоталамуса.

Це вказує на виражену відповідь нейронів медіобазального гіпоталамуса, до якого належать досліджувані структури, на гіпоксичний стимул. При цьому попередні дослідження, проведені за допомогою імуофлюоресцентного метода і викладені у попередніх розділах, показали, що тільки нейросекреторні нейрони паравентрикулярного ядра гіпоталамуса демонстрували достовірне наростання вмісту білка HIF-1 α в структурі у відповідь на гіпоксію: найбільший ступінь приросту (в 3,4 рази) демонстрували крупноклітинні вазопресинергічні нейрони злКПВЯ, дещо менший (у 2,5 рази щодо показників в злКПВЯ) демонстрували дрібноклітинні вазопресинергічні нейрони мдПВЯ. У той же час, гіпоксичні впливи не відображалися на показниках вмісту білка HIF-1 α в крупноклітинних вазопресинергічних нейронах СОЯ.

Постгіпоксичний період характеризувався зниженням концентрації мРНК до білка HIF-1 α в медіобазальному гіпоталамусі щодо показників контролю. При цьому у вазопресинергічних нейронах злкПВЯ і мдПВЯ показники вмісту білка HIF-1 α знижувалися, залишаючись достовірно вищими ($p < 0,001$), ніж у контролі. Такі показники, ймовірно свідчать про більш високу реактивність до гіпоксії власне вазопресинергічних нейронів ПВЯ порівняно з іншими структурами медіобазального гіпоталамуса.

Гіпоксичні впливи також призводили до посилення експресії гена *hif-3 α* в медіобазальному гіпоталамусі і спричиняли зростання концентрації мРНК до білка HIF-3 α у 8,6 раза (табл. 6.1, рис. 6.2).

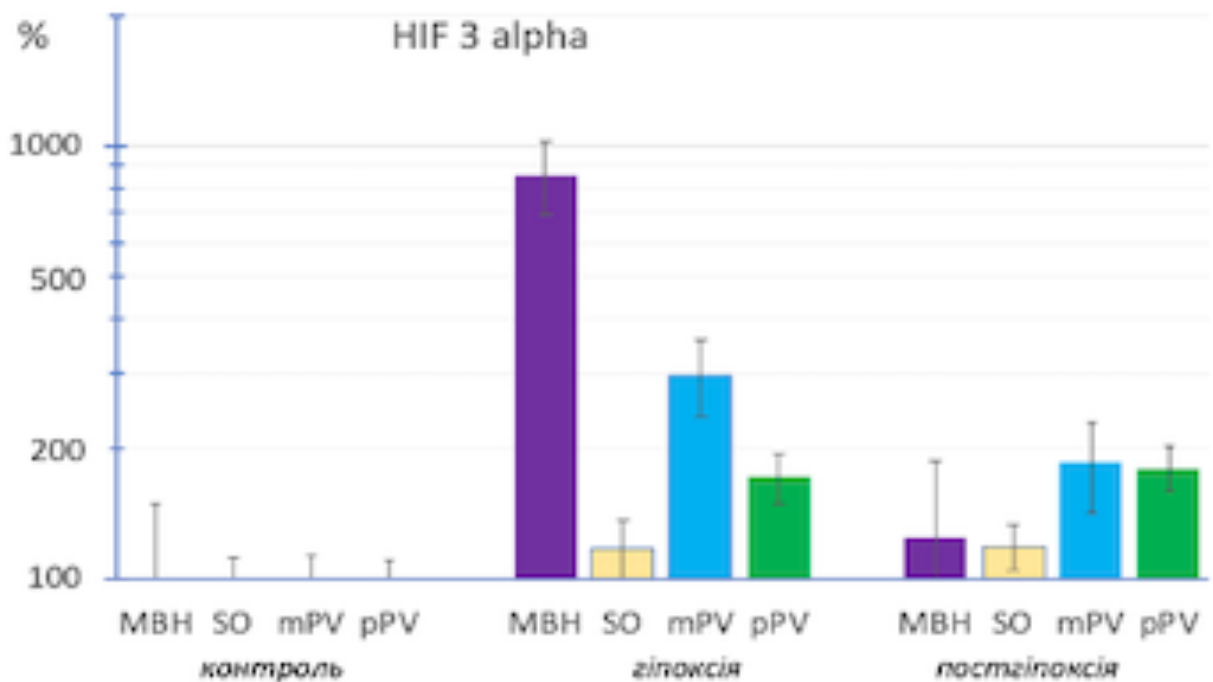


Рисунок 6.2 - Відносні (контроль = 100%) зміни концентрації мРНК до білка HIF-3 α в медіобазальному гіпоталамусі (MBH) і вмісту білка HIF-3 α в супраоптичному ядрі (SO), задньолатеральному крупноклітинному суб'яздрі (mPV) і медіальному дрібноклітинному суб'яздрі (pPV) паравентрикулярного ядра гіпоталамуса.

При цьому, за даними імунофлюоресцентного дослідження експресії HIF-3 α в структурах гіпоталамуса, було встановлено достовірно зростання

вмісту білка HIF-3 α в ділянці крупноклітинних вазопресинергічних нейронів злкПВЯ у 3 рази і дещо менше – на 73% відносно контролю – у дрібноклітинних вазопресинергічних нейронах мдПВЯ. У той же час, гіпоксичні впливи не впливали на вміст білка HIF-3 α в крупноклітинних вазопресинергічних нейронах СОЯ. Наведені дані дозволяють зробити висновок про схожу за параметрами реакцію на багатоденну переривчасту дію гіпоксичної гіпоксії крупноклітинних і дрібноклітинних вазопресинергічних нейронів ПВЯ.

У постгіпоксичний період зазначалося зниження концентрації мРНК до білка HIF-3 α в медіобазальному гіпоталамусі до показників контролю. При цьому в вазопресинергічних нейронах злкПВЯ показники вмісту білка HIF-3 α знижувалися, залишаючись достовірно вищими ($p < 0,001$), ніж у контролі, а в дрібноклітинних нейронах мдПВЯ вміст білка HIF-3 α залишався на рівні показників гіпоксичного періоду ($p > 0,05$).

Таким чином, проведені дослідження продемонстрували високий рівень експресії генів *hif-1 α* і *hif-3 α* в медіобазальному гіпоталамусі на гіпоксичний стимул і підтвердили раніше отримані дані про високу реактивність до гіпоксії вазопресинергічних нейронів ПВЯ, основанийі на кількісному визначенні білків HIF-1 α і HIF-3 α у паравентрикулярному ядрі гіпоталамуса.

Результати досліджень, наведені в цій главі, опубліковані в роботах [315, 318, 322, 324, 330-331, 344].

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Нейроендокринні реакції 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 [9-10, 22]. На рівні гіпоталамуса основними структурними стрес-реалізуючими компонентами є кортикотропін-рилізінг-гормон-синтезуючі нейрони і аргінін-вазопресин-синтезуючі нейрони, які у відповідь на гострий стрес здатні швидко реагувати збільшенням секреції гормонів, але при хронічному стресі реагують деяким уповільненням секреції кортиколиберину при збереженні або значному збільшенні секреції вазопресину [3, 23-25, 42]. Відомо, що нейроендокринна система гіпоталамуса і функціонально пов'язана з нею гіпофізарно-адренкортикальна система має визначальне значення для підтримки стану здоров'я і відновлення гомеостазу при дії екстремальних факторів [9-10, 22, 31]. При цьому дизрегуляція з боку вазопресинергічної системи гіпоталамуса, яка є філогенетичне найбільш стародавнім компонентом нейроендокринного гіпоталамуса, призводить до появи так званих хвороб, пов'язаних із хронічним стресом [8-9, 18, 25-26, 32]. Основними вазопресинергічними структурами гіпоталамуса, які беруть участь у нейроендокринній відповіді на стрес, є крупноклітинні нейрони СОЯ і злкПВЯ, а також дрібноклітинні нейрони мдПВЯ [7, 19-20, 102]. Вазопресинергічній системі надають важливу роль у програмуванні механізмів взаємовідносин між нейроендокринною та імунною системами [10, 24, 50], і пов'язану з цим її роль у механізмах виникнення запалення і в патогенезі інфекційних хвороб [53]. Завдяки функціональній пластичності вазопресинергічних нейронів гіпоталамуса вазопресин може виступати як ендогенний регулятор і координуючий нейротрансміттер у взаємодії центральної і периферичної нервової системи [11-12]. Все вищеперераховане свідчить про важливу роль вазопресинергічної системи гіпоталамуса в

організації нейроендокринної відповіді на гострий і хронічний стрес, а також у формуванні адаптаційних реакцій організму і механізмів підтримки внутрішнього гомеостазу організму [1-2, 4-10, 26, 31, 87].

Слід зауважити, що одним з найбільш поширених патологічних впливів на організм є дія гіпоксії, в тому числі як зовнішнього фактора. Багатоденний вплив дозованої екзогенної гіпоксії призводить до активації гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальної системи як у тварин, так і у людини, і супроводжується зміною функціональної активності гіпоталамічних пептидергічних нейронів [37, 55, 61]. При цьому переривчастий режим гіпоксичних впливів підвищує адаптивні властивості організму і призводить до підвищення його стійкості до дії багатьох патогенних факторів середовища: гострої гіпоксії, гіперкапнії, токсичної дії високого тиску кисню, гіпокінезії, впливу високої температури і глибокого охолодження, іонізуючого випромінювання, фізичного навантаження [66, 68]. Однак, питання участі вазопресинергічної системи гіпоталамуса в центральних механізмах адаптації до гіпоксичної гіпоксії розглядається лише в поодиноких роботах і, отже, є недостатньо вивченим [37, 55, 66, 68].

Здатність організму адаптуватися до умов гіпоксичної гіпоксії, в тому числі і високогір'я, в значній мірі визначається активністю генів сімейства *hif* [231, 234, 241]. Це пов'язано з тим, що продукти активації генів *hif* – білки сімейства HIF – є еволюційно сформованими внутрішньоклітинними рецепторами кисневої напруги і активують більше 40 регуляторних генів, які забезпечують механізми адаптації клітини до дефіциту кисню в широкому діапазоні його концентрація в повітряному середовищі – від 21 % до 1 % [191, 241]. У нервовій системі білки сімейства HIF забезпечують нейрогенез [222] і нейрональну пластичність [234, 332]. Вважається, що підвищення концентрації білків сімейства HIF є найбільш ранньою реакцією тканини на гіпоксію [193, 219], що значною мірою забезпечує нейропротекцію [210, 218, 332]. Тому, в умовах проведеного експерименту ми, в першу чергу, повинні

охарактеризувати показники експресії білків сімейства HIF в медіобазальному гіпоталамусі і в нейронах ПВЯ і СОЯ.

Нами було встановлено (рис. 7.1), що гіпоксичні впливи приводили до 13-кратного зростання в медіобазальному гіпоталамусі рівня мРНК до білка HIF-1 α , показник якого в постгіпоксичний період знижувався, але залишався вищим, ніж у контролі у 2,5 раза ($p < 0,001$). Це свідчило про підвищення експресії гена *hif-1 α* не тільки в умовах дії переривчастої гіпоксії, але також про збереження даного ефекту в постгіпоксичний період.

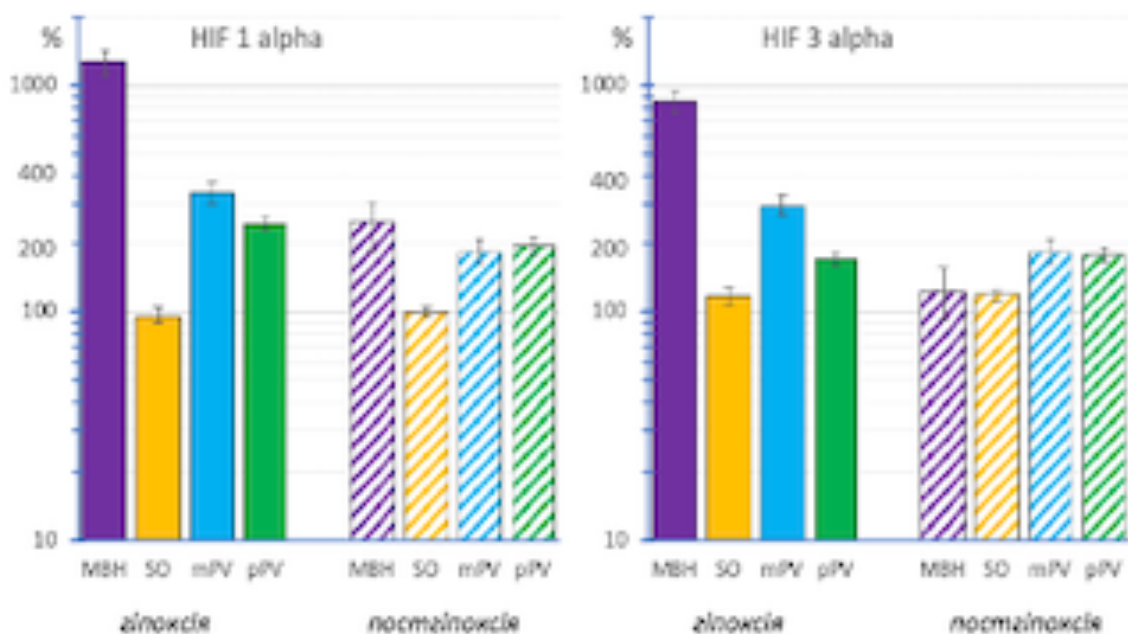


Рисунок 7.1 - Відносні (контроль = 100%) зміни концентрації мРНК до білків HIF-1 α і HIF-3 α в медіобазальному гіпоталамусі (MBH) і вмісту білків в супраоптичному ядрі (SO), задньолатеральному крупноклітинному суб'ядрі (mPV) і медіальному дрібноклітинному суб'ядрі (pPV) ПВЯ.

Відомо, що медіобазальний гіпоталамус є зоною концентрації пептидергічних нейронів, які здійснюють нейроендокринний контроль аденогіпофіза і периферичних ендокринних залоз. У цю зону входить ПВЯ, нейрони яких є основним джерелом синтезу кортикотропін-релізінг гормону (CRH) і вазопресину – ключових гормонів адаптації організму до дії стресів різного генезу. Раніше нами було встановлено підвищення рівня утворення

CRH і вазопресину в ПВЯ при дії гіпоксичної гіпоксії [33, 55, 61], і факт підвищення експресії гена *hif-1α* в даному випадку можна розглядати як сигнальний механізм активації пептидергічних нейронів ПВЯ у відповідь на гіпоксичний стимул. Підтвердженням цього було збільшення синтезу HIF-1α в нейронах ПВЯ.

У ділянці мдПВЯ, де поряд із вазопресин-синтезуючими нейронами локалізується основна маса CRH-синтезуючих нейронів гіпоталамуса, спостерігалось наростання на 60 % площі матеріалу, імунореактивного до білка HIF-1α, і 2,5-кратне підвищення вмісту білка HIF-1α в нейронах. Подібні зміни відзначалися і у вазопресин-синтезуючих нейронах злкПВЯ, де площа матеріалу, імунореактивного до HIF-1α, збільшувалася на 55 %, а вміст білка HIF-1α підвищувався в 3,4 раза. У дослідженнях L.Terraneo зі співавт. (2017) було показано, що у подібних гіпоксичних умовах (повітряне середовище з 10% вмістом кисню) концентрація білка HIF-1α підвищувалася в основному в цитоплазмі нейронів, а не в їх ядрі [339]. Підвищення функціональної активності пептидергічних нейронів ПВЯ у відповідь на гіпоксичні впливи підтверджувалося також рутинними методами світлооптичної морфометрії і денситометрії: відзначалася гіпертрофія нейронів мдПВЯ (збільшення площі клітин на 10,5 %, $p < 0,001$; підвищення концентрації РНК на 14,1 %, $p < 0,001$). Гіпоксичні впливи приводили до підвищення імунореактивності до білка HIF-1α в ділянці крупноклітинного суб'ядра злкПВЯ на 55 % ($p < 0,005$) зі зростанням вмісту білка HIF-1α в структурі в 3,4 раза ($p < 0,001$).

Разом із тим, в ділянці крупноклітинних нейронів СОЯ гіпоксичні впливи призводили до скорочення площі імунореактивності до білка HIF-1α в нейронах на 46 % ($p < 0,001$) без зміни його вмісту в структурі ($p > 0,5$). На відміну від HIF-1α, збільшення експресії білка HIF-3α у відповідь на гіпоксичні впливи більшою мірою проявлялося в крупноклітинному злкПВЯ, в якому площа імунореактивності до білка HIF-3α збільшувалася у 2 рази ($p < 0,001$), а вміст самого білка – в 3 рази ($p < 0,001$) (рис.7.1).

У дрібноклітинному мдПВЯ площа імунореактивності до білка HIF-3 α не змінювалася ($p>0,1$), але вміст білка у структурі збільшувався на 73,5 % ($p<0,001$). У ділянці крупноклітинних нейронів СОЯ гіпоксичні тренування призводили до помірного скорочення 13,5% ($p<0,05$) площі імунореактивності до білка HIF-3 α у нейронах без статистично значущих змін вмісту білка ($p>0,1$). На тлі цього, у медіабазальному гіпоталамусі спостерігалось підвищення рівня мРНК до HIF-3 α в 8,6 раза, що вказувало на загальну для нейросекреторних нейронів гіпоталамуса активацію гена *hif-3 α* у відповідь на гіпоксичний стимул.

Отримані дані свідчать про те, що підвищення експресії генів *hif* в даному випадку можна розглядати як сигнальний механізм активації пептидергічних нейронів ПВЯ у відповідь на гіпоксичний стимул. Дійсно, раніше нами було встановлено підвищення рівня секреції CRH і вазопресину в ПВЯ при дії гіпоксичної гіпоксії [37, 55, 61], тобто нейропептидів, які реалізують механізми стероїдогенезу і адаптації організму до дії стресорів різного генезу [29, 337]. У той же час, пригнічення синтезу білків сімейства HIF в СОЯ свідчить про те, що вазопресин-синтезуючі нейрони СОЯ, мабуть, не беруть участі в механізмах адаптаційної відповіді на гіпоксію. Це узгоджується з раніше встановленим фактом, що багатоденна гіпоксична гіпоксія призводить до дистрофічних змін в СОЯ [37, 314]. Таким чином, ми вважаємо, що активація генів сімейства *hif* при багатоденній дії гіпоксичної гіпоксії може бути одним з молекулярних маркерів активації пептидергічних нейронів нейросекреторних ядер гіпоталамуса, що беруть участь в механізмах нейроендокринної відповіді на стрес. У зв'язку з цим, ефективність гіпоталамічних механізмів адаптації до гіпоксії, опосередкованих HIF, була нами оцінена через 10 днів після закінчення гіпоксичних впливів.

Через 10 днів після закінчення дії гіпоксичних впливів рівень мРНК до HIF-1 α в медіобазальному гіпоталамусі істотно знижувався, але залишався при цьому у 2,5 раза ($p<0,001$) вищим, ніж в контролі. Характерно, що через 10 днів після закінчення гіпоксичних впливів гіпертрофія нейронів мдПВЯ

зберігалася, а вміст у них білка HIF-1 α становив 80 % від показника, отриманого після закінчення гіпоксичних впливів. У той же час, функціональна активність вазопресинергічних нейронів злкПВЯ в постгіпоксичний період дещо знижувалася: незважаючи на збереження гіпертрофії нейронів вміст у них білка HIF-1 α становив лише 55 % від показника після закінчення гіпоксичних впливів, що, однак, було практично у 2 рази вище, ніж у тварин контрольної групи. У крупноклітинних нейронах СОЯ в постгіпоксичний період вміст білка HIF-1 α не змінювався, хоча відзначалося деяке відновлення параметрів імунореактивності до HIF-1 α , площа якої зростала на 20 % ($p < 0,002$) відносно часу закінчення гіпоксичних впливів.

У той же час, концентрація мРНК до HIF-3 α в медіобазальному гіпоталамусі в постгіпоксичний період знижувалася до контрольних значень. При цьому істотно зменшувалася площа імунореактивності до білка HIF-3 α і вміст самого білка в крупноклітинних нейронах злкПВЯ, хоча зазначені показники залишалися на 20-25 % вищими, ніж у контролі ($p < 0,05$). У СОЯ показники площі імунореактивності до білка HIF-3 α відновлювалися до контрольних значень, проте вміст самого білка в структурі не змінювався. На противагу реакції крупноклітинних вазопресин-синтезуючих нейронів, в вазопресин-синтезуючих дрібноклітинних нейронах мдПВЯ площа імунореактивності до білка HIF-3 α продовжувала збільшуватися на 26,5 % ($p < 0,001$) при збереженні показників вмісту білка на рівні значень, що відповідають терміну закінчення гіпоксичних впливів.

Отже, отримані дані свідчать про те, що багатоденна дія переривчастої гіпоксичної гіпоксії приводить до підвищення експресії генів *hif-1 α* і *hif-3 α* і посилення синтезу білків HIF-1 α і HIF-3 α в пептидергічних нейронах ПВЯ, але не в крупноклітинних нейронах СОЯ. Важливо, що даний ефект значною мірою зберігався через 10 днів після закінчення гіпоксичних впливів, а найбільш інтенсивне збільшення вмісту білків сімейства HIF у відповідь на гіпоксію зазначалося в мдПВЯ. Як вже зазначалося раніше, його

дрібноклітинні нейрони є основним джерелом синтезу CRH в гіпоталамусі і одночасно синтезують вазопресин як ко-пептид в CRH-ергічних нейронах. Багато дослідників вважають, що рівень функціональної активності ПВЯ в значній мірі визначає успішність стратегії адаптації організму до стресу різного генезу, в тому числі і до гіпоксії [8, 55, 61, 153, 293]. Хоча докази прямого впливу HIF-1 α на синтез CRH в гіпоталамусі у відкритому літературному доступі ми не виявили, але відомо, що HIF-1 α активує ген POMC (проопіомеланокортину) в гіпоталамічних нейронах при гіпоксії [226, 333], та стимулює утворення CRH в гіпоталамусі і АКТГ в аденогіпофізі при стресі [8, 153].

Слід звернути увагу на той факт, що помірне гіпоксичне навантаження призводить до активації оксидативного і нітрозуючого стресу в нейронах [335], а важка гіпоксія викликає запальний процес і апоптоз нейроцитів [51, 270]. Однак, навіть короткочасна експозиція повітряного середовища з 10 % вмістом O₂ підвищує в нейронах концентрацію білків HIF-1 α [337] і HIF-3 α [192]. Вважається, що продукція білка HIF-1 α є критично важливою для адаптації клітин до гіпоксії [214, 336, 338], забезпечує молекулярні механізми адаптації мозку [224, 337] і кардіореспіраторної системи [313] до гіпоксії. При цьому HIF-1 α надає нейропротекторний ефект і стимулює репарацію нервової тканини, підвищуючи в ній пул скавенджерів вільних радикалів (гем-гідроксилази-1, гем-оксигенази-1) і факторів ангиогенезу (VEGF, VEGFR1, ангиопоетин) [210, 224-225, 231]. Раніше було встановлено, що тижневе перебування експериментальних тварин на висоті 6100 м активує оксидативний стрес в нейронах [335], а білок HIF-1 α за цих умов має нейропротекторний ефект [225, 304] і забезпечує молекулярні механізми адаптації мозку до гіпоксії [339]. В умовах гіпоксії HIF-1 α є важливим регулятором метаболізму глюкози на тканинному рівні завдяки активації генів трансмембранних транспортерів глюкози і ключових ферментів гліколізу, що призводить до збільшення пулу АТФ в нервових клітинах [231]. При помірному гіпоксичному навантаженні HIF-1 α надає потужний

антиапоптотичний ефект і зменшує клітинну загибель при ішемії мозку [218, 339]. При цьому було показано, що в умовах гіпоксії HIF-1 α є важливим регулятором метаболізму глюкози на гіпоталамічному рівні, що пов'язано з безпосереднім контролем HIF-1 α транскрипції гена РОМС [226]. У той же час, блокування синтезу HIF в гіпоталамічних нейронах, що синтезують РОМС, призводило до дисбалансу енергетичного обміну в організмі і сприяло розвитку ожиріння [333], а фармакологічна стимуляція утворення HIF-1 α підвищувала ефективність активації гіпоталамо-гіпофізарно-аденокортикальної системи у відповідь на гострий стрес помірної інтенсивності [334].

Для клітин ссавців характерна ко-локалізація обох ізоформ білка HIF [238], однак при гіпоксії концентрація HIF-1 α підвищується в основному в цитоплазмі нейронів [339], а рівень HIF-3 α збільшується головним чином в клітинному ядрі [218, 237]. Дана особливість може бути обумовлена специфікою взаємної участі обох ізоформ HIF в молекулярних механізмах адаптації до гіпоксії за принципом негативного зворотного зв'язку. Так, білок HIF-1 α може впливати на експресію гена *hif-3 α* , а білок HIF-3 α , як правило, гальмує синтез HIF-1 α [214, 237, 336, 338]. Однак ген *hif-1 α* – всього лише одна з мішеней для білка HIF-3 α . Крім регулювання транскрипції специфічних для HIF-3 α цільових генів, існує велика група генів, односпрямована регуляція яких характерна для обох ізоформ білка HIF. Зокрема, це гени, що регулюють катаболізм моносахаридів, p53-опосередковані процеси клітинного апоптозу, механізми індукції оксидативного стресу і антиоксидантного захисту [340-341]. У нашому дослідженні встановлено, що гіпоксичні тренування призводили до більш інтенсивного накопичення білка HIF-1 α в нейронах ПВЯ, вміст якого у 2 рази перевищував відповідні значення HIF-3 α в мдПВЯ і на 50 % – в злкПВЯ. Отже, підвищення концентрації білка HIF-3 α в гіпоталамусі не обов'язково повинно призводити до гальмування активності гена *hif-1 α* і, відповідно, до вимикання активності генів, експресія яких регулюється білком HIF-1 α .

Таким чином, проведені дослідження показали, що білки NIF можуть відігравати важливу роль в молекулярних механізмах регуляції фізіологічної функції пептидергічних нейронів гіпоталамуса у відповідь на гіпоксичний стимул. Ймовірно, що зміна експресії генів *hif* і співвідношення пулу білків сімейства NIF в нейронах може модулювати інтенсивність синтезу тих ключових гіпоталамічних нейропептидів, які визначають функціональну активність аденогіпофіза і периферичних ендокринних залоз, і, відповідно, адаптивну можливість організму до гіпоксії. У той же час, збереження високих показників експресії гена *hif-1α* в паравентрикулярному ядрі гіпоталамуса в постгіпоксичний період свідчить про формування системного структурного сліду адаптації до гіпоксії і, отже, ефективності запропонованого режиму переривчастої гіпоксичної гіпоксії з метою підвищення загальної резистентності організму.

Пов'язуючи ефекти підвищення синтезу в гіпоталамусі білків сімейства NIF з активацією синтезу вазопресину, слід нагадати, що основними вазопресинергічними структурами гіпоталамуса, які беруть участь у нейроендокринній відповіді на стрес, є крупноклітинні нейрони супраоптичного ядра (СОЯ) і задньолатерального крупноклітинного суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса (злкПВЯ), а також дрібноклітинні нейрони медіального суб'ядра паравентрикулярного ядра гіпоталамуса (мдПВЯ) [7, 11, 19, 20]. У дрібноклітинних гіпоталамічних нейронах вазопресин є ко-секреторним гормоном поряд з CRH і в основному потенціює його ефект, проявляючи допоміжну і другорядну роль в стресовій реакції.

Однак, останнім часом було показано, що крім цього вторинного впливу, вазопресин діє як безпосередній регулятор стресових і імунних реакцій [13, 114, 266]. У крупноклітинних нейронах ПВЯ і СОЯ вазопресин є основним нейросекретом. При гострому стресі експресія і секреція вазопресину швидко збільшується поряд з CRH і АКТГ [243, 248], і вазопресин при цьому сприяє повноцінній секреторній відповіді АКТГ [207]. Експерименти з генетичним нокаутом піддослідних тварин показали, що для нормальної секреторної

відповіді АКТГ у відповідь на дію CRH необхідний рецептор V1b [208, 243]. Гострі стресові фактори, наприклад, іммобілізаційний або плавальний стрес, підвищують в плазмі рівень АКТГ і кортикостерону у тварин дикого типу порівняно з тваринами, які були нокаутовані за геном рецептора V1b [208].

Показано, що при хронічному стресі резерви CRH в аденогіпофізі залишаються незмінними, однак відзначається збільшення вмісту вазопресину в нервових терміналах, що відходять від CRH-синтезуючих нейронів ПВЯ [15]. У шурів, що піддавалися багаторазовому стресу, експресія в гіпофізі рецепторів до V1b збільшувалася, на відміну від щільності рецепторів до CRH, що призводило до зниження утворення CRH за принципом негативного зворотного зв'язку [18, 79, 114, 213]. Однак при відсутності АКТГ, але у присутності вазопресину, реактивність аденокортикальної системи все-таки зберігається і є достатньою для отримання повноцінної глюкокортикоїдної відповіді. Таким чином, підвищення вазопресинергічної активності гіпоталамо-гіпофізарно-аденокортикальної системи є основним визначальним фактором реакції АКТГ на новий стресовий фактор при хронічному стресі [18, 114]. При цьому доведено, що при хронічному стресі регуляція гіпоталамо-гіпофізарно-аденокортикальної системи перемикається з CRH на вазопресин, а гіпофізарні V1b-рецептори стають більш чутливими [18, 114]. Це свідчить про те, що вазопресин грає першорядну роль в адаптації гіпоталамо-гіпофізарно-аденокортикальної системи до тривалої стресової стимуляції.

Розглядаючи реакцію вазопресинергічних нейронів крупноклітинного супраоптичного ядра гіпоталамуса на гіпоксію, слід зауважити, що вазопресин є одним з двох основних нейрогормонів СОЯ [19-20]. Разом із тим, характер виявлених змін морфофункціонального стану СОЯ у відповідь на 15-денний цикл переривчастої гіпоксичної гіпоксії не припускав посилення синтезу даного нейрогормона, що відбувалося на тлі зниження синтезу вазопресину в структурі на 40 % (рис. 7.2), розвитком дистрофічних змін і істотного зменшення концентрації РНК в нейронах.

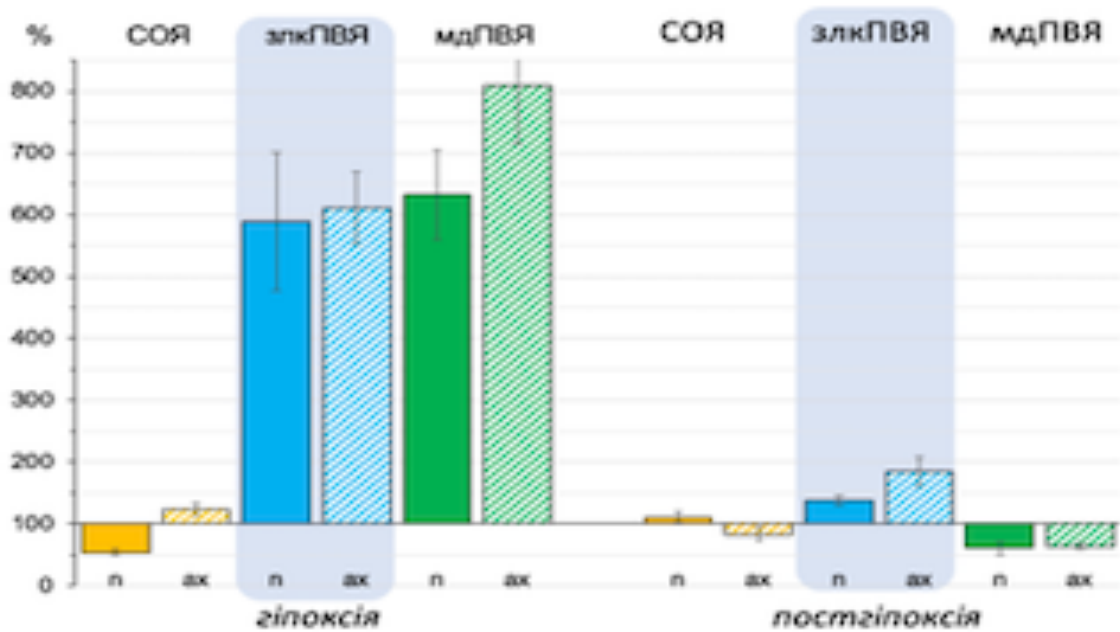


Рисунок 7.2 – Відносні (контроль = 100%) зміни вмісту вазопресину в перикаріоні нейронів (n) і в аксонах (ax) супраоптичного ядра, задньолатерального крупноклітинного суб'ядра и медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ.

Ймовірно, що можливими причинами подібної реакції крупноклітинних нейронів СОЯ, може бути переважне залучення вазопресину СОЯ в регуляцію артеріального тиску і водно-сольового обміну, які спрямовані на формування гіпертензивної реакції і гіперволемії у відповідь на стрес. Однак, застосований нами режим гіпоксичних впливів не є критичним для забезпечення організму киснем. Більш того, обраний режим переривчастої гіпоксичної гіпоксії надає адаптуючий вплив на організм і призводить до зниження високих цифр артеріального тиску у гіпертензивних щурів лінії SHR і пацієнтів з артеріальною гіпертензією [7, 68]. У зв'язку з цим можна припустити, що переривчаста гіпоксія, яка призводить до гіпертрофії дрібноклітинних гіпоталамічних нейронів, що синтезують кортикотропін-рилізінг гормон і вазопресин, інакше діє на вазопресинергічні нейрони СОЯ, приводячи до формування дизрегуляційної патології у функціонуванні даної структури. І тільки через 10 днів після закінчення гіпоксичних впливів

спостерігалось практично повне відновлення функціональної активності вазопресинергічної системи СОЯ. На відміну від крупноклітинних вазопресинергічних нейронів СОЯ в задньолатеральному крупноклітинному суб'ядрі ПВЯ переривчаста гіпоксія стимулювала збільшення розмірів вазопресинергічних нейроцитів на 14 % і сприяла 6-кратному зростанню сумарного вмісту вазопресину.

Порівняно з вихідним функціональним станом в умовах нормоксії, найбільшу реакцію на гіпоксію демонструють пептидергічні нейрони медіального дрібноклітинного суб'ядра ПВЯ. Для цих нейронів більш характерний синтез кортикотропін-релізінг гормону (CRH), який є високоспецифічним активатором синтезу АКТГ і, отже, кортикостероїдів. Останні є анаболічними гормонами і забезпечують молекулярні механізми адаптації організму, підвищуючи потужність енергетичного і білкового обміну в клітинах [122, 154]. Тому, ефективність адаптації організму до дії стресових факторів однозначно пов'язують із пластичністю гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальної системи [29, 342]. Характерно, що вазопресинергічна система відповідає більш ранньою реакцією на стрес, ніж CRH-ергічна [113, 153]. У той же час, вазопресин, як нейрогормон, характеризується здатністю самостійно активувати синтез АКТГ в гіпофізі, кортикостероїдів у надниркових залозах, а відносно CRH справляє стимулюючий і пермісивний ефекти [29, 113, 154, 342]. Очевидно, що підвищення функціональної активності вазопресинергічної системи мдПВЯ при адаптації до гіпоксії обумовлено важливою роллю вазопресину як ко-стимулятора синтезу і секреції CRH і як ко-трансміттера синтезу АКТГ і кортикостероїдів.

Раніше було показано, що у відповідь на гостру короткочасну гіпоксію спостерігається підвищення секреції вазопресину вазопресинергічними нейронами гіпоталамуса і зростання концентрації нейропептиду в крові [72, 282, 343, 345]. Це призводить до підвищення реабсорбції води, підвищення загального периферичного опору току крові, стимуляції симпатичних відділів

центральної нервової системи і активації ренін-ангіотензинової системи [43, 189]. У результаті, у відповідь на гостру гіпоксію відзначається оптимізація роботи серцево-судинної і дихальної систем, відповідальних за транспорт кисню в організмі. У той же час, хронічна дія гіповбаричної гіпоксичної гіпоксії призводить до зниження концентрації вазопресину в крові, втрати води організмом і підвищення осмоляльності крові [346-348]. Останнє найближче характеризує функціональний стан нейронів СОЯ, яке спостерігалось в цьому дослідженні на тлі багатоденних гіпоксичних впливів: пригнічення синтезу РНК і вазопресину, зниження показників секреторної активності нейронів (зниження концентрації білка cFos) і ареактивність нейроцитів на гіпоксію (відсутність підвищення вмісту білків сімейства HIF). Однак, на тлі пригнічення функціональної активності СОЯ в крупноклітинних нейронах злкПВЯ гіпоксична гіпоксія навпаки, призводила до функціональної активації і підвищення синтезу вазопресину.

Неоднозначність реакції крупноклітинних вазопресинергічних нейронів гіпоталамуса на гіпоксію може бути обумовлена особливістю впливу глюкокортикоїдів, концентрація яких у крові зростає в умовах багатоденних гіпоксичних впливів [72, 346, 348]. Показано, що тривала хронічна гіпоксична гіпоксія є стресовим фактором, що приводить до активації гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальної системи і підвищення продукції кортикостероїдів надниркових залозах [72, 346-348]. Глюко-кортикоїди за механізмом негативного зворотного зв'язку можуть обмежувати активність секреції кортикотропін-рилізинг гормону (CRH) гіпоталамічними нейронами, а також секрецію АКТГ кортикотропами аденогіпофіза [154, 342, 349]. Крупноклітинні вазопресинергічні нейрони гіпоталамуса також є чутливими до дії глюкокортикоїдів. У гіпоталамусі глюкокортикоїди здатні реалізувати виразний гальмівний ефект через низкоафінні глюкокортикоїдні рецептори (GR-II рецептори), висока щільність яких виявляється на вазопресинергічних нейронах СОЯ [122, 132]. У той же час, даний тип рецепторів практично відсутній на вазопресинергічних нейронах злкПВЯ, замість яких на

нейроцитах експресуються високоафінні мінералокортикоїдні рецептори (GR-I рецептори) [122, 132, 350]. Беручи до уваги дану обставину, стає зрозумілим відсутність реакції пригнічення функціональної активності нейронів злкПВЯ на тлі гіперкортицизму, викликаного багатоденною гіпоксичною гіпоксією. Разом із тим, більшість дослідників вважають, що відсутність справжніх глюкокортикоїдних рецепторів (GR-II рецепторів) на нейронах злкПВЯ унеможливує регуляцію їх функції ендogenousими і/або синтетичними кортикостероїдами при стресі і, отже, участь крупноклітинних вазопресинергічних нейронів злкПВЯ в механізмах адаптації до стресу ставиться під сумнів. Однак, наші дослідження показали, що, по-перше, нейрони злкПВЯ демонструють специфічну реакцію на гіпоксію у вигляді посилення синтезу білків HIF-1 α , HIF-3 α , і, по-друге, відповідають на гіпоксичний стимул значним підвищенням синтезу вазопресину і білка c-Fos. Ми вважаємо, що підвищення функціональної активності нейронів злкПВЯ сприяє підтримці механізмів нейроендокринної адаптації до гіпоксії, оскільки вазопресин, що ними секретується, справляє стимулюючий і, спільно з CRH, пермісивний ефекти на синтез АКТГ і кортикостероїди [13, 29, 113-114, 132]. Можливо, що у такий спосіб гіпоталамічний вазопресин забезпечує більш ефективну стратегію нейроендокринної адаптації організму в умовах багатоденної дії гіпоксичної гіпоксії. Беручи до уваги той факт, що вазопресинергічна система паравентрикулярного ядра відрізняється більш швидкою реакцією на стрес, ніж CRH-ергічна [113, 153], а високий рівень функціональної активності нейронів злкПВЯ зберігається не тільки безпосередньо під час гіпоксичних впливів, але і протягом тривалого постгіпоксичного періоду, можна стверджувати про важливу роль вазопресинергічної системи гіпоталамуса в підтримці нейроендокринного гомеостазу в умовах адаптації організму до стресу.

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 наведено теоретичне обґрунтування і експериментальне вирішення актуальної наукової задачі, яка полягає у встановленні нейроендокринної реакції різних відділів вазопресинергічної системи гіпоталамуса при переривчастій дії гіпоксичної гіпобаричної гіпоксії і в постгіпоксичному періоді.

1. Переривчаста гіпоксія стимулює експресію в гіпоталамусі генів сімейства *hif* і зростання концентрації мРНК до білка HIF-1 α в 13 разів і до HIF-3 α – у 8,6 раза. При цьому, зростання концентрації білків HIF-1 α і HIF-3 α у відповідь на гіпоксичні впливи відзначалося 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 α і HIF-3 α в медіобазальному гіпоталамусі до базальних показників, при збереженні підвищеної концентрації білків HIF-1 α і HIF-3 α 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 умісту вазопресину в 2,1 раза, білків cFos – на 80 %, HIF-1 α – в 3,4 раза і HIF-3 α – 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 α – у 2,5 рази і HIF-3 α – 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 рази 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 рази, 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 α і HIF-3 α , 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 α і HIF-3 α . У крупноклітинних нейронах СОЯ в постгіпоксичному періоді спостерігається тенденція до часткового відновлення функціональної активності.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Stratakis C. A., Chrousos G. P. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* 1995. Vol. 771. P. 1–18. DOI : 10.1111/j.1749-6632.1995.tb44666.x.
2. Stoop R. Neuromodulation by oxytocin and vasopressin. *Neuron.* 2012. Vol. 76 (1). P. 142–159.
3. Lightman S. L. The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *J. Neuroendocrinol.* 2008. Vol. 20 (6). P. 880–884.
4. Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine / A. Meyer-Lindenberg, G. Domes, P. Kirsch, M. Heinrichs. *Nat. Rev. Neurosci.* 2011. Vol. 12 (9). P. 524–538.
5. Heinrichs M., Domes G. Neuropeptides and social behaviour: effects of oxytocin and vasopressin in humans. *Prog. Brain Res.* 2008. Vol. 170. P. 337–350.
6. Heinrichs M., von Dawans B., Domes G. Oxytocin, vasopressin, and human social behavior. *Front Neuroendocrinol.* 2009. Vol. 30 (4). P. 548–557.
7. The hypothalamic-neurohypophyseal system: current and future treatment of vasopressin and oxytocin related disorders / R. S. Calabrò, D. Italiano, D. Ferrara et al. *Recent Pat. Endocr. Metab. Immune Drug Discov.* 2012. Vol. 6 (3). P. 235–250.
8. Charmandari E., Tsigos C., Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Ann. Rev. Physiol.* 2005. Vol. 67. P. 259–284.
9. Stress Response and Child Health / E. Charmandari, J. C. Achermann, J.-C. Carel et al. *Sci. Signal.* 2012. Vol. 5, issue 248. P. mr1.
10. Vasopressin: Behavioral Roles of an “Original” Neuropeptide / H. K. Caldwell, H.-J. Lee, A. H. Macbeth, W. Scott Young III. *Prog Neurobiol.* 2008. Vol. 84 (1). P. 1–24.

11. Performance, properties, and plasticity of identified oxytocin and vasopressin neurones in vitro / W. E. Armstrong, L. Wang, C. Li, R. Teruyama. *J. Neuroendocrinol.* 2010. Vol. 22 (5). P. 330–342.
12. Vasopressin secretion control: central neural pathways, neurotransmitters and effects of drugs / M. Iovino, E. Guastamacchia, V. A. Giagulli et al. *Curr. Pharm. Des.* 2012. Vol. 18 (30). P. 4714–4724.
13. Arginine vasopressin (AVP): a review of its historical perspectives, current research and multifunctional role in the hypothalamo-hypophysial system / F. Rotondo, H. Butz, L. Syro et al. N.-Y. : Springer Science+Business Media, 2016. P. 1–11. DOI : 10.1007/s11102-015-0703-0.
14. Armstrong W. E. The neurophysiology of neurosecretory cells. *J. Physiol.* 2007. Vol. 585 (pt 3). P. 645–647.
15. Donaldson Z. R., Young L. J. Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science.* 2008. Vol. 322 (5903). P. 900–904.
16. Interplay of oxytocin, vasopressin, and sex hormones in the regulation of social recognition / C. S. Gabor, A. Phan, A. E. Clipperton-Allen et al. *Behav. Neurosci.* 2012. Vol. 126 (1). P. 97–109.
17. Wacker D. W., Ludwig M. Vasopressin, oxytocin, and social odor recognition. *Horm. Behav.* 2012. Vol. 61 (3). P. 259–265.
18. The parvocellular vasopressinergic system and responsiveness of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress / G. Aguilera, S. Subburaju, S. Young, J. Chen. *Prog. Brain Res.* 2008. Vol. 170. P. 29–39.
19. Swanson L.W., Sawchenko P. E. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Ann. Rev. Neurosci.* 1983. Vol. 6. P. 269–324.
20. Silverman A.-J., Zimmerman E. A. Magnocellular neurosecretory system. *Ann. Rev. Neurosci.* 1983. Vol. 6. P. 357–380.
21. Sivukhina E. V., Jirikowski G. F. Magnocellular hypothalamic system and its interaction with the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Steroids.* 2016. Vol. 111. P. 21–28. URL : <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.01.008>.

22. Goodson J. L. Nonapeptides and the evolutionary patterning of sociality. *Prog. Brain. Res.* 2008. Vol. 170. P. 3–15.
23. Elenkov I. J., Chrousos G. P. Stress system-organization, physiology and immunoregulation. *Neuroimmunomodulation.* 2006. Vol. 13 (5-6). P. 257–267.
24. Dallman M. F. Modulation of Stress Responses: How we cope with excess glucocorticoids. *Exp. Neurol.* 2007. Vol. 206 (2). P. 179–182.
25. Neuroendocrine-immune interactions and responses to exercise / M. S. Fragala, W. J. Kraemer, C. R. Denegar et al. *Sports Med.* 2011. Vol. 41 (8). P. 621–639.
26. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to stress in mice lacking functional vasopressin V1b receptors / S. J. Lolait, L. Q. Stewart, D. S. Jessop et al. *Endocrinology.* 2007. Vol. 148 (2). P. 849–856.
27. 60 years of neuroendocrinology: The posterior pituitary, from Geoffrey Harris to our present understanding / G. Leng, R. Pineda, N. Sabatier, M. Ludwig. *J. Endocrinol.* 2015. Vol. 226 (2). P. T173–T185. DOI : 10.1530/JOE-15-0087.
28. Bankir L., Bichet D. G., Morgenthaler N. G. Vasopressin: physiology, assessment and osmosensation. *J. Intern. Med.* 2017. Vol. 282. P. 284–297. DOI : 10.1111/joim.12645.
29. McEwen B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol. Rev.* 2007. Vol. 87. P. 873–904. DOI : 10.1152/physrev.00041.2006.
30. Russell J. A. Neuroendocrinology with feeling. *J. Neuroendocrinol.* 2002. Vol. 14 (1). P. 1–3. DOI : 10.1046/j.0007-1331.2001.00760.x.
31. Russell G., Lightman S. The human stress response. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2019. Vol. 15 (9). P. 525–534. DOI : 10.1038/s41574-019-0228-0.
32. Chrousos G. P. Stress and disorders of the stress system. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2009. Vol. 5 (7). P. 374–381.
33. Колесник Ю. М., Орестенко Ю. Н., Абрамов А. В. Состояние вазопрессин-, окситоцин- и кортиколиберинсинтезирующих структур

гипоталамуса у крыс с сахарным диабетом при гипоксических воздействиях.

Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1993. Т. 79, № 9. С. 34–42.

34. Колесник Ю. М., Орестенко Ю. М., Абрамов А. В. Взаємовідношення крупноклітинної нейросекреторної системи гіпоталамусу та ендокринної частини підшлункової залози в умовах адаптації до гіпоксії. *Фізіол. журн.* 1992. Т. 38, № 6. С. 30–36.

35. Участие различных отделов гипоталамуса в патогенезе экспериментального сахарного диабета у крыс / Ю. М. Колесник, А. В. Абрамов, Г. В. Василенко, В. А. Жулинский. *Пробл. эндокринологии.* 1995. Т. 39, № 5. С. 34–37.

36. Колесник Ю. М., Абрамов А. В., Мельникова О. В. Взаимоотношения гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и пептидергической систем гипоталамуса у животных с экспериментальным сахарным диабетом. *Пробл. эндокринологии.* 1996. Т. 41, № 1. С. 45–49.

37. Абрамов А. В., Колесник Ю. М. Влияние гипоксии на функциональное состояние нейросекреторной системы гипоталамуса крыс. *Физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 1992. Т. 78, № 7. С. 21–27.

38. Абрамов А. В., Колесник Ю. М. Иммуномодулирующие свойства гипоталамических нейропептидов. *Патология.* 2004. Т. 1, № 1. С. 14–21.

39. Абрамов А. В. Пептидергічна система гіпоталамусу в регуляції ендокринної функції підшлункової залози в нормі і при цукровому діабеті (експериментальне дослідження) : дис. ... д-ра мед. наук. К., 1998. 393 с.

40. Vasopressin in septic shock: an individual patient data meta-analysis of randomised controlled trials / I. M. Nagendran, J. A. Russell, K. R. Walley et al. *Care Med.* 2019. Vol. 45 (6). P. 844–855. DOI : 10.1007/s00134-019-05620-2.

41. Nylander I., Roman E. Neuropeptides as mediators of the early-life impact on the brain; implications for alcohol use disorders. *Front Mol. Neurosci.* 2012. Vol. 5. P. 1–77.

42. Duncker D. J., Bache R. J. Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiol. Rev.* 2008. Vol. 88 (3). P. 1009–1086.

43. Szczepanska-Sadowska E., Czarzasta K., Cudnoch-Jedrzejewska A. Dysregulation of the rennin-angiotensin system and the vasopressinergic system interactions in cardiovascular disorders. *Curr. Hypertens. Rep.* 2018. Vol. 20. P. 1-19. DOI : 10.1007/s11906-018-0823-9.

44. Szczepanska-Sadowska E. Role of neuropeptides in central control of cardiovascular responses to stress. *J. Physiol. Pharmacol.* 2008. Vol. 59, suppl. 8. P. 61–89.

45. Scott L. V., Dinan T. G. Vasopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression. *Life Sci.* 1998. Vol. 62, N 22. P. 1985–1998.

46. Russell J. A., Leng G. Veni, vidi, vici: the neurohypophysis in the twentieth century. *Experimental Physiology.* 2000. Vol. 85, N s1. P. 1s–6s. DOI : 10.1111/j.1469-445x.2000.tb00002.x

47. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in critical illness / S. Venkataraman, R. Munoz, C. Candido, S. F. Witchel. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2007. Vol. 8 (4). P. 365–373.

48. Sharshar T., Annane D. Endocrine effects of vasopressin in critically ill patients. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 2008. Vol. 22 (2). P. 265–273.

49. Russell J. A. Vasopressor therapy in critically ill patients with shock. *Intensive Care Med.* 2019. Vol. 45 (11). P. 1503–1517. DOI : 10.1007/s00134-019-05801-z.

50. Neuroendocrine-immune (NEI) circuitry from neuron-glia interactions to function: Focus on gender and HPA-HPG interactions on early programming of the NEI system / M. C. Morale, F. Gallo, C. Tirolo et al. *Immunol. Cell Biol.* 2001. Vol. 79 (4). P. 400–417.

51. Pathogenic mechanisms following ischemic stroke / S. E. Khoshnam, W. Winlow, M. Farzaneh et al. *Neurol. Sci.* 2017. Vol. 38, N 7. P. 1167–1186.

52. Ohbuchi T., Haam J., Tasker J. G. Regulation of neuronal activity in hypothalamic vasopressin neurons. *Interdiscip. Inf. Sci.* 2015. Vol. 21 (3). P. 225-234.

53. Pittman Q. J. A neuro-endocrine-immune symphony. *J. Neuroendocrinol.* 2011. Vol. 23 (12). P. 1296–1297.

54. Russell J. A. Fifty Years of Advances in Neuroendocrinology. *Brain Neurosci. Adv.* 2018. Vol. 2. P. 2398212818812014. DOI : 10.1177/2398212818812014.

55. Абрамов А. В. Влияние интервальных гипоксических тренировок на функциональное состояние пептидергических нейронов паравентрикулярного ядра гипоталамуса и нейронов ствола мозга крыс. *Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова.* 1998. Т. 84, № 3. С. 173–181.

56. Абрамов А. В. Центральні механізми стимулюючого впливу інтервальних гіпоксичних тренувань на ендокринну функцію підшлункової залози щурів. *Фізіол. журн.* 1997. Т. 43, № 5-6. С. 62–69.

57. Колесник Ю. М., Каджарян Є. В., Абрамов А. В. Вплив переривчастих гіпоксичних тренувань на функціональний стан кортиколіберін- та бета-ендорфін - синтезуючі нейрони паравентрикулярного ядра гіпоталамусу щурів. *Фізіол. журн.* 2013. Т. 59, № 6. С. 22–26.

58. Вплив інтервальних гіпоксичних тренувань на стан ендокринної частини підшлункової залози у тварин з цукровим діабетом / Ю. М. Колесник, Ю. М. Орестенко, М. М. Середенко, А. В. Абрамов. *Фізіол. журн.* 1994. Т. 40, № 5-6. С. 87–95.

59. Колесник Ю. М., Середенко М. М., Абрамов А. В. Гипоксические тренировки стимулируют появление новых бета-клеток в поджелудочной железе и тормозят развитие сахарного диабета у крыс. *Докл. РАМН.* 1995. Т. 343, № 1. С. 127–129.

60. Колесник Ю. М., Середенко М. М., Абрамов А. В. Гипоксические тренировки стимулируют инсулярный аппарат поджелудочной железы у интактных и диабетических крыс. *Бюл. эксперим. биол. и медицины.* 1995. Т. 119, № 12. С. 567–569.

61. Kolesnik Y. M., Kadzharyan E. V., Abramov A. V. Effect of Intermittent Hypoxia Trainings on the Functional State of Corticotropin releasing hormone- and

β -Endorphin-Synthesizing Neurons of the Rat Paraventricular Nucleus of Hypothalamus. *Intern. J. Physiol. Pathophysiol.* 2014. Vol. 5 (3). P. 1–7.

62. Агаджанян Н. А., Стрелков Р. Б., Чижов А. Я. Прерывистая нормобарическая гипокситерапия. *Докл. Акад. проблем гипоксии РФ.* М., 1997. С. 18–36.

63. Барбашова З. И. Динамика повышения резистентности организма и адаптивных реакции на клеточном уровне в процессе адаптации к гипоксии. *Успехи физиол. наук.* 1970. Т. 1, № 3. С. 70.

64. Березовский В. А. Природная и инструментальная оротерапия. Донецк : Издатель Заславский А.Ю., 2012. 304 с.

65. Волков Н. И. Прерывистая гипоксия - новый метод тренировки, реабилитации и терапии. *Теория и практика физич. культуры.* 2000. № 7. С. 20–23.

66. Караш Ю. М., Стрелков Р. Б., Чижов А. Я. Нормобарическая гипоксия в лечении, профилактике и реабилитации. М. : Медицина, 1988. 352 с.

67. Колчинская А. З. Кислород. Физическое состояние, работоспособность. К. : Наук. думка, 1991. 205 с.

68. Xi L., Serebrovskaya T. V. Intermittent Hypoxia: From molecular mechanisms to clinical applications. N.-Y. : Nova Sci. Publ. Inc., 2009. 615 p.

69. Нудельман Л. М. Прерывистая нормобарическая гипокситерапия в предоперационной подготовке больных. *Нормобарическая гипокситерапия в онкологии* / ред. Р. Б. Стрелков. М. : Изд-во «Бумажная галерея», 2003. С. 61-69.

70. Интервальная гипоксически-гипероксическая тренировка в лечении метаболического синдрома / О. С. Глазачев, Л. А. Звенигородская, Е. Н. Дудник и др. *Эксперим. и клинич. гастроэнтерология.* 2010. № 7. С. 51–56.

71. Меерсон Ф. З. Адаптационная медицина: механизмы и защитные эффекты адаптации. М. : Hypoxia Medical Ltd., 1993. 300 с.

72. Myers D. A., Ducsay C. A. Altitude, attitude and adaptation. *Advances in Fetal and Neonatal Physiology, Advances in Experimental Medicine and Biology* / eds. L. Zhang, C. A. Ducsay. N-Y. : Springer Science+Business Media, 2014. P. 147–57. DOI : 10.1007/978-1-4939-1031-1_13.

73. Hypoxia-regulated gene network in drug resistance and cancer progression / S. C. Lin, W. L. Liao, J. C. Lee, S. J. Tsai. *Experim. Biol. Med.* 2014. Vol. 239. P. 779–792. DOI : 10.1177/1535370214532755.

74. Vetrovoy O. V., Rybnikova E. A., Samoilov M. O. Cerebral Mechanisms of Hypoxic/Ischemic Postconditioning. *Biochemistry.* 2017. Vol. 82, N 3. P. 392–400. DOI : 10.1134/S000629791703018X.

75. Gene regulation in the magnocellular hypothalamo-neurohypophysial system / J. P. Burbach, S. M. Luckman, D. Murphy, H. Gainer. *Physiol. Rev.* 2001. Vol. 81 (3). P. 1197–1267.

76. Richter D. Synthesis, processing, and gene structure of vasopressin and oxytocin. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 1983. Vol. 30. P. 245–266.

77. Copeptin (CTproAVP), a new tool for understanding the role of vasopressin in pathophysiology / D. Bolignano, A. Cabassi, E. Fiaccadori et al. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2014. Vol. 52 (10). P. 1447–1456.

78. Robertson G. L. The regulation of vasopressin function in health and disease. *Recent Prog. Horm. Res.* 1976. Vol. 33. P. 333–385.

79. Antoni F. A. Vasopressin as a stress hormone. *Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology* / ed. G. Fink. N-Y. : Academic Press, 2015. P. 97–108.

80. Zerbe R. L., Miller J. Z., Robertson G. L. The reproducibility and heritability of individual differences in osmoregulatory function in normal human subjects. *J. Lab. Clin. Med.* 1991. Vol. 117. P. 51–59.

81. Sodium excretion in response to vasopressin and selective vasopressin receptor antagonists / J. Perucca, D. G. Bichet, P. Bardoux et al. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008. Vol. 19. P. 1721–1731.

82. Antidiuretic effect of subnormal levels of arginine vasopressin in normal humans / L. J. Andersen, J. L. Andersen, H. J. Schutten et al. *Am. J. Physiol.* 1990. Vol. 259. P. R53–60.

83. Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems / T. A. Koshimizu, K. Nakamura, N. Egashira et al. *Physiol. Rev.* 2012. Vol. 92 (4). P. 1813–1864.

84. Vasopressin receptor V1a regulates circadian rhythms of locomotor activity and expression of clock-controlled genes in the suprachiasmatic nuclei / J. D. Li, K. J. Burton, C. Zhang et al. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2009. Vol. 296 (3). P. R824–R830.

85. Profound and rapid reduction in body temperature induced by the melanocortin receptor agonists / Y. Xu, E. R. Kim, S. Fan et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. Vol. 451 (2). P. 184–189.

86. Albers H. E. Species, sex and individual differences in the vasotocin/vasopressin system: relationship to neurochemical signaling in the social behavior neural network. *Front Neuroendocrinol.* 2015. Vol. 36. P. 49–71.

87. Behavioural impact of intraseptally released vasopressin and oxytocin in rats / M. Engelmann, C. T. Wotjak, K. Ebner, R. Landgraf. *Exp. Physiol.* 2000. Vol. 85, spec N. P. 125S–130S.

88. Popik P., van Ree J. M. Long-term facilitation of social recognition in rats by vasopressin related peptides: a structure-activity study. *Life Sci.* 1992. Vol. 50 (8). P. 567–572.

89. Antoni F. A. Novel ligand specificity of pituitary vasopressin receptors in the rat. *Neuroendocrinol.* 1984. Vol. 39 (2). P. 186–188.

90. Born J., Pietrowsky R., Fehn H. L. Neuropsychological effects of vasopressin in healthy humans. *Prog. Brain Res.* 1998. Vol. 119. P. 619–643.

91. The human V3 pituitary vasopressin receptor: ligand binding profile and density-dependent signaling pathways / M. Thibonnier, J. A. Preston, N. Dulin et al. *Endocrinology.* 1997. Vol. 138 (10). P. 4109–4122.

92. Oh Y. K. Vasopressin and vasopressin receptor antagonists. *Electrolyte Blood Press.* 2008. Vol. 6 (1). P. 51–55.
93. Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP / J. E. Kaufmann, A. Oksche, C. B. Wollheim et al. *J. Clin. Invest.* 2000. Vol. 106 (1). P. 107–116.
94. Haberichter S. L., Shi Q., Montgomery R. R. Regulated release of VWF and FVIII and the biologic implications. *Pediatr. Blood Cancer.* 2006. Vol. 46 (5). P. 547–553.
95. Antiproliferative effect of 10-deamino-8-D-arginine vasopressin analogs on human breast cancer cells / N. B. Iannucci, G. V. Ripoll, J. Garona et al. *Future Med. Chem.* 2011. Vol. 3 (16). P. 1987–1993.
96. Correlation between tumor volume response to radiotherapy and expression of biological markers in patients with cervical squamous cell carcinoma / J. M. Noh, W. Park, S. J. Huh et al. *J. Gynecol. Oncol.* 2009. Vol. 20 (4). P. 215–220.
97. North W. G. Gene regulation of vasopressin and vasopressin receptors in cancer. *Exp. Physiol.* 2000. Vol. 85. P. 27S–40S.
98. Plasma corticotrophin response to desmopressin in patients with Cushing's disease correlates with the expression of vasopressin receptor 2, but not with that of vasopressin 1 or 3, in their pituitary tumours / F. F. Wang, K. T. Tang, Y. S. Yen et al. *Clin. Endocrinol.* 2012. Vol. 76 (2). P. 253–263.
99. G-protein-coupled receptors in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei-serpentine gateways to neuroendocrine homeostasis / G. G. Hazell, C. C. Hindmarch, G. R. Pope et al. *Front. Neuroendocrinol.* 2012. Vol. 33. P. 45–66.
100. The paraventricular nucleus of the hypothalamus and the functional neuroanatomy of visceromotor responses to stress / P. E. Sawchenko, E. R. Brown, R. K. Chan et al. *Prog. Brain. Res.* 1996. Vol. 107. P. 201–222.

101. Гоуфман Е. И. Клеточная организация паравентрикулярных ядер гипоталамуса крысы. *Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии*. 1990. Т. 98. С. 46–51.
102. Акмаев И. Г., Гриневич В. В. Нейроиммуноэндокринология гипоталамуса. М. : Медицина, 2003. 168 с.
103. Saper C. B., Hypothalamus. *The Human Nervous System* / G. Paxinos (ed.). San Diego : Academic Press, 1990. P. 389–413.
104. Ishunina T. A., Swaab D. F., Vasopressin and oxytocin neurons of the human supraoptic and paraventricular nucleus: size changes in relation to age and sex. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999. Vol. 84. P. 4637–4644.
105. Effects of chronic alcoholic disease on magnocellular and parvocellular hypothalamic neurons in men / E. V. Sivukhina, A. A. Dolzhikov, Iu. E. Morozov et al. *Horm. Metab. Res.* 2006. Vol. 38. P. 382–390.
106. The hypothalamic-neurohypophyseal system: from genome to physiology / D. Murphy, A. Konopacka, C. Hindmarche et al. *J. Neuroendocrinol.* 2012. Vol. 24. P. 539–553.
107. Immunohistochemistry of vasopressin, oxytocin and neurophysin in the hypothalamus and extrahypothalamic regions of the human and primate brain / M. V. Sofroniew, A. Weindl, U. Schrell, R. Wetzstein. *Acta Histochem.* 1981. Vol. 24 (suppl.). P. 79–95.
108. Pittman Q. J., Lawrence D., McLean L. Central effects of arginine vasopressin on blood pressure in rats. *Endocrinology*. 1982. Vol. 110. P. 1058-1060.
109. Robertson G. L. Physiology of ADH secretion. *Kidney Int.* 1987. Vol. 21 (suppl.). P. S20–S26.
110. Swaab D. F., Neurobiology and neuropathology of the human hypothalamus. *Handbook of Chemical Neuroanatomy* / A. Björklund, T. Hökfelt (eds.). Amsterdam : Elsevier, 1997. Vol. 13, pt 1. P. 39–137.
111. Antoni F. A. Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. *Front. Neuroendocrinol.* 1993. Vol. 14. P. 76–122.
112. Engelmann M., Landgraf R., Wotjak C. T. The hypothalamic-neurohypophyseal system regulates the hypothalamic-pituitary adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front. Neuroendocrinol.* 2004. Vol. 25. P. 132-149.

113. Aguilera G., Rabadan-Diehl C. Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation. *Regulatory Peptides*. 2000. Vol. 96. P. 23–29. DOI : 10.1016/s0167-0115(00)00196-8.

114. Volpi S., Rabadan-Diehl C., Aguilera G. Vasopressinergic regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis and stress adaptation. *Stress*. 2004. Vol. 7 (2). P. 75–83. DOI : 10.1080/10253890410001733535.

115. Telleria-Diaz A., Grinevich V. V., Jirikowski G. F. Colocalization of vasopressin and oxytocin in hypothalamic magnocellular neurons in water-deprived rats. *Neuropeptides*. 2001. Vol. 35. P. 162–167.

116. De Vries, G. J., Buijs, R. M. The origin of vasopressinergic and oxytocinergic innervation of the rat brain with special reference to the lateral septum. *Brain Res*. 1983. Vol. 273. P. 307–317.

117. Response of substances co-expressed in hypothalamic magnocellular neurons to osmotic challenges in normal and Brattleboro rats / J. Bundzikova, Z. Pirnik, D. Zelena et al. *Cell. Mol. Neurobiol*. 2008. Vol. 28. P. 1033–1047.

118. Aguilera G. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front. Neuroendocrinol*. 1994. Vol. 15. P. 321–350.

119. Leng G., MacGregor D. J. Models in neuroendocrinology. *Mathematical Biosciences*. 2018. Vol. 305. P. 29-41. DOI : 10.1016/j.mbs.2018.07.008 2

120. Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms / J. P. Herman, J. M. McKlveen, M. B. Solomon et al. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 2012. Vol. 45. P. 292–298.

121. Smith S. M., Vale W. W. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin. Neurosci*. 2006. Vol. 8. P. 383–395.

122. Myers B., McKlveen J. M., Herman J. P. Glucocorticoid actions on synapses, circuits, and behavior: Implications for the energetics of stress. *Front. Neuroendocrinol*. 2014. Vol. 35. P. 180–196. DOI : 10.1016/j.yfrne.2013.12.003.

123. Correlations between hypothalamus-pituitary-adrenal axis parameters depend on age and learning capacity / O. C. Mejer, B. Topic, P. J. Steenbergen et al. *Endocrinology*. 2005. Vol. 146. P. 1372–1381.

124. Vasopressin- and oxytocin-immunoreactive hypothalamic neurones of inbred polydipsic mice / A. Ison, K. Yuri, Y. Ueta et al. *Brain Res Bull.* 1993. Vol. 31. P. 405–414.

125. Repeated stress-induced activation of corticotrophin-releasing factor neurons enhances vasopressin stores and colocalization with CRF in the median eminence of rats / D. C. E. De Goeij, R. Kvetnansky, M. H. Whitnall et al. *Neuroendocrinology.* 1991. Vol. 53. P. 150–159.

126. Localization of corticotrophin-releasing hormone (CRH) neurons in the paraventricular nucleus of the human hypothalamus: age-dependent colocalization with vasopressin / F. C. Raadscheer, A. A. Sluiter, R. Ravid et al. *Brain Res.* 1993. Vol. 615. P. 50–62.

127. Impaired hypothalamus- pituitary-adrenal axis activity and more severe multiple sclerosis with hypothalamic lesions / I. Huitinga, Z. A. Erkut, D. van Beurden, D. F. Swaab. *Ann. Neurol.* 2004. Vol. 55. P. 37–45.

128. Effects of hyperosmotic stimulation and adrenalectomy on vasopressin mRNA levels in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus: in situ hybridization histochemical analysis using a synthetic oligonucleotide probe / S. Suemaru, K. Hashimoto, T. Ogasa et al. *Acta Med. Okayama.* 1990. Vol. 44. P. 233–241.

129. Effect of repeated lipopolysaccharide administration on tissue cytokine expression and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in rats / V. Grinevich, X.-M. Ma, J. Herman et al. *J. Neuroendocrinol.* 2001. Vol. 13. P. 711–723.

130. Hypothalamic-pituitary-adrenal function / S. L. Lightman, R. J. Windle, X. M. Ma et al. *Arch. Physiol. Biochem.* 2002. Vol. 110. P. 90–93.

131. Altered hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in patients with chronic heart failure / E. V. Sivukhina, A. S. Poskrebysheva, Iu. V. Smurova et al. *Horm. Metab. Res.* 2009. Vol. 41. P. 778–784.

132. Sivukhina E. V., Jirikowski G. F. Adrenal steroids in the brain: Role of the intrinsic expression of corticosteroid-binding globulin (CBG) in the stress response. *Steroids.* 2014. Vol. 81. P. 70–83. DOI : 10.1016/j.steroids.2013.11.001.

133. Intrinsic expression of transcortin in neural cells of the mouse brain: a histochemical and molecular study / E. V. Sivukhina, J. C. Helbling, A. M. Minni et al. *J. Exp. Biol.* 2013. Vol. 216 (pt 2). P. 245–252.

134. Sivukhina E. V., Schäfer H. H., Jirikowski G. F. Differences in colocalization of corticosteroid-binding globulin and glucocorticoid receptor immunoreactivity in the rat brain. *Ann. Anat.* 2013. Vol. 195. P. 219–224.

135. Expression of corticosteroid-binding protein in the human hypothalamus, co-localization with oxytocin and vasopressin / E. V. Sivukhina, G. F. Jirikowski, H. G. Bernstein et al. *Horm. Metab. Res.* 2006. Vol. 38. P. 253–259.

136. Herman J. P., Mueller N. K., Figueiredo H. Role of GABA and glutamate circuitry in hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress integration. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004. Vol. 1018. P. 35–45.

137. Hammond G. L. Molecular properties of corticosteroid binding globulin and the sex-steroid binding proteins. *Endocr. Rev.* 1990. Vol. 11. P. 65-79.

138. McEwen B. S., Stellar E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch. Intern. Med.* 1993. Vol. 153. P. 2093–2101.

139. The vasopressin AVPR1b receptor: molecular and pharmacological studies / J. Roper, A. M. O'Carroll, W. Young, S. Lolait. *Stress.* 2011. Vol. 14. P. 98–115.

140. Gonadal steroid modulation of stress-induced hypothalamo-pituitary-adrenal activity and anxiety behavior: role of central oxytocin / R. J. Windle, L. E. Gamble, Y. M. Kershaw et al. *Endocrinology.* 2006. Vol. 147. P. 2423–2431.

141. Packer M. How should physicians view heart failure? The philosophical and physiological evolution of three conceptual models of disease. *Am. J. Cardiol.* 1993. Vol. 71. P. 3C–11C.

142. Francis G. S. Pathophysiology of chronic heart failure. *Am. J. Med.* 2001. Vol. 110 (suppl. 7A). P. 37S–46S.

143. Minguell E. R. Clinical use of markers of neurohormonal activation in heart failure. *Rev. Esp. Cardiol.* 2004. Vol. 57. P. 347–356.

144. Patel K. P., Zhang P. L., Krukoff T. L. Alterations in brain hexokinase activity associated with heart failure in rats. *Am. J. Physiol.* 1993. Vol. 265. P. R923–R928.

145. The rennin-angiotensin- aldosterone system excites hypothalamic paraventricular nucleus neurons in heart failure / Z. H. Zhang, J. Francis, R. W. Weiss, R. B. Felder. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002. Vol. 283. P. H423–H433.

146. The plasma levels of dehydroepiandrosterone sulfate are decreased in patients with chronic heart failure in proportion to the severity / Y. Moriyama, H. Yasue, M. Yoshimura et al. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000. Vol. 85. P. 1834–1840.

147. Increased cortisol levels in aging and Alzheimer's disease in postmortem cerebrospinal fluid / D. F. Swaab, F. C. Raadsheer, E. Endert et al. *J. Neuroendocrinol.* 1994. Vol. 6. P. 681–687.

148. Stetler C., Miller G. E. Depression and hypothalamic-pituitary-adrenal activation: a quantitative summary of four decades of research. *Psychosom. Med.* 2011. Vol. 73. P. 114–126.

149. Increased numbers of corticotrophin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients / F. C. Raadsheer, W. J. Hoogendijk, F. C. Stam et al. *Neuroendocrinology.* 1994. Vol. 60. P. 436–444.

150. Cooper M. S., Stewart P. M. Corticosteroid insufficiency in acutely ill patients. *N. Engl. J. Med.* 2003. Vol. 348. P. 727–734.

151. Wand G. S., Dobs A. S. Alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in actively drinking alcoholics. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1991. Vol. 72. P. 1290–1295.

152. Maxime V., Lesur O., Annane D. Adrenal insufficiency in septic shock. *Clin. Chest Med.* 2009. Vol. 30. P. 17–27.

153. Kovacs K. J. CRH: The link between hormonal-, metabolic- and behavioral responses to stress. *J. Chem. Neuroanatomy.* 2013. Vol. 54. P. 25–33.

154. Stress, the stress system and the role of glucocorticoids / N. C. Nicolaides, E. Kyratzi, A. Lamprokostopoulou et al. *Neuroimmunomodulation.* 2015. Vol. 22. P. 6–19. DOI : 10.1159/000362736.

155. Herman J. P., Flak J., Jankord R. Chronic stress plasticity in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Prog. Brain Res.* 2008. Vol. 170. P. 353-364.

156. Kiss A., Aguilera G. Regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress: responses to repeated intraperitoneal hypertonic saline injection. *Brain Res.* 1993. Vol. 630. P. 262–270.

157. Gene expression in the rat supraoptic nucleus induced by chronic hyperosmolality versus hyposmolality / E. Glasgow, T. Murase, B. Zhang et al. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2000. Vol. 279. P. R1239–R1250.

158. Madeira M. D., Paula-Barbosa M. M. Effects of alcohol on the synthesis and expression of hypothalamic peptides. *Brain Res. Bull.* 1999. Vol. 48. P. 3–22.

159. Gulya K., Dave J. R., Hoffman P. L. Chronic ethanol ingestion decreases vasopressin mRNA in hypothalamic and extrahypothalamic nuclei of mouse brain. *Brain Res.* 1991. Vol. 557. P. 129–135.

160. Chronic ethanol intake decreases vasopressin mRNA content in the rat hypothalamus: a PCR study / P. P. Sanna, D. P. Folsom, M. J. Barizo et al. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1993. Vol. 19. P. 241–245.

161. Comparison of vasopressin and oxytocin expressions in the hypothalamo- neurohypophysial system of patients with chronic heart failure / E. V. Sivukhina, Iu. E. Morozov, A. A. Dolzhikov et al. *Horm. Metab. Res.* 2010. Vol. 42. P. 56–60.

162. Le Jemtel T. H., Serrano C. Vasopressin dysregulation: hyponatremia, fluid retention and congestive heart failure. *Int. J. Cardiol.* 2007. Vol. 120. P. 1–9.

163. Pyner S. Neurochemistry of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: implications for cardiovascular regulation. *J. Chem. Neuroanat.* 2009. Vol. 38. P. 197–208.

164. Dobsa L., Edozien K. C. Copeptin and its potential role in diagnosis and prognosis of various diseases. *Biochem. Med.* 2013. Vol. 23. P. 172–190.

165. Содержание вазопрессина в крови у больных ишемической болезнью сердца и его взаимосвязь с другими гормонами / В. А. Дудаев, В. Горин, В. В. Бородкин и др. *Кардиология.* 1986. Т. 26. С. 98–101.

166. Kjaer A., Hesse B. Heart failure and neuroendocrine activation: diagnostic, prognostic and therapeutic perspectives. *Clin. Physiol.* 2001. Vol. 21. P. 661–672.

167. Possible vascular role of increased plasma arginine vasopressin in congestive heart failure / T. Nakamura, H. Funayama, A. Yoshimura et al. *Int. J. Cardiol.* 2006. Vol. 106. P. 191–195.

168. Goldsmith S. R. Vasopressin receptor antagonists: mechanisms of action and potential effects in heart failure. *Cleve. Clin. J. Med.* 2006. Vol. 73 (suppl. 2). P. S20–S23.

169. Hyponatremia, arginine vasopressin dysregulation, and vasopressin receptor antagonism / A. Rai, A. Whaley-Connell, S. McFarlane, J. R. Sowers. *Am. J. Nephrol.* 2006. Vol. 26. P. 579–589.

170. Sanghi P., Uretsky B. F., Schwarz E. R. Vasopressin antagonism: a future treatment option in heart failure. *Eur. Heart J.* 2005. Vol. 26 (2005). P. 538-543.

171. Aguilera G. Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. *Trends Endocrinol. Metab.* 1998. Vol. 9 (8). P. 329–336.

172. Hypophysectomy and neurointermediate pituitary lobectomy decrease humoral immune responses to T-independent and T-dependent antigens / A. Quintanar-Stephano, E. Abarca-Rojano, R. A. Jarillo-Luna et al. *J. Physiol. Biochem.* 2010. Vol. 66 (1). P. 7–13.

173. Berczi I., Quintanar-Stephano A., Kovacs K. Neuroimmune regulation in immunocompetence, acute illness, and healing. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2009. Vol. 1153. P. 220–239.

174. Increased plasma concentrations, hypothalamic content, and in vitro release of arginine vasopressin in inflammatory disease-prone, hypothalamic corticotrophin-releasing hormone-deficient Lewis rats / V. K. Patchev, K. T. Kalogeras, P. Zelazowski et al. *Endocrinology.* 1992. Vol. 131 (3). P. 1453–1457.

175. Increased arginine vasopressin secretion may participate in the enhanced susceptibility of Lewis rats to inflammatory disease / V. K. Patchev, G. Mastorakos, L. S. Brady et al. *Neuroendocrinology.* 1993. Vol. 58 (1). P. 106–110.

176. Effects of neurointermediate pituitary lobectomy and desmopressin on acute experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats / A. Quintanar-Stephano, A. Organista-Esparza, R. Chavira-Ramirez et al. *Neuroimmunomodulation.* 2012. Vol. 19 (3). P. 148–157.

177. Bell J., Adler M. W., Greenstein J. I. The effect of arginine vasopressin on the autologous mixed lymphocyte reaction. *Int. J. Immunopharmacol.* 1992. Vol. 14 (1). P. 93–103.

178. Identification and characterization of [125I]arginine vasopressin binding sites on human peripheral blood mononuclear cells / J. Bell, M. W. Adler, J. I. Greenstein, L. Y. Liu-Chen. *Life Sci.* 1993. Vol. 52 (1). P. 95–105.

179. Vasopressin receptor 1a-mediated negative regulation of B cell receptor signaling / S. B. Hu, Z. S. Zhao, C. Yhap et al. *J. Neuroimmunol.* 2003. Vol. 135. (1-2). P. 72–81.

180. Extrapituitary expression of the rat V1b vasopressin receptor gene / S. J. Lolait, A. M. O'Carroll, L. C. Mahan et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. Vol. 92 (15). P. 6783–6787.

181. Turnbull A. V., Rivier C. L. Regulation of the hypothalamic- pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol. Rev.* 1999. Vol. 79 (1). P. 1–71.

182. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation and stimulation of systemic vasopressin secretion by recombinant interleukin-6 in humans: potential implications for the syndrome of inappropriate vasopressin secretion / G. Mastorakos, J. S. Weber, M. A. Magiakou et al. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994. Vol. 79 (4). P. 934–939.

183. Ray D. W., Ren S. G., Melmed S. Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates proopiomelanocortin (POMC) expression in a corticotroph cell line. Role of STAT pathway. *J. Clin. Invest.* 1996. Vol. 97 (8). P. 1852–1959.

184. Interleukin-1 beta analogues with markedly reduced pyrogenic activity can stimulate secretion of adrenocorticotrophic hormone in rats / Y. Naito, J. Fukata, Y. Masui et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990. Vol. 167 (1). P. 103–109.

185. The effects of recombinant human interleukin (IL)-1 alpha, IL-1 beta or IL-6 on hypothalamo-pituitary-adrenal axis activation / M. S. Harbuz, A. Stephanou, N. Sarlis, S. L. Lightman. *J. Endocrinol.* 1992. Vol. 133 (3). P. 349-355.

186. Ericsson A., Kovacs K. J., Sawchenko P. E. A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. *J. Neurosci.* 1994. Vol. 14 (2). P. 897–913.

187. Lee S., Rivier C. Hypophysiotropic role and hypothalamic gene expression of corticotrophin-releasing factor and vasopressin in rats injected with interleukin-1 beta systemically or into the brain ventricles. *J. Neuroendocrinol.* 1994. Vol. 6 (2). P. 217–224.

188. Rivier C. Blockade of nitric oxide formation augments adrenocorticotropin released by blood-borne interleukin-1 beta: role of vasopressin, prostaglandins, and alpha 1-adrenergic receptors. *Endocrinology.* 1995. Vol. 136 (8). P. 3597–3603.

189. Semenza G. L. Oxygen regulated transcription factors and their role in pulmonary disease. *Respir. Res.* 2000. Vol. 1 (3). P. 159–162.

190. Evolution and physiology of neural oxygen sensing *Frontiers in Physiology* / K. M. Costa, D. Accorsi-Mendonça, D. J. A. Moraes, B. H. Machado. *Integr. Physiol.* 2014. Vol. 5, article 302. 16 p. DOI : 10.3389/fphys.2014.00302.

191. Ke Q., Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol. Pharmacol.* 2006. Vol. 70 (5). P. 1469–1480. DOI : 10.1124/mol.106.027029.

192. Hypoxia upregulates hypoxia inducible factor (HIF)-3alpha expression in lung epithelial cells. Characterization and comparison with HIF-1alpha / Q. F. Li, X. R. Wang, Y. W. Yang, H. Lin. *Cell Res.* 2006. Vol. 16. P. 548–558.

193. Powell F. L., Fu Z. HIF-1 and ventilatory acclimatization to chronic hypoxia. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2008. Vol. 164 (1-2). P. 282–287. DOI : 10.1016/j.resp.2008.07.017.

194. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1 / G. L. Semenza, B. H. Jiang, S. W. Leung et al. *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 32529–32537.

195. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1 / G. L. Semenza, P. H. Roth, H. M. Fang, G. L. Wang. *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269. P. 23757–23763.

196. Semenza G. L. O₂ regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF 1. *J. Appl. Physiol.* 2004. Vol. 96 (3). P. 1173–1177.

197. Semenza G. L. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Ann. Rev. Pathol.* 2014. Vol. 9. P. 47–71. DOI : 10.1146/annurev-pathol-012513-104720.
198. Healy S., Khan P., Davie J. R. Immediate early response genes and cell transformation. *Pharmacol. Ther.* 2013. Vol. 37. P. 64–77.
199. The role of HIF in immunity and inflammation / E. P. Cummins, C. E. Keogh, D. Crean, C. T. Taylor. *Mol. Aspects Med.* 2016. Vol. 47-48. P. 24–34. DOI : 10.1016/j.mam.2015.12.004.
200. Hypoxia and HIF-1 activation in bacterial infections / G. Devraj, C. Beerlage, B. Brüne, V. A. Kempf. *Microbes Infect.* 2017. Vol. 19 (3). P. 144–156. DOI : 10.1016/j.micinf.2016.11.003.
201. Dehne N., Fuhrmann D., Brüne B. Hypoxia-inducible factor (HIF) in hormone signaling during health and disease. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* 2013. Vol. 11 (2). P. 125–35. DOI : 10.2174/1871525711311020008.
202. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension / G. L. Wang, B. H. Jiang, E. A. Rue, G. L. Semenza. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. Vol. 92. P. 5510–5514.
203. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway / J. B. Hogenesch, W. K. Chan, V. H. Jackiw et al. *J Biol Chem.* 1997. Vol. 272. P. 8581-8593.
204. Gu Y. Z., Hogenesch J. B., Bradfield C. A. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2000. Vol. 40. P. 519–561.
205. HIF1 α , HIF2 α , HIF3 α and HIF1 β mRNA Expression Changes in Different Tissues under Intermittent Hypoxic Training / T. Drevitska, V. Dosenko, V. Nagibin, I. Mankovska. *Xi L., Serebrovskaya T. V. Intermittent hypoxia.* N.Y. : Nova Science Publishers, Inc., 2009. Ch. 21. P. 419–436.
206. Regulation of hypoxia- inducible factor 1beta is mediated by an O₂-depended degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway / L. E. Huang, J. Gu, M. Schau, H. F. Bunn. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. Vol. 95. P. 7987–7992.

207. Regulation of hypoxia- inducible transcription factor 1beta by the ubiquitin-proteasome pathway / P. J. Kallio, W. J. Wilson, S. O'Brien et al. *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 6519–6525.

208. Salceda S., Caro J. Hypoxia-inducible factor 1a (HIF-1a) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 22642–22647.

209. Sutter C. H., Laughner E., Semenza G. L. HIF-1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. Vol. 97. P. 4748–4753.

210. Sun Y., He W., Geng L. Neuroprotective mechanism of HIF-1 α overexpression in the early stage of acute cerebral infarction in rats. *Experim. Ther. Med.* 2016. Vol. 12. P. 391–395. DOI : 10.3892/etm.2016.3288.

211. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997. Vol. 386. P. 671–674.

212. Pugh C. W., Ratcliffe P. J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* 2003. Vol. 9. P. 677–684.

213. Regulation of c jun expression during hypoxic and low glucose stress / W. A. Ausserer, B. Bourrat Floeck, C. J. Green et al. *Mol. Cell Biol.* 1994. Vol. 14 (8). P. 5032–5042.

214. Lee H.-C., Tsai S.-J. Endocrine targets of hypoxia-inducible factors. *J. Endocrinol.* 2017. Vol. 234. P. R53–R65. DOI : 10.1530/JOE-16-0653.

215. Wang G. L., Semenza G. L. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia inducible factor 1 DNA binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood.* 1993. Vol. 82. P. 3610–3615.

216. Wenger R. H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂ sensing protein hydroxylases, hypoxia inducible transcription factors, and O₂ regulated gene expression. *FASEB J.* 2002. Vol. 16. P. 1151–1162.

217. Relationship between HIF-1 α and apoptosis in rats with traumatic brain injury and the influence of traditional Chinese medicine Sanqi / Y. Yang, L. Cheng, L. Li et al. *Saudi J. Biol. Sci.* 2019. Vol. 26 (8). P. 1995–1999. DOI : 10.1016/j.sjbs.2019.08.004.

218. Is HIF-1 α a pro- or an anti-apoptotic protein? / J. P. Piret, D. Mottet, M. Raes, C. Michiels. *Biochem. Pharmacol.* 2002. Vol. 64. P. 889–892. DOI : 10.1016/s0006-2952(02)01155-3.

219. Oxidative stress and apoptosis after acute respiratory hypoxia and reoxygenation in rat brain / D. Coimbra-Costa, N. Alva, M. Duran et al. *Redox. Biol.* 2017. Vol. 12. P. 216–225. DOI : 10.1016/j.redox.2017.02.014.

220. Cellular and developmental control of O₂ of hypoxia-inducible factor 1 / N. V. Iyer, L. E. Kotch, F. Agani et al. *Genes Dev.* 1998. Vol. 12. P. 149–162.

221. Wiener C. M., Booth G., Semenza G. L. In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Biophys. Res. Common.* 1996. Vol. 225. P. 485–488.

222. Immunoreactivity of neurogenic factor in the guinea pig brain after prenatal hypoxia / Y. Chunga, K. Sob, E. Kimc et al. *Ann. Anatomy.* 2015. Vol. 200. P. 66–72. DOI : 10.1016/j.aanat.2015.02.003.

223. The role and regulation of hypoxia-inducible factor-1 α expression in brain development and neonatal hypoxic-ischemic brain injury / X. Fan, C. J. Heijnen, M. A. van der Kooij et al. *Brain Res. Rev.* 2009. Vol. 62 (1) P. 99–108. DOI : 10.1016/j.brainresrev.2009.09.006.

224. Hypoxia inducible factor-1 α stabilization for regenerative therapy in traumatic brain injury / M. Khan, H. Khan, I. Singh, A. K. Singh. *Neural Regen. Res.* 2017. Vol. 12 (5). P. 696–701. DOI : 10.4103/1673–5374.206632.

225. Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) is required for neural stem cell maintenance and vascular stability in the adult mouse SVZ / L. Li, K. M. Candelario, K. Thomas et al. *J. Neurosci.* 2014. Vol. 34. P. 16713–16719.

226. Virtue S., Vidal-Puig A. Nothing Iffy about HIF in the Hypothalamus. *PLoS Biol.* 2011. Vol. 9 (7). P. e1001116. DOI : 10.1371/journal.pbio.1001116.

227. HRF, a putative basic helix loop helix PAS domain transcription factor is closely related to hypoxia inducible factor 1 α and developmentally expressed in blood vessels / I. Flamme, T. Frohlich, M. von Reutern et al. *Mech. Dev.* 1997. Vol. 63 (1). P. 51–60.

228. Oxygen dependent regulation of hypoxia inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation / D. Lando, J. J. Gorman, M. L. Whitelaw, D. J. Peet. *Eur. J. Biochem.* 2003. Vol. 270 (5). P. 781–790.

229. Hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α is subject to extensive alternative splicing in human tissues and cancer cells and is regulated by HIF-1 but not HIF-2 / A. Pasanen, M. Heikkilä, K. Rautavuoma et al. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010. Vol. 42. P. 1189–1200. DOI : 10.1016/j.biocel.2010.04.008.

230. Brune B., Zhou J. The Role of Nitric Oxide (NO) in Stability Regulation of Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α). *Curr. Med. Chem.* 2003. Vol. 10. P. 845–855. DOI : 10.2174/0929867033457746.

231. Zagórska A., Dulak J. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochimicac Polonica.* 2004. Vol. 51 (3). P. 563–585.

232. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia inducible factor (HIF) 1 α and HIF 2 α expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF 1 α / T. Uchida, F. Rossignol, M. A. Matthay et al. *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279 (15). P. 14871–14878.

233. Cellular and molecular mechanisms in the hypoxic tissue: role of HIF-1 and ROSCell / A. B. Zepeda, Jr. A. Pessoa, R. L. Castillo et al. *Biochem. Funct.* 2013. Vol. 31. P. 451–459. DOI : 10.1002/cbf.2985.

234. Oxygen Sensing in the Brain / F. L. Powell, C. B. Kim, R. S. Johnson et al. *Arterial Chemoreceptors.* Advances in Experimental Medicine and Biology. 2009. Vol. 648. P. 369–376. DOI : 10.1007/978-90-481-2259-242.

235. Activation of metallothionein gene expression by hypoxia involves metal response elements and metal transcription factor 1 / B. J. Murphy, G. K. Andrews, D. Bittel et al. *Cancer Res.* 1999. Vol. 59 (6). P. 1315–1322.

236. Murphy B. J. Regulation of malignant progression by the hypoxia sensitive transcription factors HIF 1 α and MTF 1. *Comparative Biochem. Physiol.* 2004. Vol. 139, N 3. P. 495–507.

237. Ravenna L., Salvatori L., Russo M. A. HIF3 α : the little we know. *FEBS J.* 2016. Vol. 283. P. 993–1003. DOI : 10.1111/febs.13572.

238. The human HIF (hypoxia-inducible factor)-3 α gene is a HIF-1 target gene and may modulate hypoxic gene induction / T. Tanaka, M. Wiesener, W.

Bernhardt et al. *Biochem. J.* 2009. Vol. 424. P. 143–151. DOI : 10.1042/BJ20090120.

239. Loboda A., Jozkowicz A., Dulak J. HIF-1 versus HIF-2 - Is one more important than the other? *Vascular. Pharmacol.* Vol. 56 (2012) P. 245–251. DOI : 10.1016/j.vph.2012.02.006.

240. HIF1 α and physiological responses to hypoxia are correlated in mice but not in rats / A. Jochmans-Lemoine, M. Shahare, J. Soliz, V. Joseph. *J. Experim. Biol.* 2016. Vol. 219. P. 3952–3961. DOI : 10.1242/jeb.142869.

241. Bruick R. K., McKnight S. L. A conserved family of prolyl 4 hydroxylases that modify HIF. *Science.* 2001. Vol. 294. P. 1337–1340.

242. Masson N., Ratcliffe P. J. HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O₂ levels. *J. Cell Sci.* 2003. Vol. 116. P. 3041–3049.

243. Neogenesis and proliferation of beta-cells induced by human betacellulin gene transduction via retrograde pancreatic duct injection of an adenovirus vector / Y. Tokui, J. Kozawa, K. Yamagata et al. *Biochem. Biophys.* 2006. Vol. 1, N 350 (suppl. 4). P. 987–993.

244. HIF 1 α targeted for VHL mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O₂ sensing / M. Ivan, K. Kondo, H. F. Yang et al. *Science.* 2001. Vol. 292. P. 464–468.

245. Brainstem Hypoxia Contributes to the Development of Hypertension in the Spontaneously Hypertensive Rat / N. Marina, R. Ang, A. Machhada et al. *Hypertension.* 2015. Vol. 65. P. 775–783. DOI : 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04683.

246. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: a hypoxic switch / D. Lando, D. J. Peet, D. A. Whelan et al. *Science.* 2002. Vol. 295. P. 858–861.

247. Hypoxia inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family / K. S. Hewitson, L. A. McNeill, M. V. Riordan et al. *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P. 26351–26355.

248. Marti H. H. Erythropoietin and the hypoxic brain. *J. Exp. Biol.* 2004. Vol. 207 (pt 18). P. 3233–3242.
249. Thomas B. J., Wanstall J. C. Alterations in pulmonary vascular function in rats exposed to intermittent hypoxia. *Eur. J. Pharmacol.* 2003. Vol. 477. P. 153–161.
250. Intermittent Hypoxia and Cardiovascular System / Xi L., Serebrovskaya T. V. *Intermittent Hypoxia and Human Diseases*. Nova Sci. Publ. Inc. N.-Y.: 2009. Section 1. P. 1–242.
251. Адаптация к периодической гипоксии в терапии и профилактике / Ф. З. Меерсон, В. П. Твердохлиб, В. М. Боев, Б. А. Фролов. М. : Наука, 1989. 70 с.
252. Жиронкин В.Г. О повышении устойчивости животных к токсическому действию избытка кислорода путем гипоксической тренировки. *Кислородная недостаточность*. К. : Изд. АН УССР, 1963. С. 353.
253. Fedele A. O., Murray L. W., Peet D. J. Regulation of Gene Expression by the Hypoxia Inducible Factors. *Molecular Interventions*. 2002. Vol. 2. P. 229-243.
254. Волков Н. И. Гипоксия и анаэробная производительность спортсменов. *Акклиматизация и тренировка спортсменов в горной местности*. Алма-Ата, 1965. С. 103.
255. Гандельсман А. Б. Кислородная недостаточность и двигательная деятельность. *Координация двигательных и вегетативных функций при мышечной деятельности человека*. М. ; Л. : Наука, 1965. С. 44.
256. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика. М. : Наука. 1981. 279 с.
257. Стрелков Р. Б. Перспективы применения метода прерывистой нормобарической гипоксической стимуляции (гипокситерапии) в медицинской практике. *Вопр. курортологии, физиотерапии и лечебной физкультуры*. 1997. № 6. С. 37–40.
258. Ямборко П. В., Антипов И. В., Макарова Т. Г. Влияние гипоксически-гиперкапнической стимуляции на аэробную работоспособность. *Материалы 40-й науч.-практ. конф. врачей*. Ульяновск, 2005. С. 675–676.

259. Тетющев П. А. Гипоксия, адаптация, здоровье. Кировоград : Экологическая Медицина. Украинский Институт Экологии Человека Кировоградский Филиал. 1999.

260. Dehne N., Brüne B. Sensors, transmitters, and targets in mitochondrial oxygen shortage-a hypoxia-inducible factor relay story. *Antioxid. Redox. Signal.* 2014. Vol. 20 (2). P. 339–352. DOI : 10.1089/ars.2012.4776.

261. Effects of Intermittent Hypoxia Training on Peak Performance in Elite Athletes / Xi L., Serebrovskaya T. V. *Intermittent Hypoxia and Human Diseases.* 2009. Ch. 23. P. 459–472.

262. Холден Дж. С., Пристли Дж. Г. Дыхание. М. ; Л. : Гос. изд-во биол. мед. лит., 1935. 463 с.

263. Використання інтервальних гіпоксичних тренувань в комплексному лікуванні хворих на цукровий діабет і гіпертонічну хворобу / В. О. Жулінський, В. Г. Каджарян, Ю. М. Колесник та ін. *Матеріали XIV З'їзду терапевтів України.* К., 1998. С. 541–543.

264. Методы изучения нейроэндокринных взаимодействий в норме и при патологии / Ю. М. Колесник, А. В. Абрамов, А. В. Траилин та ін. *Запорож. мед. журн.* 2002. № 3. С. 8–11.

265. Intermittent Hypoxia and Nervous System / L. Xi, Serebrovskaya T. V. et al. *Intermittent hypoxia.* 2009. Section 3. P. 313-356.

266. Basovich S. N. Trends in the use of preconditioning to hypoxia for early prevention of future life diseases *BioSci. Trends.* 2013. Vol. 7 (1). P. 23–32. DOI : 10.5582/bst.2013.v7.1.23.

267. Увеличение неспецифической резистентности с помощью нормобарической гипоксической стимуляции / Р. Б. Стрелков, Ю. М. Караш, А. Я. Чижов и др. *Докл. АН СССР.* 1987. Т. 293. С. 493–496.

268. Lin A. M. Y. Hypoxic preconditioning protects against oxidative injury in the central nervous system / *Intermittent Hypoxia: From molecular mechanisms to clinical applications.* N.-Y. : Nova Sci. Publ. Inc., 2009. P. 313–328.

269. Sharp F. R., Ran R., Lu A. Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury. *NeuroRx.* 2004. Vol. 1. P. 26–35.

270. Doyle K. P., Simon R. P., Stenzel-Poore M. P. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacol.* 2008. Vol. 55, N 3. P. 310–318.

271. Hypoxic preconditioning attenuates global cerebral ischemic injury following asphyxial cardiac arrest through regulation of delta opioid receptor system / C. J. Gao, L. Niu, P. C. Ren et al. *Neurosci.* 2012; Vol. 202. P. 352–362.

272. Hypoxia preconditioning in the brain / R. Ran, H. Xu, A. Lu et al. *Dev. Neurosci.* 2005. Vol. 27. P. 87–92.

273. Protection of the right ventricle from ischemia and reperfusion by preceding hypoxia / P. Freitag, S. Frede, H. Jakob et al. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2008. Vol. 378. P. 27–32.

274. Wang R., Xu F., Liu J. Prenatal hypoxia preconditioning improves hypoxic ventilatory response and reduces mortality in neonatal rats. *J. Perinat. Med.* 2008. Vol. 36. P. 161–167.

275. Изменения системной гемодинамики и сосудистого русла скелетных мышц у крыс, адаптированных к гипоксии / В. Б. Кошелев, О. С. Тарасова, Т. П. Сторожевых и др. *Физиол. журн. СССР им. И.М.Сеченова.* 1991. Т. 77. С. 123–129.

276. Goda N., Kanai M. Hypoxia-inducible factors and their roles in energy metabolism. *Int. J. Hematol.* 2012. Vol. 95. P. 457–463.

277. Fuhrmann D. C., Brüne B. Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia. *Redox. Biol.* 2017. Vol. 12. P. 208–215. DOI : 10.1016/j.redox.2017.02.012.

278. Preterm Hypoxic-Ischemic Encephalopathy / K. R. Gopagondanahalli, G. Li, M. C. Fahey et al. *Front. Pediatr.* 2016. Vol. 4 (114). P. 1–10. DOI : 10.3389/fped.2016.00114.

279. Prevention of neurodegenerative damage to the brain in rats in experimental Alzheimer's disease by adaptation to hypoxia / E. B. Manukhina, A. V. Goryacheva, I. V. Barskov et al. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2010. Vol. 40. P. 737–743.

280. Organ protection by hypoxia and hypoxia-inducible factors / W. M. Bernhardt, C. Warnecke, C. Willam et al. *Methods Enzymol.* 2007. Vol. 435. P. 221–245.

281. Hamlin M. J., Hellemans J. Effect of intermittent normobaric hypoxic exposure at rest on haematological, physiological, and performance parameters in multi- sport athletes. *J. Sports Sci.* 2007. Vol. 25. P. 431–441.

282. Acute hypoxia activates neuroendocrine, but not presympathetic, neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus: differential role of nitric oxide / K. M. Coldren, D. P. Li, D. D. Kline et al. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2017. Vol. 312. P. R982–995. DOI : 10.1152/ajpregu.00543.2016.

283. Белошицкий П. В., Колчинская А. З. Гипокситерапия в горных условиях (тезисы к 1-й междунар. конф. «Гипоксия в медицине»). *Hypoxia Med. J.* 1994. № 2. С. 68.

284. Твердохлиб В. П., Меерсон Ф. З. Адаптация к гипоксии: реализация теоретической концепции в терапии неинфекционных заболеваний (тезисы к 1-й междунар.конф. «Гипоксия в медицине»). *Hypoxia Med. J.* 1994. № 2. С. 69–70.

285. Система про- и антиоксидантного равновесия при адаптации к периодической гипоксии в условиях алкогольной интоксикации / Л. П. Козак, Я. И. Алексевич, О. И. Терлецкая и др. *Hypoxia Med. J.* 2000. Т. 8, № 3-4. С. 34–36.

286. Сумаруков Г. В. Окислительное равновесие и радиочувствительность организмов. М. : Атомиздат, 1970. 104 с.

287. Effects of high altitude stay on the incidence of common diseases in man / I. Singh, I. S. Chohan, M. Lal et al. *Int. J. Biometeor.* 1977. Vol. 21. P. 93–122.

288. Клинико-функциональный эффект от курса интервальной нормобарической гипоксической терапии у больных хроническим обструктивным бронхитом и бронхиальной астмой / О. В. Александров, П. В. Стручков, Р. С. Виницкая и др. *Терапевт. арх.* 1999. Т. 71. С. 28–32.

289. Эффекты использования нормобарической тренировки прерывистой гипоксии в качестве метода предоперационной подготовки к коронарному шунтированию у пациентов с ишемической кардиомиопатией / Л. В. Рачок, Т. А. Дубовик, А. Г. Булгак и др. *Кардиология в Беларуси.* 2011. № 17. С. 28–45.

290. Методические рекомендации по применению прерванной гипоксической тренировки у пациентов с ишемической кардиомиопатией, готовящихся к коронарному шунту с искусственным кровообращением : утв. 08.04.2011 / Министерство здравоохранения Республики Беларусь. URL : <http://www.cardio.by/files/instrukcii/202-1210.doc>

291. Нормобарическая гипокситерапия : метод. рекомендации / Минздрав России. Москва, 1988.

292. Интервальная гипоксическая тренировка в акушерско-гинекологической практике : метод. рекомендации / Минздрав России. Москва, 1993.

293. Вербоноль В. Ю., Чижов А. Я. Развитие детей, рожденных от матерей, лечившихся нормобарической гипоксией. *Педиатрия*. 1990. № 5. С. 55–59.

294. Евгеньева И. А., Караш Ю. М., Чижов А. Я. Профилактическое применение прерывистой нормобарической гипоксической гипоксии у беременных с высоким риском развития позднего токсикоза. *Акушерство и гинекология*. 1989. № 6. С. 50–53.

295. Цыганова Т. Н. Использование нормобарического гипоксического тренинга в акушерстве. *Вестн. РАМН*. 1997. № 5. С. 30–33.

296. Чижов А. Я., Евгеньева И. А., Караш Ю. М. Кинетика кислородного обмена у беременных с высоким риском развития поздней токсемии при прерывистой нормобарической гипоксии. *Акушерство и гинекология*. 1989. № 5. С. 17–20.

297. Биоритм напряжения кислорода в тканях матки и плода / А. Я. Чижов, В. Г. Филимонов, Ю. М. Караш, Р. Б. Стрелков. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 1981. Т. 91. С. 392–394.

298. Чижов А. Я. Физиологические основы метода повышения неспецифической резистентности организма путем адаптации к прерывистой нормобарической гипоксии. *Физиол. журн*. 1992. Т. 38. С. 13–17.

299. Liu J.-L., Ma S.-Q., Wuren T.N. Effect of High Altitude Hypoxia on Fetal Development During Pregnancy and the Reason Analysis. *Sheng Li Xue Bao*. 2017. Vol. 69, N 2. P. 235-239.

300. Interval hypoxic training in planned abdominal delivery. 1 : Effects on epinephrine and glucose levels in blood plasma before and after surgery / A. I. Adiyatulin, A. N. Pilyavskaya, B. G. Pilyavsky, E. N. Tkatchouk. *Hypoxia Med. J.* 1996. Vol. 4: P. 23–25.

301. Pilyavskaya A. N., Adiyatullin A. I., Tkachouk E. N. Interval hypoxic training in preparation to planned abdominal delivery. 2 : Effect of the free radical-mediated oxidation parameters in blood plasma of pregnant women, in umbilical blood and in placenta. *Hypoxia Med. J.* 1997. Vol. 5. P. 14–17.

302. Tkatchouk E. N., Makatsariya A. D. Interval hypoxic training in pre- and postoperation periods as prophylaxis of postoperation complications in gynecological patients. *Hypoxia Med. J.* 1993. Vol. 1. P. 21–25.

303. Абрамов А. В., Колесник Ю. М., Іваненко Т. В. Вплив переривчастої гіпоксії на функціональний стан бета-клітин панкреатичних острівців при експериментальному цукровому діабеті. *Здобутки клінічної і експерим. медицини.* 2011. № 2 (13). С. 10–13.

304. Paxinos G. D. Watson C. C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed. N.-Y. : Academic Press, 1985. 264 p.

305. Пирс Э. Гистохимия. М. : Изд-во иностр. лит., 1962. 962 с.

306. Bustin S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 2002. Vol. 29. P. 23–39.

307. Гайдышев И. П. Решение научных и инженерных задач средствами Excel, VBA и C/C++. СПб. : БХВ-Петербург, 2004. 504 с.

308. Loebrich S., Nedivi E. The function of activity-regulated genes in the nervous system. *Physiol. Rev.* 2009. Vol. 89, N 4. P. 1079–1103.

309. Perez-Cadahia B., Drobic B., Davie J. R. Activation and function of immediate-early genes in the nervous system. *Biochem. Cell Biol.* 2011. Vol. 89. P. 61–73.

310. Bullitt E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J. Comp. Neurology.* 1990. Vol. 296. P. 517–530.

311. Hoffman G. E., Smith M. S., Verbalis J. G. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front. Neuroendocrinol.* 1993. Vol. 14, N 3. P. 173–213.

312. Majmundar A. J, Wong W. J, Simon M. C. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol. Cell.* 2010. Vol. 40 (2). P. 294–309. DOI : 10.1016/j.molcel.2010.09.022.

313. Prabhakar N. R, Semenza G. L. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol. Rev.* 2012. Vol. 92 (3). P. 967–1003. DOI : 10.1152/physrev.00030.2011.

314. 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.

315. Абрамов А. В., Шаменко В. А. Особенности экспрессии HIF-1 α и HIF-3 α 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.

316. 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.

317. Абрамов А. В., Колесник Ю. М., Шаменко В. О. Функціональний стан вазопресинергічної системи гіпоталамуса при багатоденної 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.

318. 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 міжнар. участю, присвяч. 105-річчю від дня народж. проф. Я.Д. Кіршенבלата, м. Чернівці, 5-6 жовт. 2017 р. Чернівці, 2017. С. 9.

319. Особливості реакції крупноклітинних вазопресинергічних нейронів супраоптичного та паравентрікулярного ядер гіпоталамуса при переривчастої дії гіпоксичної гіпоксії / А. В. Абрамов, В. О. Шаменко, Ю. М. Колесник та ін. *Фізіол. журн.* 2019. Т. 65, № 3 (додаток) : матеріали ХХ 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.

320. Шаменко В. А., Абрамов А. В. Морфофункціональні змінення нейронів супраоптичного ядра гіпоталамуса 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.

321. Шаменко В. А., Василенко Г. В., Абрамов А. В. Морфогистохимическая характеристика крупноклеточных вазопресинергических нейронів 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.

322. Абрамов А. В., Шаменко В. А., Колесник Ю. М. Влияние прерывистой гипоксии на функциональное состояние паравентрикулярного ядра гипоталамуса и экспрессию гена *hif-1 α* и белка HIF-1 α у крыс линии Вистар. *Патологія. Реабілітація. Адаптація.* 2017. № 15 (1). С. 8–14.

323. Абрамов А. В., Шаменко В. А., Колесник Ю. М. Сравнительная характеристика реакции вазопресинергических нейронів супраоптичного 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.

324. Абрамов А. В., Шаменко В. А. Сравнительная характеристика нейроэндокринного ответа крупноклеточных и мелкоклеточных вазопресинергических нейронів 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.

325. Функціональний стан нейросекреторних нейронів паравентрікулярного ядра гіпоталамуса щурів при адаптації до гіпоксичної гіпоксії / А. В. Абрамов, Ю. М. Колесник, В. О. Шаменко та ін. *Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики* : матеріали VII Пленуму Укр. наук. т-ва патофізіологів та наук.-практ. конф.ї, 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.

326. 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.

327. Шаменко В. О. Вплив переривчастої гіпоксії на функціональний стан крупноклітинних суб'ядер паравентрікулярного 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.

328. Silva S. M., Paula-Barbosa M. M., Madeira M. D. Prolonged alcohol intake leads to reversible depression of corticotrophin-releasing hormone and vasopressin immunoreactivity and mRNA levels in the parvocellular neurons of the paraventricular nucleus. *Brain Res*. 2002. Vol. 954. P. 82–93.

329. Угрюмов М. В. Нейроэндокринная регуляция в онтогенезе (структурно-функциональные основы). М. : Наука, 1989. 247 с.

330. Shamenko V. O., Kadzharian I. V., Abramov A. V. Intermittent hypobaric hypoxia and neuroendocrine reaction of the parvocellular neurons of the

paraventricular nuclei of the hypothalamus. *Патологія*. 2019. Т. 16, № 3 (44). С. 334–338. DOI : 10.14739/2310-1237.2019.3.188834.

331. Шаменко В. О., Каджарян Є. В., Абрамов А. В. Особливості нейроендокринної відповіді нейронів паравентрикулярного ядра гіпоталамуса 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.

332. Astrocytes and Brain Hypoxia Hypoxia / N. Nephtali, V. Kasymov, G. L. Ackland et al. *Adv. Experim. Med. Biol.* 2016. Vol. 903. P. 201–207.

333. Hypoxia-Inducible Factor Directs POMC Gene to Mediate Hypothalamic Glucose Sensing and Energy Balance Regulation / H. Zhang, G. Zhang, F. J. Gonzalez et al. *PLoS Biol.* 2011. Vol. 9 (7). P. e1001112. DOI : 10.1371/journal.pbio.1001112.

334. Harrell C. S, Rowson S. A, Neigh G. N. Pharmacological stimulation of Hypoxia Inducible Factor-1 α facilitates the corticosterone response to a mild acute stressor. *Neurosci. Lett.* 2015. Vol. 600. P. 75–79.

335. Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain / P. Maiti, S. B. Singh, A. K. Sharma et al. *Neurochem. International.* 2006. Vol. 49. P. 709–716. DOI : 10.1016/j.neuint.2006.06.002.

336. Pugh C. W. Modulation of the Hypoxic Response. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016. Vol. 903. P. 259–271. DOI : 10.1007/978-1-4899-7678-9_18.

337. Tsigos C., Chrousos G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosomatic Res.* 2002. Vol. 53. P. 865-871.

338. Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function / S.-L. Yang, W. Chao, Z.-F. Xiong, X. Fang. *Mol. Med. Rep.* 2015. Vol. 12. P. 2411–2416. DOI : 10.3892/mmr.2015.3689.

339. Brain adaptation to hypoxia and hyperoxia in mice / L. Terraneo, R. Paroni, P. Bianciardi et al. *Redox. Biol.* 2017. Vol. 11 P. 12–20. DOI : 10.1016/j.redox.2016.10.018.

340. Hypoxia-inducible factor 3 is an oxygen-dependent transcription activator and regulates a distinct transcriptional response to hypoxia / P. Zhang, Q. Yao, L. Lu et al. *Cell Rep.* 2014. Vol. 6. P. 1110–1121. DOI : 10.1016/j.celrep.2014.02.011.

341. Duan C. Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2016. Vol. 310. P. C260–C269. DOI : 10.1152/ajpcell.00315.2015.

342. The corticotrophin-releasing hormone network and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: molecular and cellular mechanisms involved / J. J. Bonfiglio, C. Inda, D. Refojo et al. *Neuroendocrinol.* 2011. Vol. 94. P. 12–20. DOI : 10.1159/000328226.

343. Arginine-vasopressin marker copeptin is a sensitive plasma surrogate of hypoxic exposure / L. Ostergaard, A. Rudiger, S. Wellmann et al. *Hypoxia.* 2014. Vol. 2. P. 143–151. DOI : 10.2147/HP.S57894.

344. Абрамов А. В., Шаменко В. А., Василенко Г. В. Экспрессия мРНК 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.

345. Surge of peripheral arginine vasopressin in a rat model of birth asphyxia / M. Summanen, S. Bäck, J. Voipio, K. Kaila. *Front Cell Neurosci.* 2018. Vol. 12 (2). P. 1–9. DOI : 10.3389/fncel.2018.00002.

346. Effects of hypoxemia at sea level and high altitude on sodium excretion and hormonal levels / G. Ramirez, M. Hammond, S. J. Agosti et al. *Aviat. Space Environ Med.* 1992. Vol. 63 (10). P. 891–898.

347. Recovery of plasma volume after 1 week of exposure at 4,350 m / P. Robach, E. Lafforgue, N. V. Olsen et al. *Pflugers Arch.* 2002. Vol. 444 (6). P. 821–828. DOI : 10.1007/s00424-002-0894-x.

348. Rostrup M. Catecholamines, hypoxia and high altitude. *Acta Physiol. Scand.* 1998. Vol. 162. P. 389–399. DOI : 10.1046/j.1365-201X.1998.00335.x.

349. Keller-Wood M. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis-feedback control. *Compr. Physiol.* 2015. Vol. 5. P. 1161–1182. DOI : 10.1002/cphy.c140065.

350. Colocalization of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus and hypothalamus / F. Han, H. Ozawa, K. Matsuda et al. *Neurosci. Res.* 2005. Vol. 51. P. 371–381. DOI :10.1016/j.neures.2004.12.013.

ДОДАТОК А1



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції: Особливості реактивності вазопреснергічної системи супраоптичного ядра гіпоталамусу при адаптації до гіпоксичної гіпоксії.
2. Заклад, що розробив пропозицію, поштова адреса: Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, пр. Мажковського, 26.
3. Джерело інформації:
 1. Шаменко В.А. Морфогистохимическая характеристика нейронов супраоптического ядра гипоталамуса крыс при действии прерывистой гипоксии // Ежемес. науч. ж. науч. Фонда «Биолог». - 2014. - № 4. - С. 29-32
 2. Шаменко В.А. Морфофункциональное состояние крупноклеточных нейронов паравентрикулярного ядра гипоталамуса при прерывистом действии гипоксической гипоксии // Клінічна фармація. - 2015. - Vol. 19, No.4. - С.71-73.
 3. Абрамов А.В., Шаменко В.А., Колесник Ю.М. Экспрессия белка c-Fos в гипоталамусе крыс при многодневном действии прерывистой гипоксической гипоксии // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. - 2017. - Т.17. - № 4 (60), ч.2. - С.5-8
4. Базова установа, яка проводить впровадження: ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», кафедра патологічної фізіології (протокол № 17 від 5.04. 2018 р.).
5. Термін впровадження: 2017 – 2018 навчальний рік.
6. Форма впровадження: матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри - лекційному курсі та практичних заняттях з патофізіології за темою «Патофізіологія гіпоксичних станів» і «Загальної адаптаційної синдром, стрес».
7. Зауваження і пропозиції: Не вносилися.

Відповідальний за впровадження:

Професор кафедри патологічної фізіології
ВДНЗ України «Буковинський державний
медичний університет»
д.біол.н., професор

Мислицький В.Ф.

ДОДАТОК А2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Т. в. о. ректора з науково-педагогічної роботи Одеського національного медичного університету МОЗ України
д.мед.н., професор



Марічерда В.Г.

2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозицій:** Вплив центральних нейроендокринних механізмів гіпоталамусу в механізмах адаптації до гіпоксичної гіпоксії.
2. **Заклад, що розробив пропозицію, поштова адреса:** Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26.
3. **Джерело інформації:**
 1. Шаменко В.А. Морфогистохимическая характеристика нейронов супраоптического ядра гипоталамуса крыс при действии прерывистой гипоксии // Ежемес. науч. ж. науч. Фонда «Биолог». - 2014. - № 4. - С. 29-32
 2. Шаменко В.А. Морфофункциональное состояние крупноклеточных нейронов паравентрикулярного ядра гипоталамуса при прерывистом действии гипоксической гипоксии // Клінічна фармація.- 2015. - Vol. 19, No.4. - С. 71-73.
 3. Абрамов А.В., Шаменко В.А., Колесник Ю.М. Экспрессия белка c-Fos в гипоталамусе крыс при многодневном действии прерывистой гипоксической гипоксии // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. - 2017. - Т.17. - № 4 (60), ч. 2. - С. 5-8.
 4. Абрамов АВ, Шаменко ВА, Колесник ЮМ Влияние прерывистой гипоксии на функциональное состояние паравентрикулярного ядра гипоталамуса и экспрессию гена *hif-1a* и белка HIF-1a у крыс линии Вистар // Патологія. Реабілітація. Адаптація.- 2017.- №15 (1).- С. 8-14
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра загальної та клінічної патофізіології ім. В.В. Підвисоцького Одеського національного медичного університету МОЗ України.
5. **Термін впровадження:** 2017 – 2018 навчальний рік.
6. **Форма впровадження:** матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри - лекційному курсі та практичних заняттях з патофізіології за темою «Патофізіологія гіпоксичних станів» і «Загальний адаптаційний синдром, стрес».
7. **Зауваження і пропозиції:** Не вносилися. Не вносилися. Обговорено та затверджено на методичному засіданні кафедри загальної та клінічної патофізіології, протокол № 10 від 23 травня 2018 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедрою загальної та клінічної патофізіології ім. В.В. Підвисоцького Одеського національного медичного університету МОЗ України
д.мед.н., професор

Вастьянов Р.С.

ДОДАТОК АЗ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Проректор з наукової роботи
 Запорізького державного
 медичного університету



Туманський В.О.

 2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції: Реактивність вазопресинергічної системи гіпоталамусу при адаптації до гіпоксичної гіпоксії.
2. Заклад, що розробив пропозицію, поштова адреса: Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, пр. Мажковського, 26.
3. Джерело інформації:
 1. Абрамов А.В., Колесник Ю.М., Шаменко В.О. Функціональний стан вазопресинергічної системи гіпоталамусу при багатоденній дії переривчастої гіпоксичної гіпоксії // Клінічна та експериментальна патологія. 2018.- Т. 17, № 3 (65), ч.2.- С. 9-15.
 2. Абрамов А.В., Шаменко В.А., Колесник Ю.М. Сравнительная характеристика реакции вазопресинергических нейронов супраоптического и паравентрикулярного ядер гипоталамуса при прерывистом действии гипоксической гипоксии // Патология. – 2018.- Т. 15, № 3 (44). – С. 360-366.
4. Базова установа, яка проводить впровадження: Запорізький державний медичний університет, кафедра патологічної фізіології (протокол №9 від 12.03.2019 р).
5. Термін впровадження: 2018 – 2019 навчальний рік.
6. Форма впровадження: матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри - лекційному курсі та практичних заняттях з патофізіології за темою «Патофізіологія гіпоксичних станів» і «Загальний адаптаційний синдром, стрес».
7. Зауваження і пропозиції: Не вносилися.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри патологічної фізіології
 Запорізького державного
 медичного університету
 д.мед.н., професор



Ганчева О. В.

ДОДАТОК А4



1. Назва пропозиції: Механізми участі вазопреснергічної системи гіпоталамусу у нейроендокринній адаптації організму до гіпоксичної гіпоксії.

2. Заклад, що розробив пропозицію, поштова адреса: Запорізький державний медичний університет, кафедра патологічної фізіології, м. Запоріжжя, просп. Маяковського, 26.

3. Джерело інформації:

1. Абрамов А.В., Колесник Ю.М., Шаменко В.О. Функціональний стан вазопреснергічної системи гіпоталамусу при багатоденній дії переривчастої гіпоксичної гіпоксії // Клінічна та експериментальна патологія. 2018.- Т. 17, № 3 (65), ч.2.- С. 9-15.

2. Абрамов А.В., Шаменко В.А., Колесник Ю.М. Сравнительная характеристика реакции вазопреснергических нейронов супраоптического и паравентрикулярного ядер гипоталамуса при прерывистом действии гипоксической гипоксии // Патологія. – 2018.- Т. 15, № 3 (44). – С. 360-366.

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, кафедра патологічної фізіології (протокол № 27 від «26» березня 2019 р).

5. Термін впровадження: 2018-2019 навчальний рік.

6. Форма впровадження: матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри – лекційному курсі та практичних заняттях з патофізіології за темою «Патофізіологія гіпоксичних станів» і «Загальний адаптаційний синдром, стрес».

7. Зауваження і пропозиції: Не вносилися.

Відповідальний за впровадження:

Професор кафедри патологічної фізіології
Національного медичного університету
імені О.О. Богомольця
д.мед.н., професор



С.В. Зябліцен

ДОДАТОК Б
НАУКОВІ ПРАЦІ, ОПУБЛІКОВАНІ 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, сенситометричні 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 α и белка HIF-1 α 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 α и HIF-3 α 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 багатоденної 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 вазопрессинергических 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. Экспрессия мРНК 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, денситометричні дослідження та статистичну обробку результатів).*

15. Функціональний стан нейросекреторних нейронів паравентрікулярного ядра гіпоталамусу 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 ХХ-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 гіпоталамуса 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).

ДОДАТОК В

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. VI Пленум Українського наукового товариства патофізіологів: «Актуальні питання експериментальної та клінічної патофізіології» (Вінниця, 2014) – публікація тез.

2. Науково-практична конференція «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології»: 14-ті Данилевські читання (Харків, 2015) – публікація тез, усна доповідь.

3. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Актуальні проблеми сучасної патоморфології та патофізіології» (Запоріжжя, 2015) – публікація тез, усна доповідь.

4. VIII науково-практична конференція «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (Тернопіль, 2015) – публікація тез.

5. VII Національний з'їзд патофізіологів України «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції» (Харків, 2016) – публікація тез, усна доповідь.

6. Наукова конференція, присвячена 120-річчю від дня народження та 40-річчю від дня смерті акад. М.М. Сиротиніна. (Київ, 2017) – публікація статті, усна доповідь.

7. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 105-річчю від дня народження професора Я.Д. Кіршенבלата: «Фізіологія і патологія нейроімуноендокринної регуляції» (Чернівці, 2017) – публікація тез, усна доповідь.

8. Всеукраїнська науково-практична конференція молодих учених «Медична наука в практику охорони здоров'я» (Полтава, 2017) – публікація статті.

9. VII Пленум Українського наукового товариства патофізіологів та науково-практична конференція, присвячені 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) – публікація тез, усна доповідь.

10. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Вікові та хронобіологічні аспекти медицини і фармації» (Чернівці, 2018) – публікація статті, усна доповідь.

11. XX з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка (Київ, 2019) – публікація тез, усна доповідь.

12. II науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція» (Харків, 2019) – публікація тез, усна доповідь.