

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

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ІСАЧЕНКО МАРІЯ ІГОРІВНА

УДК : 616.127-007.61+[616-092.18:546.172.6]-092-07:577.112]-092.9

ДИСЕРТАЦІЯ

**ХАРАКТЕРИСТИКА МАРКЕРІВ РЕМОДЕЛЮВАННЯ МІОКАРДА
ЛІВОГО ШЛУНОЧКА І СТАНУ СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ ПРИ
ФІЗІОЛОГІЧНИХ ВПЛИВАХ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ
ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНАХ**

222 «Медицина»

22 «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ М.І.Ісаченко

Науковий керівник – **Колесник Юрій Михайлович**, Заслужений діяч науки і
техніки України, доктор медичних наук, професор

Запоріжжя – 2020

АНОТАЦІЯ

Ісаченко М.І. Характеристика маркерів ремоделювання міокарда лівого шлуночка і стану системи оксиду азоту при фізіологічних впливах та експериментальних патологічних станах. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина» (22 – Охорона здоров'я). – Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2020.

Метою роботи було з'ясувати характер співвідношення маркерів ремоделювання міокарда лівого шлуночка серця і особливості стану системи оксиду азоту при фізіологічних впливах (переривчаста 15-денна та 60-денна гіпоксія) та патологічних станах (спадкова артеріальна гіпертензія – SHR та ендокринно-сольова модель артеріальної гіпертензії).

Для реалізації мети були сформовані наступні завдання: вивчення масометричних і морфо-денситометричних характеристик кардіоміоцитів, стану системи оксиду азоту та маркерного профілю ремоделювання в інтактних щурів лінії Wistar; щурів лінії Wistar, які піддавалися 15-денній та 60-денній довготривалій переривчастій гіпоксії; щурів з есенціальною артеріальною гіпертензією (лінії SHR) та в щурів лінії Wistar з ендокринно-сольовою моделлю артеріальної гіпертензії, та визначення патогенетичних особливостей перебудов «геометрії» серця в залежності від стану системи оксиду азоту, етіопагенетичного чиннику та тривалості його впливу на серцево-судинну систему за результатами отриманих даних і їхнього аналізу.

Загальний результат проведеного комплексного дослідження ремоделювання міокарда лівого шлуночка при фізіологічних впливах та експериментальних патологічних станах показав, що ремоделювання міокарда, яке формується при гіпоксичних впливах різної тривалості (15 або 60 діб) та експериментальній артеріальній гіпертензії (первинній есенціальній

у щурів лінії SHR і вторинній ендокринно-соловій моделі артеріальної гіпертензії у щурів лінії Wistar) залежить від характеру етіологічного чиннику, його тривалості та патогенетичних особливостей морфо-структурних перебудов у серцевому м'язі, супроводжується збільшенням експресії мРНК ізоформ ферменту NOS, зміною його ізоформного профілю та концентрацій кінцевих метаболітів оксиду азоту (NO) – нітритів і нітротирозину, демонструє етіозалежні особливості морфо-денситометричних параметрів кардіоміоцитів, масометричних показників і кількісних значень імуногістохімічних маркерів ремоделювання міокарда (кардіотрофіну-1, колагену I типу, тайтину та анексіну V).

В роботі, проведеній на 58 статевозрілих щурах-самцях лінії Wistar і 10 статевозрілих щурах-самцях лінії SHR, були використані сучасні патофізіологічні (експериментальне моделювання), інструментальні (неінвазивне вимірювання артеріального тиску (АТ)), масометричні (маса серця, його питома щільність та відсоток частки серця (ЧМС) від загальної маси тварини), молекулярно-генетичні (дослідження експресії мРНК ізоформ ферменту NOS – nNOS, iNOS та eNOS), імуногістохімічні (визначення вмісту та концентрації імунореактивного матеріалу (ІРМ) до ізоформ ферменту NOS – nNOS, iNOS та eNOS; кардіотрофіну-1, колагену I типу, тайтину та анексіну V), біохімічні (концентрація нітротирозину в плазмі крові, вміст нітритів у гомогенатах серця), морфо-денситометричні (середня кількість ядер кардіоміоцитів у площі кадру, їхній середній лінійний розмір (мкм), щільність ядер до цитоплазми / мкм², концентрація нуклеїнових кислот в ядрі та цитоплазмі, (Oog)) при фізіологічних впливах та експериментальних патологічних станах; результати дослідження статистично проаналізовано.

Загальний результат проведеного дослідження дозволив оцінити спрямованість, ступінь вираження та тип ремоделювання міокарда в щурів із переривчастою гіпоксією різної тривалості та артеріальною гіпертензією різного генезу. Результати продемонстрували важливу роль системи оксиду

азоту в ремоделюванні, виявили закономірності її змін у залежності від етіопатогенезу впливів – фізіологічних або патологічних.

У результаті проведеного дослідження було встановлено, що в щурів з експериментальною переривчастою гіпоксією показники систолічного та діастолічного тиску знаходилися в межах нормотензивного діапазону, але в групі щурів із переривчастою гіпоксією тривалістю 15 діб (ПГ15) систолічний тиск достовірно перевищував значення контролю на 7 %, а середній – на 4 %. У щурів з переривчастою гіпоксією тривалістю 60 діб (ПГ60) виявлено достовірне перевищення всіх 3-х показників АТ систолічного тиску на 17 %, діастолічного на 21 % і середнього на 10 %.

У групах щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією (АГ) її формування очікувано супроводжувалось стійким підвищенням АТ в обох групах. У щурів лінії SHR з есенціальною АГ (група ЕАГ) показники систолічного, діастолічного та середнього АТ достовірно перевищували контрольні значення на 52 %, 49 % і 50 %, відповідно. У щурів лінії Wistar із змодельованою вторинною ендокринно-асоційованою АГ (ендокринно-сольова модель – ЕСАГ) перевищення систолічного тиску було аналогічним, на 52 %, тоді як діастолічний значно перевищував контрольні показники на 75 %, і, як наслідок, середній тиск зростав на 64 %.

Проведене дослідження показало, що інтервальні гіпоксичні впливи, незалежно від їхньої тривалості, призводять до збільшення маси серця та його питомої щільності. Але, на відміну від ПГ60, у щурів ПГ15 виявився достовірно вищий показник частки маси серця від маси на 12,7 %.

Сформована АГ, незалежно від її етіологічного чиннику, призводить до суттєвого збільшення маси серця в групі ЕАГ на 31,1 %, ЕСАГ на 27,4 %, що зумовлює збільшення питомої щільності в обох групах (на 19,4 % і 16 %, відповідно). В той час як у щурів ЕСАГ, на відміну від ЕАГ, достовірно більшим за контроль був ЧМС – 15,2 %.

Аналіз масометричних показників показав, що в усіх експериментальних моделях виявляються зміни маси серця і питомої щільності, що дає змогу

припустити їхнє збільшення не за рахунок дилатації камер серця, а за рахунок саме гіпертрофії міокарда.

Морфо-денситометричне дослідження дозволило виявити цікаві закономірності, залежно від виду і тривалості впливу досліджуваних факторів на серцево-судинну систему. У щурів усіх експериментальних груп виявлено порушення цитоархітектоніки та поліморфізм ядер кардіоміоцитів, відповідно до тяжкості і тривалості впливу.

У роботі вперше доведено, що гіпоксичний вплив, незалежно від його тривалості, призводить до розвитку перебудов у серцевому м'язі лівого шлуночку та супроводжується зменшенням за контроль кількості ядер у кардіоміоцитах із компенсаторним збільшенням їхнього розміру, особливо в щурів ПГ60 (у 2,5 рази більше за контроль). При цьому кількість ядер у щурів ПГ60 стає меншою за ПГ15 на 35,3 %. Через зміни загальної площі ядер і цитоплазми кардіоміоцитів, змінюється в бік зменшення їхня щільність. Такі морфо-структурні зміни ядер та їхнє співвідношення до цитоплазми є ознакою розвитку гіпертрофії, що стає відповіддю на гіпоксичний вплив. Встановлений факт меншої концентрації РНК в ядрах кардіоміоцитів щурів обох експериментальних груп необхідно розглядати, в першому випадку, при ПГ15, як результат збільшення їхньої площі із збереженням загального вмісту, в другому, при ПГ60 – як можливу ядерну дисфункцію.

Результати дослідження показали, що в щурів з АГ зменшення кількості ядер у кардіоміоцитах із компенсаторним збільшенням їхнього розміру мають залежність від етіопатогенезу. Отже, в щурів групи ЕСАГ кількість ядер була меншою за ЕАГ на 13,6 %, а розміри більшими на 54,7 %. Щільність ядер у щурів ЕАГ знижувалась порівняно до контролю на 18,5 % завдяки зменшенню їхньої загальної площі. У щурів ЕСАГ цей показник був меншим за контроль на 26,5 %, але в цій групі виявлено незначне підвищення загальної площі ядер. Цікавим був виявлений факт зменшення загальної площі цитоплазми в обох цих групах, що, ймовірно, пов'язано з розвитком інтерстиціального фіброзу. Виявлені зміни супроводжувалися ядерною дисфункцією, яку оцінили за

зменшеною концентрацією РНК в ядрах кардіоміоцитів щурів з ЕАГ на 44,4 % і ЕСАГ на 68,9 %. Подібне більш виражене зменшення в щурів з ЕСАГ, порівняно до ЕАГ, стосувалося також і концентрації РНК у цитоплазмі на 19,4 %, що вказує на більш виражену дисфункцію в щурів з ЕСАГ.

Важливим результатом дослідження ефектів впливу короткотривалої 15-денної гіпоксії стало отримання цілісної картини морфо-структурних перебудов у серцевому м'язі. Імунофлюоресцентним методом було встановлено, що в щурів ПГ15 результатом фізіологічного стимулюючого гіпоксичного впливу на серцево-судинну систему стала активація компенсаторних механізмів, які включали розвиток помірної гіпертрофії кардіоміоцитів, про що свідчив достовірно більший вміст кардіотрофіну-1 у повздожних волокнах; помірне підвищення жорсткості міокарда за рахунок збільшення вмісту та концентрації тайтину та вмісту колагену I типу в обох типах волокон, а також зниження інтенсивності загибелі кардіоміоцитів, ознакою чого було зменшення концентрації анексину V у поперечних волокнах на 11,5 %. Таке співвідношення маркерів свідчить про початок формування гіпертрофічного типу ремоделювання міокарда внаслідок короткотривалих гіпоксичних впливів, який носить захисно-компенсаторний характер та проявляється збереженням тайтин-колагенового співвідношення із зменшенням інтенсивності апоптозу порівняно до контролю.

Довготривала гіпоксична експозиція протягом 60 діб призвела до патологічних морфо-структурних перебудов міокарда лівого шлуночка щурів із значним збільшенням експресії усіх досліджуваних маркерів ремоделювання міокарда. Такі зміни маркерного профілю свідчать про виражену гіпертрофію кардіоміоцитів, індикатором якої виступає більші за контроль вміст і концентрація кардіотрофіну-1 в обох типах волокон – на 58,8 % і 65,8 % та 73,6 % і 56,9 %, відповідно; ознаки збільшення жорсткості міокарда із значним фіброзом, про що свідчать достовірно більші за контроль значення вмісту і концентрації тайтину в поперечних волокнах на 132,8 % і 101,9 %, а в повздожних волокнах – на 124,9 % і 71,2 %, відповідно, разом із

підвищенням експресії колагену I типу (вміст і концентрація в поперечних волокнах більша за контроль на 61,2 % і 68,8 % і у повздовжніх – на 41,9 % і 42,1 %, відповідно) та збільшений коефіцієнт тайтин-колагенового співвідношення; масивний апоптоз кардіоміоцитів, оцінкою ступеня якого стали більші за контроль вміст і концентрація анексину V в обох типах волокон майже в 2 рази. Описані зміни маркерного профілю ремоделювання міокарда в щурів ПГ60 дають підстави припустити фіброзно-апоптотичний тип патологічного ремоделювання міокарда.

Імуногістохімічні дослідження показників маркерного профілю вперше довели, що розвиток стійкого підвищення АТ в обох моделях призводить до формування патологічного ремоделювання міокарда, проявом якого стало збільшення експресії усіх досліджуваних маркерів. Слід зазначити, що при ЕАГ у щурів ремоделювання характеризується помірною гіпертрофією (вміст і концентрація кардіотрофіну-1 у поперечних волокнах більші за контроль на 27,4 % і 32,2 %, а у повздовжніх волокнах – на 42,6 % і 35,1 %, відповідно); формуванням фібротичних змін із підвищенням жорсткості міокарда, ознаками чого було збільшення вмісту та концентрації тайтину в поперечних волокнах на 12,2 % і 23 %, відповідно, вмісту колагену I типу в обох волокнах на 49 % і 31 %, відповідно, із більшою його концентрацією на 34 % в поперечних волокнах, що супроводжувалося зниженням тайтин-колагенового співвідношення порівняно з контролем; помірною апоптотичною активністю в міокарді (більші за контрольні показники вмісту і концентрації анексину V у поперечних волокнах на 58,4 % і 26,3 % і в повздовжніх волокнах – на 52,2 % і 27,7 %, відповідно). Виявлені структурні зміни в серцевому м'язі відповідають гіпертрофічно-фіброзному типу ремоделювання з помірно вираженими процесами апоптозу.

При експериментально змодельованій вторинній ендокринно-асоційованій АГ у щурів ЕСАГ вміст і концентрація усіх маркерів ремоделювання достовірно більші за контроль. Такі зміни характеризують патологічне ремоделювання міокарда (ПРМ), що включає: значну гіпертрофію

кардіоміоцитів (показники експресії кардіотрофіну-1 (вміст і концентрація) в поперечних волокнах більші на 80,3 % і 76,6 %, а у повздожних волокнах – на 80,3 % і 61,5 %, відповідно); виражений фіброз із значним підвищенням жорсткості міокарда, про що свідчили більші показники експресії тайтину в поперечних волокнах на 115,5 % і на 110,2 %, а у повздожних – на 107,1 % і 86,2 %, відповідно, що супроводжувалось більшим вмістом і концентрацією колагену I типу в поперечних волокнах на 67,6 % і 21,2 %, а у повздожних – на 41,9 % і 23,1 %, відповідно, і, як результат – суттєве зростання коефіцієнту тайтин-колагенового співвідношення; значну активність апоптотичного процесу – вміст і концентрація анексину V більші за контроль у поперечних волокнах на 64,3 % і 83 %, а в повздожних – на 56,9 % і 82,2 %, відповідно, що відповідає гіпертрофічно-апоптотичному типу ремоделювання міокарда.

Відповідно до поставленої мети дослідження, проведений імунофлюоресцентний аналіз ізоформного профілю NOS у щурів ПГ15 виявило достовірне зменшення вмісту nNOS на 20,6 % у поперечних волокнах без змін інших показників, такі зміни супроводжувалися достовірним збільшенням мРНК на 33 % порівняно до контролю. У цій групі вміст і концентрація iNOS у поперечних волокнах були достовірно більшими на 7,2 % і 28,1 %, а в повздожних на 14,7 % і 31,2 %, відповідно. Збільшена експресія імунореактивного матеріалу (IPM) iNOS формувалася на тлі високих значень відповідної мРНК, яка майже в 2,9 рази була вище, ніж контрольний показник. Вміст і концентрація IPM до eNOS у групі ПГ15 у поперечних волокнах були більше на 6,6 % і 25,4 %, відповідно, без достовірних змін у повздожних волокнах. Експресія мРНК eNOS була вище контрольних значень на 40 %.

У групі щурів ПГ60 ізоформний профіль NOS змінювався різноспрямовано, а саме, вміст і концентрація nNOS у поперечних волокнах були достовірно більші на 25,4 % і 45,8 %, відповідно; в повздожних волокнах – на 45,7 % і 146,2 %, відповідно, що разом зі збільшенням мРНК удвічі, порівняно до контролю, свідчить про значне переважання цієї ізоформи в

міокарді щурів з ПГ60. Вміст і концентрація iNOS у поперечних волокнах були менше на 26,1 % і 30 %, відповідно; в повздовжніх волокнах меншими на 33,3 % і 32,8 %, відповідно. Варто зазначити, що такі низькі значення IPM виявлялися на тлі збільшення мРНК iNOS у 5,7 разів, порівняно до контролю. Вміст та концентрація IPM до eNOS у групі ПГ60 змінювалися неоднозначно в поперечних та повздовжніх волокнах: у перших вміст і концентрація були достовірно більше за контроль на 7,5 % і 17 %, відповідно, а в других ці показники були достовірно менше на 11,9 % і 15,4 %, відповідно. Це супроводжувалося значним збільшенням мРНК на 312 %, порівняно до контролю.

У щурів з EAГ зміни ізоформного профілю носять різний ступень вираженості, при цьому характер експресії окремих ізоформ виявив етіологічну залежність. У щурів EAГ в поперечних волокнах спостерігалися достовірно вищі значення вмісту і концентрації nNOS на 5,7 % і 21,6 % у повздовжніх волокнах, в яких також на 23,1 % зростала її концентрація, порівняно до контролю. Разом з цим, мРНК nNOS була вище в 1,6 разів порівняно до контролю. У випадку з iNOS, вміст і концентрація в поперечних волокнах були вищими за контроль на 19,6 % і 22,6 %, відповідно. У повздовжніх волокнах виявлено також достовірне збільшення вмісту ізоформи iNOS на 28,7 % і концентрації на 33,1 %. Вартим уваги став факт встановлення більш високих значень мРНК iNOS у 3,5 рази порівняно до контролю. Виявлені зміни вмісту та концентрації eNOS не були такими значними: в поперечних волокнах ці показники були більше на 6,2 % та 16,5 %, відповідно, а в повздовжніх волокнах вищим за контроль на 5,6 % був тільки вміст, тимчасом як показник мРНК eNOS збільшився на 125 %.

Вперше досліджений характер змін ізоформного профілю в щурів ECAГ показав більші значення вмісту і концентрації nNOS у поперечних волокнах на 14,3 % і 34,4 %, відповідно, порівняно з контролем, а в повздовжніх – на 8,3 % і 23,8 %, відповідно. Водночас, експресія мРНК була вище значень контролю в 2,7 рази. Достовірно вищі значення вмісту та концентрації IPM до iNOS

виявлено як у поперечних, так і в повздовжніх волокнах: у перших – на 18,3 % та 21 %, в останніх – на 8,5 % і 12,2 %, відповідно. Разом з тим, встановлено значне переважання вмісту мРНК iNOS у 5,7 разів порівняно до контролю. Зміни eNOS у волокнах міокарда щурів мали свої особливості. Зокрема, вміст і концентрація в поперечних волокнах міокарда були достовірно вище на 16,2 % та 7,5 %, відповідно, а в повздовжніх виявлено зменшення на 7,6 % та 14,6 %, відповідно. Такі зміни супроводжувалися підвищеною експресією мРНК eNOS у 2,8 разів.

Важливою особливістю було виявлення біохімічним методом з реактивом Грісса достовірно високих показників концентрації нітритів у щурів ПГ15 та ЕАГ, які перевищували значення контролю на 21 % і 18,8 %, відповідно. Проте в групі ПГ60 та ЕСАГ встановлені достовірно менші значення концентрації, на 21,8 % і 11,7 %, відповідно. При цьому імуноферментне дослідження концентрації нітротирозину в групах щурів ПГ15 показало більші значення за контроль на 40,8 %, що, ймовірно, свідчить про початкову стадію розвитку нітрово-оксидативного стресу, але зі збереженою компенсацією цього стану. У групах ПГ60 та ЕСАГ відбулося значне та достовірне збільшення концентрації нітротирозину в плазмі крові на 80,6 % і 88,5 %, відповідно, що може характеризувати ступінь інтенсивності утворення ONOO- та дозволяє припустити посилення системного нітрово-оксидативного стресу.

Вперше на експериментальних моделях фізіологічних (переривчаста гіпоксія різної тривалості) та патологічних (АГ різного генезу) впливів на серцево-судинну систему визначено характер морфо-структурних змін у міокарді, встановлено ключові ланки їхнього патогенезу та доведена роль регуляторної системи оксиду азоту.

Встановлено, що короткотривала 15-денна гіпоксія формує фізіологічне ремоделювання міокарда з розвитком помірної гіпертрофії кардіоміоцитів, зниженням інтенсивності їхньої загибелі та підвищенням пружно-еластичних властивостей. Вперше визначено, що структурні перебудови в серцевому м'язі

розвиваються на тлі збільшення показників експресії мРНК до усіх 3-х ізоформ NOS, але зі зниженням IPM до nNOS, помірного збільшення eNOS із переважанням у міокарді iNOS, що супроводжується підвищенням рівнів стабільних метаболітів NO нітритів на 21 % і нітротирозину на 40,8 %.

Доведено, що довготривала гіпоксична експозиція протягом 60 діб призводить до патологічного ремоделювання міокарда з суттєвою гіпертрофією кардіоміоцитів; збільшенням жорсткості міокарда, значним фіброзом та масивним апоптозом кардіоміоцитів. Вперше встановлено, що ремоделювання серцевого м'язу відбувається через зміни співвідношення ізоформ ферменту NOS, характеризується збільшеною експресією конститутивних форм і зниженою індукцибельною на фоні значного підвищення мРНК усіх 3-х ізоформ; посиленням системного нітрозоксидативного стресу зі зниженням рівня нітритів на 21,8 % та значним збільшенням концентрації нітротирозину в плазмі крові на 80,6 %.

Дослідження показало, що АГ, як есенціальна в щурів лінії SHR, так і вторинна, ендокринно-асоційована, в щурів із ендокринно-сольовою моделлю, формує патологічне ремоделювання міокарда через збільшення маси серця, його питомої щільності та показників експресії усіх 4-х маркерів. Вперше встановлені відмінності морфо-структурних перебудов серцевого м'язу, що характеризуються в щурів із ЕАГ помірною апоптотичною активністю з гіпертрофією кардіоміоцитів, фібротичними змінами та підвищеною жорсткістю міокарда. Тим часом як при ЕСАГ – значно виражені апоптоз і гіпертрофія кардіоміоцитів на тлі сформованого фіброзу з високою жорсткістю міокарда.

У проведеному дослідженні вперше встановлено, що при артеріальній гіпертензії зміни ізоформного профілю ферменту NOS у серцевому м'язі в моделі есенціальної АГ демонструють більш високі показники концентрації IPM до nNOS та eNOS із переважанням до iNOS на тлі підвищення мРНК усіх 3-х ізоформ, збільшений вміст кінцевих метаболітів NO нітритів на 18,8 % і нітротирозину на 26 %. При ендокринно-сольовій моделі АГ стан системи NO

характеризується підвищеною експресією мРНК до nNOS, eNOS і iNOS у 2,7, 2,8 і 5,7 разів, збільшенням ІРМ до них у міокарді із превалюванням nNOS; зменшенням рівнів нітритів на 11,7 % із збільшенням нітротирозину на 88,5 %.

У дисертаційній роботі експериментально доведено, що ремоделювання міокарда розвивається як при фізіологічних, так і патологічних впливах на серцево-судинну систему, а характер співвідношення маркерів ремоделювання та стан системи оксиду залежать від етіології та тривалості впливу.

Розроблено інформативні критерії характеру ремоделювання міокарда в експерименті та визначено, що короткотривала переривчаста гіпоксія формує фізіологічне ремоделювання міокарда за гіпертрофічним типом із підвищенням пружно-еластичних властивостей серцевого м'язу та зниженням інтенсивності загибелі кардіоміоцитів. Проте, довготривала гіпоксія призводить до патологічного ремоделювання міокарда за фіброзно-апоптотичним типом з вираженою гіпертрофією, фіброзом, збільшенням жорсткості міокарда та масивним апоптозом кардіоміоцитів. Розвиток АГ, незалежно від етіопатогенетичних особливостей, формує патологічне ремоделювання міокарда, характер якого має модельні відмінності: у випадку з есенціальною – це гіпертрофічно-фіброзний тип ремоделювання з помірно вираженими процесами апоптозу, при ендокрино-сольовій – гіпертрофічно-апоптотичний тип.

Обґрунтована патогенетична роль системи оксиду азоту в ремоделюванні міокарда при впливах на серцево-судинну систему, що характеризується підвищенням мРНК усіх 3-х ізоформ NOS на тлі збільшення концентрації нітротирозину в плазмі щурів. Доведена етіопатогенетична залежність змін ізоформного профілю ферменту NOS при тривалих гіпоксичних впливах і АГ, що призведе до зменшення рівня нітритів на фоні збільшення нітротирозину.

Нові теоретичні положення дисертації використовуються в навчальному процесі на кафедрі загальної патофізіології ДВНЗ «Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України»,

кафедри патофізіології Української медичної стоматологічної академії МОЗ України, кафедрі патологічної фізіології імені Д.О. Альперна Харківського національного медичного університету МОЗ України, кафедрі загальної та клінічної патофізіології ім. В.В. Підвисоцького Одеського національного медичного університету МОЗ України, кафедрі патологічної фізіології Дніпропетровської медичної академії МОЗ України, кафедрі патологічної фізіології Запорізького державного медичного університету МОЗ України та в роботі навчального медико-лабораторного центру Запорізького державного медичного університету МОЗ України.

За матеріалами дисертації опубліковано 13 наукових праць: 6 статей, серед яких 3 статті в журналах, які індексуються міжнародними наукометричними базами (Web of Science); 2 статті в закордонних журналах, 1 стаття в науковому фаховому виданні України, 7 тез у матеріалах міжнародних і Всеукраїнських з'їздів і науково-практичних конференцій. Матеріали дисертації були оприлюднені на 11 конференціях і конгресах у формі виступів. За матеріалами дисертації було отримано 3 гранти від Європейського товариства кардіології (ESC).

***Ключові слова:** ремоделювання міокарда: фізіологічне, патологічне, система оксиду азоту, маркери ремоделювання міокарда, експериментальна артеріальна гіпертензія, переривчаста гіпоксична гіпоксія, щури.*

SUMMARY

Isachenko M. I. Characteristics of left ventricular remodeling markers and nitrogen oxide system state in physiological influences and experimental pathological conditions. – Qualifying scientific work on the rights of manuscript.

Thesis for the degree of a Doctor of Philosophy: Specialty 222 – Medicine (22 Health care). – Zaporizhzhia State Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Zaporizhzhia, 2020.

Zaporizhzhia State Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Zaporizhzhia, 2020.

The aim of the study was to find out the pathogenetic mechanisms of nitrogen oxide system effect on left ventricular myocardial remodeling in rats in different conditions (intermittent 15-day and 60-day hypoxia) and hypertension (essential - SHR and endocrine-salt model).

To realize that aim, the following objectives were formulated: to study massmetric and morphodensitometric characteristics of cardiomyocytes, the state of the nitrogen oxide system and the marker profile of remodeling in intact Wistar rats; in Wistar rats exposed to 15-day and 60-day long-term intermittent hypoxia; in rats with essential arterial hypertension (SHR) and in Wistar rats with endocrine-salt model of arterial hypertension (ArtH) as well as to determine the pathogenetic features of the heart "geometry" remodeling depending on the nitrogen oxide system state, the etiopathogenetic factor and its impact duration on the cardiovascular system based on the analysis of the results obtained.

The overall result of the comprehensive study on the pathogenetic role of the nitrogen oxide system in left ventricular myocardial remodeling in physiological influences and experimental pathological conditions showed that myocardial remodeling in response to hypoxic effects of different duration (15 or 60 days) and experimental arterial hypertension (primary, essential in SHR and secondary, endocrine-salt-induced model of arterial hypertension in Wistar rats) depends on the nature of an etiological factor, its duration and pathogenetic features of morpho-structural changes in the heart muscle, accompanied by increased expression of NOS mRNA isoforms, changes in its isoform profile and terminal metabolites of NO (nitrites and nitrotyrosine) concentrations, shows etiologically related features of cardiomyocyte morphodensitometric parameters, massmetric parameters and quantitative values of myocardial remodeling immunohistochemical markers (cardiotrophin-1, type I collagen, titin and annexin V).

The following modern methods were used in 58 adult Wistar male rats and 10 adult male SHR: pathophysiological (15-day and 60-day hypoxic training, modeling of primary (SHR animals) and secondary (Wistar rats, endocrine-salt-induced) ArtH; instrumental (non-invasive blood pressure (BP) measurement, massmetric

(heart weight, its specific density and the heart-to-body weight ratio); molecular genetic (study on expression of NOS mRNA isoforms – nNOS, iNOS and eNOS); immunohistochemical (measurement of the immunoreactive material content and concentration to NOS isoforms of the enzyme – nNOS, iNOS and eNOS, cardiotrophin-1, type I collagen, titin and annexin V); biochemical (nitrotyrosine concentration in blood plasma and nitrites content); morphodensitometric (mean number of cardiomyocyte nuclei per area unit, the mean nuclear linear size (μm), the density of nuclei to the cytoplasm / μm^2 (the ratio of the total nuclear area to the cytoplasmic area), the concentration of nucleic acids in the nucleus and cytoplasm, (U_{OD})) in physiological influences and experimental pathological conditions. The study results were statistically analyzed.

The total study result allowed to assess the direction, severity and type of myocardial remodeling in rats with intermittent hypoxia of varying duration and hypertension of various origins. The results demonstrated the important role of the nitrogen oxide system in remodeling and revealed patterns of its changes depending on etiopathogenetic effects - physiological or pathological.

As a result of the study, it was found that in rats with experimental intermittent hypoxia systolic and diastolic blood pressure were within normotensive range, but in the group of rats with 15-day intermittent hypoxia (IH15), systolic blood pressure was significantly higher than the control and mean value by 7 % and 4 %, respectively. In rats with 60-day (IH60) intermittent hypoxia, all three indicators of BP were found to be significantly increased: systolic pressure by 17 %, diastolic by 21 % and mean by 10 %.

In the groups of rats with experimental arterial hypertension, its formation was predictably accompanied by a steady increase in BP in both groups. In SHR with essential ArtH (EAH group), the values of systolic, diastolic and mean BP were significantly higher than in the controls by 52 %, 49 % and 50 %, respectively. In Wistar rats with simulated secondary endocrine-associated ArtH (endocrine-salt ArtH - ESAH), there was a similar increase in systolic BP by 52 %, whereas

diastolic BP was significantly 75 % higher than the control values, as a result, mean BP was risen by 64 %.

The study showed that interval hypoxic effects, regardless of their duration, result in heart weight and specific density increase in rats. But in contrast to IH60, the heart-to-body weight ratio in rats IH15 was significantly 12.7 % higher.

Arth developed, regardless of its etiological factor, results in a significant increase in heart weight: in the EAH group by 31.1 % and ESAH - by 27.4 % determining increased specific density in both groups by 19.4 % and 16 %, respectively, while the heart-to-body weight ratio in ESAH rats, in contrast to EAH, was significantly 15.2 % higher than that in the control.

Analysis of massmetric parameters showed changes in heart weight and specific density in all experimental models suggesting their increase not due to the heart chambers dilatation, but rather through myocardial hypertrophy.

Morphodensitometric study revealed interesting patterns depending on the type and duration of the studied factors impact on the cardiovascular system. In rats of all experimental groups, cytoarchitectonic alterations and polymorphism of cardiomyocyte nuclei were detected associated with the severity and duration of exposure.

It has been proved for the first time that hypoxic effect, regardless of its duration, are accompanied by left ventricular remodeling and a decrease in the number cardiomyocyte nuclei with a compensatory increase in their size, especially in IH60 rats (2.5 times higher than the control). The number of nuclei in IH60 rats is less than that in IH15 by 35.3 %. Due to changes in the total area of cardiomyocyte nuclei and cytoplasm, the nuclear density shifts towards a decrease. Such morpho-structural changes of nuclei and nuclear-to-cytoplasmic ratio are a sign of hypertrophy development in a response to hypoxic effect. The lowered RNA concentration revealed in the cardiomyocyte nuclei in rats of both experimental groups should be considered as a result of increase in their area while maintaining the total content in IH15, and as a possible nuclear dysfunction - in IH60.

The results showed that in rats with hypertension, the decrease in the number of cardiomyocyte nuclei with a compensatory increase in their size is influenced by etiopathogenesis. Thus, the number of nuclei in ESAH rats was 13.6 % smaller than in EAH, but their size was 54.7 % larger. The nuclear density in EAH rats was reduced by 18.5 % compared to the control due to a decrease in their total area. In ESAH rats, this indicator was lower than the control by 26.5 %, but there was a slight increase in the total nuclear area. Interestingly, total cytoplasmic area was decreased in both groups, which was probably related to interstitial fibrosis development. The detected changes were accompanied by nuclear dysfunction, which was estimated based on a decrease in RNA concentration in the cardiomyocyte nuclei in EAH rats by 44.4 % and ESAH - by 68.9 %. Likewise, apparent changes also occurred in terms of the cytoplasmic RNA concentration by 19.4 % in ESAH rats compared to EAH, indicating overt dysfunctions in ESAH rats.

A very important achievement of the study on the effects of short-term 15-day hypoxia was a holistic picture of morpho-structural changes in the myocardium. Immunofluorescence method found physiological hypoxic-induced stimulating effects on the cardiovascular system in IH15 rats as an activation of compensatory mechanisms, including the development of moderate hypertrophy of cardiomyocytes, as evidenced by a significantly higher content of cardiotrophin-1 in the longitudinal fibers; moderate increase in myocardial stiffness due to increased content and concentration of titin and type I collagen content in both types of fibers; a decrease in the rate of cardiomyocyte death characterized by a decrease in the annexin V concentration (11.5 %) in the transverse fibers. This pattern of markers indicates the early stage of hypertrophic type of myocardial remodeling in response to short-term hypoxic effects, which is of protective and compensatory nature and manifested by the preservation of titin-collagen ratio with decreased apoptosis rate as compared to the control.

Prolonged 60-day hypoxic exposure caused pathological morpho-structural changes of the left ventricular myocardium in rats with a significant increase in the

expression of all studied myocardial remodeling markers. Such changes in the marker profile indicate an overt cardiomyocyte hypertrophy, which is evidenced by higher than the control content and concentration of cardiotrophin-1 in both types of fibers – by 58.8 % and 65.8 %, and 73.6 % and 56.9 %, respectively; signs of increased myocardial stiffness with severe fibrosis, as shown by significantly higher than the control values of the titin content and concentration in the transverse fibers by 132.8 % and 101.9 %, and in the longitudinal fibers – by 124.9 % and 71.2 %, respectively, combined with the increased expression of type I collagen (content and concentration in the transverse fibers exceeding the control by 61.2 % and 68.8 %, and in the longitudinal – by 41.9 % and 42.1 %, respectively) and increased the titin-collagen ratio; massive cardiomyocyte apoptosis assessed by almost 2 times higher content and concentration of annexin V than the control in both types of fibers. The outlined changes in the marker profile of myocardial remodeling in IH60 rats suggest a fibrous-apoptotic type of pathological myocardial remodeling.

The study on marker immunohistochemical profile first discovered the development of a steady rise in BP in rats with experimental hypertension in both models leading to pathological myocardial remodeling as reflected by an increased expression of all the studied markers. It should be noted that in EAH rats, remodeling is characterized by moderate hypertrophy (the content and concentration of cardiotrophin-1 in transverse fibers is greater than the control by 27.4 % and 32.2 %, and in the longitudinal fibers – by 42.6 % and 35.1 %, respectively); fibrotic changes with increased myocardial stiffness as suggested by an increase in the content and concentration of titin in the transverse fibers by 12.2 % and 23 %, respectively, type I collagen content in both fibers by 49 % and 31 % and 34% higher its concentration in the transverse fibers, accompanied by a decrease in the titin-collagen ratio compared to the control; moderate apoptotic rate in the myocardium (the content and concentration of annexin V exceeding the control indicators in the transverse fibers by 58.4 % and 26.3 %, and in the longitudinal fibers – by 52.2 % and 27.7 %, respectively). The structural changes detected in the

heart muscle match the hypertrophic-fibrous type of remodeling with moderate apoptotic rate.

In experimentally modeled secondary endocrine-associated ArtH in ESAH rats, the content and concentration of all the remodeling markers were significantly higher than those in the control. Such changes characterize the pathological myocardial remodeling (PMR) including: overt cardiomyocyte hypertrophy (expression of cardiotrophin-1 (content and concentration) was increased in the transverse fibers by 80.3 % and 76.6 %, and in longitudinal fibers – by 80.3 % and 61.5 %, respectively); severe fibrosis with a significant increase in myocardial stiffness as demonstrated by a higher expression of titin in the transverse fibers by 115.5 % and 110.2 %, and in the longitudinal – by 107.1 % and 86.2 %, respectively, that was accompanied by a higher content and concentration of type I collagen in the transverse fibers by 67.6 % and 21.2 %, and in the longitudinal – by 41.9 % and 23.1 %, respectively, resulting in a significant increase in the titin-collagen ratio; significant severity of the apoptotic process – the content and concentration of annexin V exceeding the control in the transverse fibers by 64.3 % and 83 %, and in the longitudinal – by 56.9 % and 82.2 %, respectively, matching the hypertrophic-apoptotic type of myocardial remodeling.

In accordance with the aim of the study, the NOS isoform profile immunofluorescence study in IH15 rats showed a significant decrease in nNOS content by 20.6 % in the transverse fibers without changes in other indicators, accompanied by a significant 33 % increase in mRNA as compared to the control. The content and concentration of iNOS in this group were significantly higher in the transverse fibers by 7.2 % and 28.1 %, and in the longitudinal - by 14.7 % and 31.2 %, respectively. Increased expression of iNOS immunoreactivity (IR) was found with underlying high values of the corresponding mRNA, which was almost 2.9 times higher than the control value. The content and concentration of eNOS IR in the IH15 group in the transverse fibers were 6.6 % and 25.4 % higher, respectively, without significant changes in the longitudinal fibers. The eNOS mRNA expression was 40 % higher than the control values.

The isoform profile of NOS changed divergently in IH60 group. Thus, the content and concentration of nNOS in the transverse fibers were significantly higher by 25.4 % and 45.8 %, in the longitudinal fibers – by 45.7 % and 146.2 %, respectively, which in combination with doubled mRNA compared to the control, indicates a strong predominance of this isoform in the myocardium of IH60 rats. The content and concentration of iNOS in the transverse fibers were lower by 26.1 % and 30 %, respectively; in the longitudinal fibers - by 33.3 % and 32.8 %, respectively. It is noteworthy that such low IR values were detected amid a 5.7 times increased iNOS mRNA as compared to the control. The content and concentration of eNOS IR in the IH60 group changed in the transverse and longitudinal fibers, but not in the same way: in the former, the content and concentration were significantly higher than the control by 7.5 % and 17 %, respectively, while in the latter, these values were significantly lower by 11.9 % and 15.4 %. This was accompanied by a significant 312 % increase in mRNA compared to the control.

In rats with experimental hypertension, changes in the isoform profile varied in degree of severity, and the etiology was found to be associated with the nature of individual isoforms expression. Significantly higher values of nNOS content in the transverse and longitudinal fibers by 21.6 % and 5.7 %, respectively, were observed in EAH rats. Moreover, nNOS concentration represented a 23.1 % increase over the control in transverse fibers. Alongside this, nNOS mRNA was 1.6 times higher compared to the control. The content and concentration of iNOS in the transverse fibers were higher than the control values by 19.6 % and 22.6 %, as well as in the longitudinal fibers - by 28.7 % and 33.1 %, respectively. A notable fact was a detection of higher values of iNOS mRNA in 3.5 times compared to the control. The changes detected in the content and concentration of eNOS were not so significant. In the transverse fibers, these values were higher by 6.2 % and 16.5 %, respectively, but in the transverse fibers, only eNOS content was significantly 5.6 % higher than the control, while the value of eNOS mRNA was found to be significantly higher by 125 %.

First studied nature of changes in the isoform profile in ESAH rats showed the increased content and concentration of nNOS in the transverse fibers by 14.3 % and 34.4 %, and in the longitudinal fibers - by 8.3 % and 23.8 %, respectively. The mRNA expression was 2.7 times higher than the control values. Significantly higher values of the content and concentration of iNOS IR were found in both transverse and longitudinal fibers: in the former – by 18.3 % and 21 %, in the latter – by 8.5 % and 12.2 %, respectively. In addition, a significant predominance of iNOS mRNA in 5.7 times was found compared to the control. eNOS changes in the rat myocardial fibers had their own peculiar features. Thus, the content and concentration in the transverse myocardial fibers were significantly higher by 16.2 % and 7.5 %, respectively, while these indicators were found to be reduced by 7.6 % and 14.6 %, respectively. Such changes were accompanied by 2.8 times increased expression of eNOS mRNA.

A major feature was detected by a biochemical method using Griss reagent as significantly higher nitrites concentrations in IH15 and EAH rats, exceeding the control values by 21 % and 18.8 %, respectively. However, significantly lower values of nitrites concentration were found in the IH60 and ESAH groups, by 21.8 % and 11.7 %, respectively. At the same time, the nitrotyrosine concentration measured by enzyme-linked immunosorbent assay in the groups of IH15 rats was 40.8 % higher than that in the control, which perhaps indicates the early stage of nitroso-oxidative stress development, but with preserved compensation of this condition. The plasma concentration of nitrotyrosine was considerably and significantly increased in the IH60 and ESAH groups by 80.6 % and 88.5 %, respectively, which could characterize the intensity level of ONOO- generation and suggest an increase in systemic nitroso-oxidative stress.

For the first time, the pattern of morpho-structural changes in the myocardium has been identified, key links of their pathogenesis have been established, and the role of nitrogen oxide regulatory system has been proved using experimental models of physiological (intermittent hypoxia of different duration) and pathological (ArtH of different genesis) effects on the cardiovascular system.

It has been found that short-term 15-day hypoxia induces physiological myocardial remodeling with the development of moderate cardiomyocyte hypertrophy, a decrease in their death rate and an increase in elastic properties. It has been determined for the first time that structural remodeling of the myocardium develops along with increased mRNA expression of all three NOS isoforms, decreased nNOS IR moderately increased eNOS with iNOS predominance in the myocardium, accompanied by increased in the levels of stable NO metabolites nitrites by 21 % and nitrotyrosine by 40.8 %.

Prolonged hypoxic exposure for 60 days has been shown to drive pathological myocardial remodeling with overt cardiomyocyte hypertrophy; increased myocardial stiffness, significant fibrosis and massive apoptosis of cardiomyocytes. It has been first found that myocardial remodeling occurs due to changes in the ratio of enzyme NOS isoforms, characterized by increased expression of constitutive forms and decreased inducible one with a significant increase in mRNA of all three isoforms; increased systemic nitroso-oxidative stress with a 21.8 % decrease in nitrites levels and a significant increase in the plasma concentration of nitrotyrosine by 80.6 %.

The study has shown that hypertension, both essential in SHR and secondary, endocrine-associated, in rats with the endocrine-salt model, induces pathological myocardial remodeling due to an increase in heart weight, specific density and expression of all four markers. For the first time, differences in morpho-structural myocardial remodeling have been found in EAH rats evidenced by moderate apoptotic rate and cardiomyocyte hypertrophy, fibrotic changes, and increased myocardial stiffness, whereas in ESAH rats – by significantly increased apoptotic rate and overt cardiomyocyte hypertrophy with underlying fibrosis and high myocardial stiffness.

It has been first revealed that hypertension-associated changes in the NOS isoform profile in the heart muscle in EAH consist in higher levels of nNOS and eNOS IR with a predominance of iNOS against the background of increased mRNA of all three isoforms, increased content of final metabolites NO nitrites by 18.8 %

and nitrotyrosine - by 26 %. In the endocrine-salt model of AH, the state of the NO system is characterized by increased mRNA expression to nNOS, eNOS and iNOS by 2.7, 2.8 and 5.7 times, respectively, an increase in their IR in the myocardium with a predominance of nNOS; a decrease in nitrites levels by 11.7 % with an increase in nitrotyrosine by 88.5 %.

In the thesis, it has been experimentally proved that myocardial remodeling develops in both physiological and pathological effects on the cardiovascular system, and the profile of remodeling markers and the nitrogen oxide system state are influenced by the etiology and duration of exposure.

The informative criteria for the nature of myocardial remodeling in the experiment have been developed, and it has been determined that short-term intermittent hypoxia induces physiological hypertrophic type of myocardial remodeling with increased visco-elastic properties of the heart muscle and decreased cardiomyocyte death. However, prolonged hypoxia results in pathological fibrous-apoptotic type of myocardial remodeling with significant fibrosis, severe hypertrophy, increased myocardial stiffness and massive apoptosis of cardiomyocytes. Experimental ArtH, regardless of etiopathogenetic features, drives pathological myocardial remodeling with model-related differences: in the case of essential – it is the hypertrophic-fibrous type of remodeling with moderate apoptotic rate, in endocrine-salt – hypertrophic-apoptotic type.

The pathogenetic role of the nitrogen oxide system in myocardial remodeling in the effects on the cardiovascular system has been substantiated, characterized by an increase in mRNA of all three NOS isoforms with increased plasma concentration of nitrotyrosine in rats. The etiopathogenetic association between changes in the NOS enzyme isoform profile in prolonged hypoxic effects and ArtH has been proved, which leads to a decrease in nitrites levels with an increase in nitrotyrosine.

New theoretical foundations of the thesis are used in the educational process at the Department of General Pathophysiology of I. Horbachevsky, Ternopil National Medical University; Department of Pathophysiology of the Ukrainian

Medical Stomatological Academy, Ministry of Health of Ukraine; Department of Pathological Physiology of Kharkiv National Medical University, Ministry of Health of Ukraine; Department of General and Clinical Pathophysiology of Odessa National Medical University, Ministry of Health of Ukraine; Department of Pathological Physiology of Dnipropetrovsk Medical Academy, Ministry of Health of Ukraine; Department of Pathological Physiology of Zaporizhzhia State Medical University, Ministry of Health of Ukraine and in the Training Medical and Laboratory Center of Zaporizhzhia State Medical University.

Based on the thesis materials, 13 scientific works were published: 6 articles, including 3 articles in journals indexed by International Scientometric databases (Web of Science); 2 articles in foreign journals, 1 article in a Scientific Professional Publication of Ukraine, 7 abstracts in the materials of International and All-Ukrainian congresses and Scientific-Practical Conferences. The thesis materials were reported at 11 conferences and congresses. Three ESC grants were awarded to the thesis materials.

Key words: *myocardial remodeling: physiological, pathological, nitrogen oxide system, markers of myocardial remodeling, experimental arterial hypertension, intermittent hypoxic hypoxia, rats.*

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ НА ТЕМУ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Особливості експресії ізоформ синтази оксиду азоту у міокарді лівого шлуночка щурів при артеріальній гіпертензії різного генезу. Федотова М. І., Ковальов М. М., Жулінський В. О. та ін. / *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*. 2017. Т. 17, № 4 (60), ч. 2. С. 91–95. (Дисертант виконала набір матеріалу, імуногістохімічне дослідження та статистичну обробку результатів).

2. Characteristics of the nitric oxide system indicators in the left ventricle myocardium in SHR. Kolesnyk Yu. M., Isachenko M. I., Melnikova O. V. et al. / *Патологія*. 2018. Т. 15, № 3(44). С. 278–283. DOI: 10.14739/2310-1237.2018.3.151670 (Дисертант виконала набір матеріалу, імуногістохімічне дослідження та статистичну обробку результатів).

3. Kolesnyk Yu. M., Isachenko M. I., Melnikova O. V. The features of the nitric oxide system in the left ventricle myocardium in the rats with experimental intermittent hypoxia of different duration. *Pathologia*. 2019. Vol. 16, No 3(47). P. 308–314. DOI:10.14739/2310-1237.2019.3.188783 (Дисертант виконала набір матеріалу, імуногістохімічне дослідження та статистичну обробку результатів).

4. Isachenko M. I., Melnikova O. V. Pathogenetic features of the nitric oxide system state in the left ventricular myocardium of the rats with experimental arterial hypertension. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020. Vol. 10, No 8. P. 476–489. eISSN 2391-8306. DOI: 10.12775/JEHS.2020.10.08.058 (Дисертант виконала набір матеріалу, імуногістохімічне дослідження та статистичну обробку результатів).

5. Колесник Ю. М., Ісаченко М. І. Маркерний профіль ремоделювання міокарда при різних етіопатогенетичних формах артеріальної гіпертензії в експерименті. *Патологія*. 2020. Т. 17, № 2(49). С. 136–141. DOI: 10.14739/2310-1237.2020.2.212721 (Дисертант виконала набір матеріалу,

імуногістохімічне та морфо-денситометричне дослідження та статистичну обробку результатів).

6. Kolesnyk Yu. M., Isachenko M. I. Pathogenetic features of morphodensitometric characteristics of cardiomyocytes and marker profile of the left ventricular remodeling in rats with experimental intermittent hypoxia of different duration. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020. Vol. 10, No 9. P. 752–762. eISSN 2391-8306. DOI: 10.12775/JEHS.2020.10.09.091 (Дисертант виконала набір матеріалу, імуногістохімічне та морфо-денситометричне дослідження та статистичну обробку результатів).

7. Fedotova M. I., Melnikova O. V., Ganchev C. S. Independent predictors of the blood pressure elevation among indexes of heart rate variability in rats with hypertension and disturbance of carbohydrate metabolism. *Integrative Biology & Medicine*. 2017. P. 25. (Дисертант виконала набір матеріалу та статистичну обробку результатів).

8. Колесник Ю. М., Федотова М. І. Баланс ізоформ синтази оксиду азоту у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією. *Актуальні питання сучасної медицини і фармації* : тези всеукр. наук.-практ. конф. до 50-річчя заснування ЗДМУ (м. Запоріжжя, 30 трав. 2018 р.). м. Запоріжжя, 2018. С. 15. (Дисертант виконала набір матеріалу, імуногістохімічне дослідження та статистичну обробку результатів).

9. Fedotova M., Kolesnyk Y. P89Comparative analysis of the status of the nitric oxide system in the left ventricle of heart in rats with experimental hypertension of different origin. *Frontiers in CardioVascular Biology 2018*. (Vienna, 20-22 Apr. 2018). *Cardiovascular Research*. 2018. 114 (suppl_1). S23–S24. (Дисертант виконала набір матеріалу, імуногістохімічне дослідження та статистичну обробку результатів).

10. Дорохов О. М., Ісаченко М. І. Роль синтази оксиду азоту у фізіологічному ремоделюванні міокарда. *Студенти-науковці ЗДМУ в сучасній медицині і фармації – 2019* : тези доповідей наук.-практ. конф. студентів в рамках I туру «Всеукраїнського конкурсу студентських наукових робіт з

галузей звань і спеціальностей у 2018 – 2019 н.р.». (м. Запоріжжя, 6 – 7 лют. 2019). м. Запоріжжя, 2019. С. 3–4. *(Дисертант виконала набір матеріалу, імуногістохімічне дослідження та статистичну обробку результатів)*.

11. Ісаченко М. І., Дорохов О. М. Роль синтази оксиду азоту у фізіологічному ремоделюванні міокарда. *Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації* : матеріали І наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених з міжнарод. участю. (м. Харків 15 трав. 2019 р.). м. Харків, 2019. С. 88–89. *(Дисертант виконала набір матеріалу, імуногістохімічне дослідження та статистичну обробку результатів)*.

12. Колесник Ю. М., Ісаченко М. І., Мельнікова О. В. Переривчаста гіпоксія – як фактор змін ізоформного профілю NOS в міокарді щурів. XX з'їзд Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г.Костюка. (м. Київ, 27-30 трав. 2019 р.). *Фізіологічний журнал*. 2019. Т. 65, № 3 (Додаток). С. 80–81. *(Дисертант виконала набір матеріалу, імуногістохімічне дослідження та статистичну обробку результатів)*.

13. Колесник Ю. М., Данукало М. В., Ісаченко М. І. Системні зміни ізоформного профілю синтази оксиду азоту при артеріальній гіпертензії в експерименті. *Проблеми ендокринної патології*. Щоквартальний науково-практичний журнал спеціальний випуск : тези доповідей ІХ з'їзду ендокринологів України, що присвячений 100-річному ювілею ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України» (м. Харків, 19-22 лист. 2019 р.). м. Харків, 2019. С. 40. *(Дисертант виконала набір матеріалу, імуногістохімічне дослідження та статистичну обробку результатів)*.

ЗМІСТ

| | | |
|--|---|----|
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ ТА СКОРОЧЕНЬ | 34 | |
| ВСТУП | 37 | |
| РОЗДІЛ 1 | ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ | 47 |
| 1.1 | Міокард щурів як орган-мішень при дії фізіологічних та патологічних чинників | 47 |
| 1.2 | Компоненти ремоделювання міокарда при серцево-судинних захворюваннях | 50 |
| 1.2.1 | Гіпертрофія як ключова складова ремоделювання міокарда | 50 |
| 1.2.2 | Кардітрофін-1 (КТ-1) – важливий компонент ремоделювання міокарда | 51 |
| 1.2.3 | Фіброз міокарда, сучасні уявлення його формування | 52 |
| 1.2.4 | Колаген I типу в міокарді | 54 |
| 1.2.5 | Тайтин – модулятор жорсткості міокарда | 56 |
| 1.2.6 | Анексин V – діагностичний маркер апоптозу кардіоміоцитів | 57 |
| 1.3 | Експериментальні моделі та дослідження фізіологічних та патологічних механізми дії переривчастої гіпоксії | 61 |
| 1.4 | Експериментальні моделі та дослідження патогенетичних механізмів розвитку артеріальної гіпертензії | 64 |
| 1.4.1 | Патогенез гіпертензивного пошкодження міокарда в щурів SHR та адаптація до нього | 64 |
| 1.4.2 | Патогенез гіпертензивного пошкодження міокарда в щурів з ендокрино-сольовою артеріальною гіпертензією та адаптація до нього | 65 |
| 1.5 | Роль системи оксиду азоту в експериментальному | 67 |

| | | |
|----------|---|----|
| | ремоделюванні міокарда | |
| 1.5.1 | Нейрональна синтаза оксиду азоту (nNOS) | 69 |
| 1.5.2 | Індуцибельна синтаза оксиду азоту (iNOS) | 72 |
| 1.5.3 | Ендотеліальна синтаза оксиду азоту (eNOS) | 73 |
| РОЗДІЛ 2 | МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ | 76 |
| 2.1 | Матеріал дослідження | 76 |
| 2.1.1 | Дизайн дослідження | 77 |
| 2.1.2 | Експериментальні моделі | 79 |
| 2.1.2.1 | Методика переривчатих гіпоксичних тренувань різної тривалості | 79 |
| 2.1.2.2 | Генетично детермінована модель первинної артеріальної гіпертензії | 80 |
| 2.1.2.3 | Ендокринно-сольова модель вторинної артеріальної гіпертензії | 80 |
| 2.2 | Методи дослідження | 81 |
| 2.2.1 | Методика вимірювання артеріального тиску | 82 |
| 2.2.2 | Масометричний метод дослідження сердець щурів експериментальних груп | 83 |
| 2.2.3 | Методика морфо-денситометричного дослідження міокарда в щурів експериментальних груп | 84 |
| 2.2.4 | Методика імунофлюоресцентного дослідження міокарда лівого шлуночка експериментальних щурів | 88 |
| 2.2.5 | Метод молекулярно-генетичного дослідження експресії мРНК до ізоформ синтази оксиду азоту в гомогенаті міокарда лівого шлуночка | 91 |
| 2.2.6 | Методика біохімічного дослідження концентрації нітритів з реактивом Грісса в гомогенатах міокарда лівого шлуночка експериментальних щурів | 96 |
| 2.2.7 | Методика імуноферментного дослідження рівня нітротирозину в плазмі експериментальних щурів | 97 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 2.2.8 | Методи статистичного аналізу | 98 |
| РОЗДІЛ 3 | МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ДОСЛІДЖУВАНИХ ПАРАМЕТРІВ СЕРЦЕВО- СУДИННОЇ СИСТЕМИ В ЩУРІВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ГРУП | 99 |
| 3.1. | Показники артеріального тиску щурів експериментальних груп | 100 |
| 3.2 | Масометричні показники сердець щурів експериментальних груп | 102 |
| 3.3 | Морфо-денситометричні показники міокарда лівого шлуночка щурів експериментальних груп | 105 |
| 3.3.1 | Морфо-денситометрична характеристика міокарда лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією | 108 |
| 3.3.2 | Морфо-денситометрична характеристика міокарда лівого шлуночка щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією | 109 |
| РОЗДІЛ 4 | ПАТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ МАРКЕРНОГО ПРОФІЛЮ РЕМОДЕЛЮВАННЯМ МІОКАРДА ЛІВОГО ШЛУНОЧКА ЩУРІВ В ЕКСПЕРИМЕНТІ | 114 |
| 4.1. | Патерн експресії маркерів ре моделювання в міокарді лівого шлуночка щурів експериментальних груп. | 115 |
| 4.1.1 | Особливості експресії кардіотрофіну-1 у міокарді лівого шлуночка щурів експериментальних груп | 117 |
| 4.1.1.1 | Характер експресії кардіотрофіну-1 у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією | 117 |
| 4.1.1.2 | Характер експресії кардіотрофіну-1 у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією | 119 |
| 4.1.2 | Характер експресії тайтину в міокарді лівого шлуночка щурів експериментальних груп | 122 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 4.1.2.1 | Характер експресії тайтину в міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією | 123 |
| 4.1.2.2 | Характер експресії тайтину в міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією | 125 |
| 4.1.3 | Особливості експресії колагену I типу в міокарді лівого шлуночка щурів експериментальних груп | 127 |
| 4.1.3.1 | Характер експресії колагену I типу в міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією | 128 |
| 4.1.3.2 | Характер експресії колагену I типу в міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією | 130 |
| 4.1.4 | Характер експресії анексину V у міокарді лівого шлуночка щурів експериментальних груп | 132 |
| 4.1.4.1 | Особливості експресії анексину V у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією | 132 |
| 4.1.4.2 | Характер експресії анексину V у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією | 135 |
| 4.2 | Коефіцієнт тайтин-колагенового співвідношення | 137 |
| РОЗДІЛ 5 | ОСОБЛИВОСТІ СТАНУ СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ В МІОКАРДІ ЛІВОГО ШЛУНОЧКА ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ РЕМОДЕЛЮВАННЯМ | 142 |
| 5.1 | Характер ізоформного профілю NOS у міокарді лівого шлуночка щурів експериментальних груп | 143 |
| 5.1.1 | Патогенетичні особливості експресії нейрональної синтази оксиду азоту (nNOS) у міокарді лівого шлуночка щурів експериментальних груп | 144 |
| 5.1.1.1 | Особливості експресії nNOS у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією | 145 |

| | | |
|----------------------------|---|-----|
| 5.1.1.2 | Особливості експресії nNOS у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією | 147 |
| 5.1.2 | Особливості експресії індукцибельної синтази оксиду азоту (iNOS) у міокарді лівого шлуночка щурів експериментальних груп | 149 |
| 5.1.2.1 | Особливості експресії iNOS у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією | 150 |
| 5.1.2.2 | Особливості експресії iNOS у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією | 152 |
| 5.1.3 | Особливості експресії ендотеліальної синтази оксиду азоту (eNOS) у міокарді лівого шлуночка щурів експериментальних груп | 154 |
| 5.1.3.1 | Особливості експресії eNOS у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією | 155 |
| 5.1.3.2 | Особливості експресії eNOS у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією | 157 |
| 5.2 | Експресія мРНК до ізоформ синтази оксиду азоту в міокарді лівого шлуночка щурів контрольних груп | 159 |
| 5.3 | Концентрація стабільних метаболітів оксиду азоту в гомогенатах фрагментів міокарда лівого шлуночка щурів експериментальних груп | 160 |
| 5.4 | Концентрація нітротирозину в плазмі щурів експериментальних груп | 161 |
| РОЗДІЛ 6 | АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ | 166 |
| ВИСНОВКИ | | 188 |
| СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ | | 192 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| ДОДАТОК А | АКТИ ВПРОВАДЖЕННЯ | 223 |
| ДОДАТОК Б | СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ НА ТЕМУ ДИСЕРТАЦІЇ | 230 |
| ДОДАТОК В | ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ | 233 |

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ ТА СКОРОЧЕНЬ

АГ – артеріальна гіпертензія

АН V – анексин V

АТ – артеріальний тиск

АФК – активні форми кисню

ЕАГ – лінія щурів SHR зі спонтанною артеріальною гіпертензією

ЕСАГ – група щурів лінії Wistar з ендокринно-сольовою моделлю гіпертензії

ЕЦМ – екстрацелюлярний матрикс

ІРМ – імунореактивний матеріал

КЛ – колаген I типу

Контроль – інтактні щури лінії Wistar

КТ-1 – кардіотрофін-1

ЛШ – лівий шлуночок

мкм – мікрометри

Оог – одиниці оптичної густини

ОЦК – об'єм циркулюючої крові

ПГ15 – група щурів лінії Wistar з моделюванням переривчастої гіпоксичної гіпоксії протягом 15 діб

ПГ60 – група щурів лінії Wistar з моделюванням переривчастої гіпоксичної гіпоксії протягом 60 діб

ПРМ – патологічне ремоделювання міокарда

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ССЗ – серцево-судинні захворювання

ТТ – тайтин

ФК – фібрилярний колаген

ФРМ – фізіологічне ремоделювання міокарда

ЧМС – відсоток частки маси серця від ваги щурів

ArtH – артеріальна гіпертензія

BP – артеріальний тиск
EАН – SHR зі спонтанною артеріальною гіпертензією
EMT – епітеліально-мезенхімальний перехід
EndMT – ендотеліально-мезенхімальний перехід
eNOS – ендотеліальна синтаза оксиду азоту
ESАН – група щурів лінії Wistar з ендокринно-сольовою моделлю гіпертензії
GPCR – G-протеїн пов'язані рецептори
GRs – глюкокортикоїдні рецептори
H₂O₂ – пероксид водню
HIF-1 α – індукцйбельний гіпоксією фактор - 1 α
HIF-1 β – індукцйбельний гіпоксією фактор - 1 β
IH15 – група щурів лінії Wistar з моделюванням переривчастої гіпоксичної гіпоксії протягом 15 діб
IH60 – група щурів лінії Wistar з моделюванням переривчастої гіпоксичної гіпоксії протягом 60 діб
iNOS – індукцйбельна синтаза оксиду азоту
IR – імунореактивний матеріал
MAP – мітоген-активована протеїнкіназа
mRNA – матрична рибонуклеїнова кислота
MRs – мінералокортикоїдні рецептори
NADPH – нікотинамід аденін динуклеотид фосфат
nNOS – нейрональна синтаза оксиду азоту
NO – оксид азоту
NO₂ – двоокису азоту
NO²⁻ – нітрит
NO³⁻ – нітрат
NOS – синтаза оксиду азоту
PS – фосфотидилсерін
TGF β 1 – трансформуючий фактор росту
U_{OD} – одиниці оптичної густини

XOR - ксантиноксидоредуктаза

α -, β -МНС – міозиновий важкий ланцюг

μ m – мікрометри

ONOO- – пероксинітрит

OH- – гідроксил радикал

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Термін «ремоделювання серця» вперше був запропонований N.Sharpe у кінці 70-х років минулого століття, коли він описав структурні зміни в серці після гострого інфаркту міокарда [1]. M. Pfeffer визначив термін «ремоделювання» як структурно-геометричні зміни лівого шлуночка, що включають процеси гіпертрофії міокарда та дилатації камер [2]. Це призводить до зміни геометрії серця та порушенню систолічної і діастолічної функції [3].

На сьогоднішній день виділяють два основні напрями ремоделювання міокарда – фізіологічне (ФРМ), яке розвивається при помірних фізичних та гіпоксичних навантаженнях як структурний слід адаптації до змін умов функціонування міокарда [4], та патологічне (ПРМ), що розвивається через перевантаження тиском або об'ємом, ішемією, метаболічними та електролітними порушеннями [5].

Наступною відмінністю між ФРМ і ПРМ є особливості морфо-структурних змін міокарда, а саме, розвиток гіпертрофії. Хоча гіпертрофія супроводжує обидва види ремоделювання, її морфологічна вираженість та етіопатогенетична залежність відрізняються. У випадку ПРМ поєднується з дисбалансом скоротливих білків, змінами організації інтерстицію, внаслідок чого розвивається фіброз, диспропорційним збільшенням серцевої маси та неефективним ангіогенезом. Натомість морфо-структурна організація при ФРМ збережена, збільшення маси міокарда та васкуляризації збалансоване [6]. Не менш важливим компонентом ПРМ є масивний апоптоз кардіоміоцитів, що є рідкістю для ФРМ [7]. Усі ці відмінності є передумовами клінічно несприятливого прогнозу в пацієнтів з ПРМ, тоді як ФРМ має зворотній характер, підвищує стійкість кардіоміоцитів до дії патологічних впливів [8].

У попередніх роботах кафедри патологічної фізіології ЗДМУ з вивчення особливостей ремоделювання міокарда в щурів із цукровим діабетом

поєднаним із спадковою артеріальною гіпертензією (АГ) була запропонована панель імуногістохімічних та морфо-денситометричних маркерів паренхіматозно-стромальної перебудови міокарда та визначені діагностичні критерії особливостей структурної організації серцевого м'язу з урахуванням переважання одного або двох патологічних процесів (апоптозу, гіпертрофії кардіоміоцитів чи міокардіального фіброзу) [9]. Проте питання їхньої інформаційної цінності при фізіологічному ремоделюванні залишається відкритим. Цікавим, на нашу думку, буде проведення порівняльного аналізу співвідношення запропонованих маркерів ремоделювання (кардіотрофін-1, тайтин, колаген I типу та анексин V) при різних за тривалістю фізіологічних впливів на міокард (гіпоксія) та різних за патогенезом патологічних впливів (спадкова та ендокринно-сольова АГ).

Існує припущення, що на початку впливу стимулюючого фактору на серцево-судинну систему (ССС) гіпертрофія міокарда виступає в ролі компенсаторної реакції на збільшення напруження стінки лівого шлуночка, паралельно розвиваються процеси внутрішньоклітинної регенерації органел кардіоміоцитів, аутокринну регуляцію якої може виконувати оксид азоту (NO) [10]. У ССС NO та фермент, що бере участь в його синтезі, функціонують як нейромедіатори, вазодилататори, антиагреганти, є факторами гемостазу й нітрозативного гомеостазу, регулюють місцеву імунну відповідь та є універсальними регуляторами центральної нервової системи (ЦНС) та периферичних нервів і гангліїв [11]. Кардіопротективна роль NO полягає в моделюванні скорочення кардіоміоцитів, стимулюванні кардіальної релаксації, регулюванні внутрішньоклітинного рівня кальцію [12]. Ізоформи синтази оксиду азоту (NOS) регулюють серцеве скорочення як у базальному стані, так і в умовах класичного ізотропного впливу: розтягнення серцевого м'язу, збільшення частоти скорочень та β -адренергічна стимуляція [13].

Але з часом, компенсаторні резерви виснажуються, міогенний тонус знижується, що призводить до прогресування серцевої недостатності. Зрештою, змінюється баланс ізоформ NOS, знижується експресія

конститутивних форм ендотеліальної та нейрональної (eNOS, nNOS), відповідно, погіршується васкуляризація, іннервація, релаксація та скоротливість міокарда. Прогресування серцевої недостатності супроводжується підвищеною експресією та активністю індукцибельної ізоформи ферменту (iNOS), через що відбувається синтез високих рівнів NO, а це, в свою чергу, стимулює Т-клітинний ланцюг імунітету й надає цитотоксичний й кардіодепресивний ефект [14].

Ймовірно, саме баланс ізоформ NOS може бути одним з ключових факторів, що характеризують і запускають ремоделювання міокарда. При переважанні ефектів конститутивних ізоформ будуть спостерігатися фізіологічні перебудови міокарда, в той час як надлишкова продукція NO індукцибельною формою NOS може перемикає його впливи в патологічний напрям: загибель кардіоміоцитів, порушення васкуляризації, активація запальних процесів, зниження скорочувальної здатності міокарда [15].

Для розуміння патогенетичного зв'язку особливостей змін структурної організації міокарда з етіологічними факторами та механізмами, які включаються ними, вважаємо необхідним проведення дослідження співвідношення маркерного профілю ремоделювання і виявлення особливостей стану системи NO міокарда як можливого диригента-регулятора ремоделювання міокарда, що чинить протективну або пошкоджуючу дію.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота була частиною науково-дослідної роботи кафедри патологічної фізіології, яка фінансувалась МОЗ України, на тему «Роль пептидергічних структур гіпоталамусу та стовбуру мозку в патогенезі артеріальної гіпертензії» (№ державної реєстрації 0117U002579), термін виконання 2017-2019 рр.

Мета і завдання дослідження. Мета – з'ясувати характер співвідношення маркерів ремоделювання міокарда лівого шлуночка серця й особливості стану системи оксиду азоту при фізіологічних впливах (переривчаста 15-денна та 60-денна гіпоксія) та патологічних станах (спадкова артеріальна гіпертензія – SHR та ендокринно-сольова модель).

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні завдання:

1. Вивчити масометричні (маса серця, його питома щільність та відсоток частки серця від загальної маси тварини) і морфо-денситометричні характеристики кардіоміоцитів (середня кількість ядер кардіоміоцитів в площі кадру, їхній середній лінійний розмір (мкм), щільність ядер до цитоплазми (мкм²), концентрація нуклеїнових кислот в ядрі та цитоплазмі, (OoG)), стан системи NO (визначення експресії мРНК у гомогенатах лівого шлуночка; вмісту та концентрації nNOS, iNOS, eNOS; рівня нітротирозину в плазмі та нітритів у гомогенатах серця) та маркерний профіль ремоделювання (вміст і концентрація кардіотрофіну-1, колагену I типу, тайтину й анексину V) у поздовжніх і поперечних волокнах міокарда лівого шлуночка в інтактних щурів лінії Wistar.

2. Дослідити масометричні (маса серця, його питома щільність і відсоток частки серця від загальної маси тварини) і морфо-денситометричні характеристики кардіоміоцитів (середня кількість ядер кардіоміоцитів в площі кадру, їхній середній лінійний розмір (мкм), щільність ядер до цитоплазми (мкм²), концентрація нуклеїнових кислот в ядрі та цитоплазмі, (OoG)), стан системи NO (визначення експресії мРНК у гомогенатах лівого шлуночка; вмісту та концентрації nNOS, iNOS, eNOS; рівня нітротирозину в плазмі та нітритів у гомогенатах серця) та маркерний профіль ремоделювання (вміст і концентрація кардіотрофіну-1, колагену I типу, тайтину й анексину V) у поздовжніх і поперечних волокнах міокарда лівого шлуночка в щурів лінії Wistar, що піддалися 15-денній переривчастій гіпоксії.

3. Встановити масометричні (маса серця, його питома щільність та відсоток частки серця від загальної маси тварини) і морфо-денситометричні характеристики кардіоміоцитів (середня кількість ядер кардіоміоцитів в площі кадру, їхній середній лінійний розмір (мкм), щільність ядер до цитоплазми (мкм²), концентрація нуклеїнових кислот в ядрі та цитоплазмі, (OoG)), стан системи NO (визначення експресії мРНК у гомогенатах лівого шлуночка; вмісту і концентрації nNOS, iNOS, eNOS; рівня нітротирозину в плазмі та

нітритів у гомогенатах серця) та маркерний профіль ремоделювання (вміст і концентрація кардіотрофіну-1, колагену I типу, тайтину й анексину V) у поздовжніх та поперечних волокнах міокарда лівого шлуночка в щурів лінії Wistar, що піддалися 60-денній довготривалій переривчастій гіпоксії.

4. Оцінити масометричні (маса серця, його питома щільність та відсоток частки серця від загальної маси тварини) і морфо-денситометричні характеристики кардіоміоцитів (середня кількість ядер кардіоміоцитів в площі кадру, їхній середній лінійний розмір (мкм), щільність ядер до цитоплазми (мкм^2), концентрація нуклеїнових кислот в ядрі та цитоплазмі, (OoG)), стан системи NO (визначення експресії мРНК у гомогенатах лівого шлуночка; вмісту та концентрації nNOS, iNOS, eNOS; рівня нітротирозину в плазмі та нітритів у гомогенатах серця) та маркерний профіль ремоделювання (вміст і концентрація кардіотрофіну-1, колагену I типу, тайтину й анексину V) у поздовжніх та поперечних волокнах міокарда лівого шлуночка в щурів з есенціальною АГ (лінії SHR).

5. З'ясувати масометричні (маса серця, його питома щільність та відсоток частки серця від загальної маси тварини) і морфо-денситометричні характеристики кардіоміоцитів (середня кількість ядер кардіоміоцитів в площі кадру, їхній середній лінійний розмір (мкм), щільність ядер до цитоплазми (мкм^2), концентрація нуклеїнових кислот в ядрі та цитоплазмі, (OoG)), стан системи NO (визначення експресії мРНК у гомогенатах лівого шлуночка; вмісту та концентрації nNOS, iNOS, eNOS; рівня нітротирозину в плазмі та нітритів у гомогенатах серця) та маркерний профіль ремоделювання (вміст і концентрація кардіотрофіну-1, колагену I типу, тайтину й анексину V) у поздовжніх та поперечних волокнах міокарда лівого шлуночка в щурів лінії Wistar з ендокринно-сольовою моделлю АГ.

6. Встановити патогенетичні особливості перебудов «геометрії» серця в залежності від стану системи NO, етіопагенетичного чинника та тривалості його впливу на ССС.

Об'єкт дослідження: ремоделювання міокарда лівого шлуночка серця щурів при фізіологічних та патологічних впливах на ССС.

Предмет дослідження: морфо-денситометричні характеристики кардіоміоцитів (середня кількість ядер кардіоміоцитів у площі кадру, їхній середній лінійний розмір (мкм), щільність ядер до цитоплазми (мкм²), концентрація нуклеїнових кислот в ядрі та цитоплазмі, (Oog)); показники системи NO в поздовжніх та поперечних волокнах міокарда лівого шлуночка (концентрація та вміст нейрональної, ендотеліальної та індукцибельної ізоформ синтази оксиду азоту, вміст нітротирозину в плазмі крові, концентрація нітритів у гомогенатах міокарда лівого шлуночка); маркерів ремоделювання міокарда (вміст і концентрація кардіотрофіну-1, тайтину, колагену I типу, анексину V).

Методи дослідження: у роботі були використані сучасні патофізіологічний, інструментальний, біохімічний, імуноферментний, морфо-денситометричний, імунофлюоресцентний та молекулярно-генетичний методи дослідження міокарда лівого шлуночка щурів з експериментальною переривчастою гіпоксією та АГ різного патогенезу; результати дослідження статистично проаналізовано.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше на експериментальних моделях фізіологічних (переривчаста гіпоксія різної тривалості) та патологічних (АГ різного генезу) впливів на ССС визначено характер морфо-структурних змін у міокарді, встановлено ключові ланки їхнього патогенезу та доведена роль регуляторної системи NO.

Встановлено, що короткотривала 15-денна гіпоксія формує фізіологічне ремоделювання міокарда з розвитком помірної гіпертрофії кардіоміоцитів, зниженням інтенсивності їхньої загибелі та підвищенням пружно-еластичних властивостей. Вперше визначено, що структурні перебудови в серцевому м'язі розвиваються на тлі збільшення показників експресії мРНК до усіх 3-х ізоформ NOS, зниженням ІРМ до nNOS, помірного збільшення eNOS із переважанням у міокарді iNOS, що супроводжується підвищенням рівнів

стабільних метаболітів NO нітритів на 21 % і нітротирозину на 40,8 %.

Доведено, що довготривала гіпоксична експозиція протягом 60 діб призводить до патологічного ремоделювання міокарда з суттєвою гіпертрофією кардіоміоцитів; збільшенням жорсткості міокарда, значним фіброзом та масивним апоптозом кардіоміоцитів. Вперше встановлено, що ремоделювання серцевого м'язу відбувається через зміни співвідношення ізоформ ферменту NOS, характеризується збільшеною експресією конститутивних ізоформ і зниженою індукцибельної на фоні значного підвищення мРНК усіх 3-х форм; посиленням системного нітрозоксидативного стресу зі зниженням рівня нітритів на 21,8 % та значним збільшенням концентрації нітротирозину в плазмі крові на 80,6 %.

Дослідження показало, що АГ, як есенціальна в щурів лінії SHR, так і вторинна, ендокринно-асоційована, в щурів із ендокринно-сольовою моделлю, формує патологічне ремоделювання міокарда через збільшення маси серця, його питомої щільності та показників експресії усіх 4-х маркерів. Вперше встановлені відмінності морфо-структурних перебудов серцевого м'язу, що характеризуються в щурів із ЕАГ помірною апоптотичною активністю з гіпертрофією кардіоміоцитів, фібротичними змінами та підвищеною жорсткістю міокарда. Тимчасом як при ЕСАГ значно виражені апоптоз і гіпертрофія кардіоміоцитів на тлі сформованого фіброзу з високою жорсткістю міокарда.

У проведеному дослідженні вперше встановлено, що при АГ зміни ізоформного профілю ферменту NOS у серцевому м'язі в моделі есенціальної АГ демонструють більш високі показники концентрації ІРМ до nNOS та eNOS із переважанням до iNOS на тлі підвищення мРНК усіх 3-х ізоформ, збільшений вміст кінцевих метаболітів NO нітритів на 18,8 % і нітротирозину на 26 %. При ендокринно-сольовій моделі АГ стан системи NO характеризується підвищеною експресією мРНК до nNOS, eNOS і iNOS у 2,7, 2,8 і 5,7 разів, відповідно, збільшенням ІРМ до них у міокарді із

превалюванням nNOS; зменшенням рівнів нітритів на 11,7 % із збільшенням нітротирозину на 88,5 %.

Практичне значення отриманих результатів. У дисертаційній роботі експериментально доведено, що ремоделювання міокарда розвивається як при фізіологічних, так і патологічних впливах на ССС, а характер співвідношення маркерів ремоделювання та стан системи NO залежать від етіології та тривалості впливу.

Розроблено інформативні критерії характеру ремоделювання міокарда в експерименті та визначено, що короткотривала переривчаста гіпоксія формує фізіологічне ремоделювання міокарда за гіпертрофічним типом із підвищенням пружно-еластичних властивостей серцевого м'язу та зниженням інтенсивності загибелі кардіоміоцитів. Проте довготривала гіпоксія призводить до патологічного ремоделювання міокарда за фіброзно-апоптотичним типом з вираженою гіпертрофією, фіброзом, збільшенням жорсткості міокарда та масивним апоптозом кардіоміоцитів. ЕАГ, незалежно від етіопатогенетичних особливостей, формує патологічне ремоделювання міокарда, характер якого має модельні відмінності: у випадку з есенціальною – це гіпертрофічно-фіброзний тип ремоделювання з помірно вираженими процесами апоптозу, при ендокрино-сольовій – гіпертрофічно-апоптотичний тип.

Обґрунтована патогенетична роль системи NO в ремоделюванні міокарда при впливах на серцево-судинну систему, що характеризується підвищенням мРНК усіх 3-х ізоформ NOS на тлі збільшення концентрації нітротирозину в плазмі щурів. Доведена етіопатогенетична залежність змін ізоформного профілю ферменту NOS при тривалих гіпоксичних впливах і АГ, що призведе до зменшення рівня нітритів на тлі збільшення нітротирозину.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно проведений інформаційний пошук, проаналізована сучасна наукова література з теми роботи, сформульовані мета та завдання дослідження та розроблено дизайн його виконання. Автор самостійно проводила морфологічні дослідження

міокарда експериментальних тварин. Здобувач особисто систематизувала отримані результати, написала всі розділи дисертаційної роботи, підготувала до друку наукові праці, впровадила наукові розробки в роботу начальних закладів України. Автор не запозичувала ідеї та розробки співавторів публікацій.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на міжнародних та всеукраїнських наукових форумах: Конгресах Європейського Товариства Кардіологів (Frontiers in CardioVascular Biology 2018, м. Відень та м. Будапешт, 2020р.); Integrative Biology & Medicine, 2017; Всеукраїнській науково-практичній конференції до 50-річчя заснування ЗДМУ, 2018р.; науково-практичній конференції студентів в рамках I туру «Всеукраїнського конкурсу студентських наукових робіт з галузей звань і спеціальностей у 2018 – 2019 н.р.», «Студенти-науковці ЗДМУ в сучасній медицині і фармації – 2019»; «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації»: матеріали I науково-практичної конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю, 2019; XX з'їзді Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г.Костюка (м. Київ, 27-30 трав. 2019 р.); IX з'їзді ендокринологів України, присвячений 100-річному ювілею ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України» (м. Харків, 19-22 листопада 2019 р.).

Нові теоретичні положення дисертації використовуються в навчальному процесі на кафедрі загальної патофізіології ДВНЗ «Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України», кафедрі патофізіології Української медичної стоматологічної академії МОЗ України, кафедрі патологічної фізіології імені Д.О. Альперна Харківського національного медичного університету МОЗ України, кафедрі загальної та клінічної патофізіології ім. В.В. Підвисоцького Одеського національного медичного університету МОЗ України, кафедрі патологічної фізіології

Дніпропетровської медичної академії МОЗ України, кафедрі патологічної фізіології Запорізького державного медичного університету МОЗ України та в роботі навчального медико-лабораторного центру Запорізького державного медичного університету МОЗ України.

Апробація дисертаційної роботи відбулася на спільному засіданні кафедр Запорізького державного медичного університету 06 листопада 2020 року.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 13 наукових праць: 6 статей, серед яких 3 статті в журналах, які індексуються міжнародними наукометричними базами (Web of Science); 2 статті в закордонних журналах, 1 стаття в науковому фаховому виданні України, 7 тез у матеріалах міжнародних і Всеукраїнських з'їздів і науково-практичних конференцій. Матеріали дисертації були оприлюднені на 11 конференціях і конгресах у формі виступів. За матеріалами дисертації було отримано 3 гранти.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 233 сторінках друкованого тексту, складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаної літератури, який містить 249 джерела (з них 23 – кирилицею, 226 – латиною) та додатків. Дисертація ілюстрована 23 таблицями та 41 рисунками.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО РОЛЬ СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ В РОЗВИТКУ РЕМОДЕЛЮВАННЯ МІОКАРДА ПРИ ГІПОКСІЇ ТА АРТЕРІАЛЬНІЙ ГІПЕРТЕНЗІЇ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Міокард щурів як орган-мішень при дії фізіологічних та патологічних чинників

Фенотипічна адаптація органів і систем лежить в основі пристосувальних механізмів до мінливих умов навколишнього середовища та дії різноманітних стресів. Організми формують функціональні системи для адаптації, які без залучення структурних змін на клітинному рівні, є недостатнім для реалізації адаптації у фізіологічній потужності. Таке залучення реалізується завдяки генетичному апарату, наявному в кожній клітині. Вплив стресу модулює відповідь у вигляді біосинтезу білків і нуклеїнових кислот, що, в свою чергу, формує «структурний слід адаптації» [16]. Цей термін включає морфо-функціональні, біосинтетичні, сигнальні, іонні, енергетичні та електричні зміни у фізіології клітини. Такі зміни спрямовані на зміщення механізмів «лімітування» функціонування клітини, її адаптацію до нового середовища. Стрес-реакція виступає основним етіологічним фактором, що викликає таку реалізацію генетичної програми клітин, але, з іншого боку, вона є деактиватором старих програм, що втратили своє біологічне значення, і, таким чином, являючи собою головний направляючий компонент у механізмах адаптації-деадаптації (головний компонент спрямування механізмів). Зробивши свій вагомий внесок, стрес-реакція згодом нівелює свій вплив на систему. Але у випадку надмірності впливу цієї реакції або виснаження механізмів адаптації, розвивається дезадаптація, що призводить до патологічних процесів і станів [17].

Усі серцево-судинні захворювання (ССЗ) призводять до структурно-функціональних змін серця як компенсаторного компоненту. Такі морфо-функціональні зміни в серці носять назву ФРМ [18]. Згодом, через надмірність стресу або його тривалість, компенсаторна здатність виснажується, і процес змін набуває патологічного характеру. Така перебудова серця носить назву ПРМ, реалізується на рівні морфологічних змін у «геометрії» серця, балансі структурних компонентів, метаболізмі та електропровідності [9]. Головна роль у ремоделюванні серця відводиться, все-таки, міокардові. Особливу цікавість викликає міокард саме лівого шлуночка серця через те, що він перший реагує на серцевий стрес будь-якої етіології [2].

Гіпертрофія є основним компонентом ремоделювання, супроводжуючи обидва його види, але має різну морфологічну вираженість та етіопатогенетичну залежність [19]. Істотною різницею між фізіологічним і патологічним ремоделюванням є наявність дисбалансу співвідношення скоротливих білків із змінами організації інтерстицію, наслідком чого є фіброз у випадку ПРМ, чого не спостерігається при ФРМ [20]. Не менш важливим компонентом ПРМ є апоптоз, що є рідкістю при ФРМ [21].

Різниця між фізіологічним та патологічним ремоделюванням:

1) Чинником, ініціюючим розвиток ФРМ можна вважати фізіологічний стрес – вагітність, фізичні та гіпоксичні тренування, перебування в умовах високогір'я [22]. Тоді як для патологічного – це перевантаження тиском та/або об'ємом на фоні серцево-судинної патології або надлишкового гіпоксичного сигналу, що переходить у пошкодження [23].

2) Як ПРМ, так і ФРМ включає розвиток гіпертрофії, яка може бути викликана тиском або об'ємним перевантаженням серця, або гіпоксією. Ці два стимули по-різному проявляються морфологічно. Так, ремоделювання лівого шлуночка (ЛШ) через перевантаження тиском характеризується концентричною гіпертрофією, а об'ємом – ексцентричною [24]. На клітинному рівні концентрична гіпертрофія характеризується паралельним утворенням нових саркомерів із латеральним ростом окремих кардіоміоцитів. Ця

гіпертрофія загалом призводить до збільшення товщини стінок на тлі зменшення камери ЛШ (при ПРМ), або зміни діаметра камери відсутні (при ФРМ) [19].

Ексцентрична гіпертрофія внаслідок перевантаження об'ємом формується шляхом послідовного утворення саркомерів і поздовжнього росту кардіоміоцитів. Фенотип цього ремоделювання зазвичай пов'язаний із дилатацією ЛШ (при ПРМ) або пропорційним збільшенням ЛШ та товщини стінок (ФРМ) [25].

3) ПРМ супроводжується диспропорційним збільшенням маси серця та ангиогенезом, тоді як ФРМ характеризується координованим збільшенням маси серцевого м'язу та нових судин, що призводить до збереження або навіть покращення функціональної активності міокарда [26]. Клінічно в пацієнтів з ПРМ діагностують зменшення скоротливої активності міокарда ЛШ і серцевого викиду, систолічну та/або діастолічну дисфункцію [27]. ПРМ асоційоване зі збільшенням ризиків серцевої недостатності, аритмій та невідвортної смерті пацієнтів, натомість фізіологічні стимули, що викликають ФРМ, збільшують стійкість кардіоміоцитів до дії патологічних впливів, покращуючи прогнози [28].

4) Фізіологічне ремоделювання має зворотній характер, на відміну від ПРМ, не супроводжується зміною складу скоротливих білків, інтерстиціальним фіброзом та апоптозом/некрозом кардіоміоцитів, мітохондріальною дисфункцією або вагомим нітрозо-оксидативним стресом [29]. Особливістю впливу фізіологічного стимулу є те, що він сприяє збереженню і навіть підвищенню функціональної активності ЛШ із попередженням апоптозу кардіоміоцитів [30].

4) Фенотипічна різниця між ПРМ і ФРМ полягає в рецепторах сигнальних шляхів активації. Для патологічної гіпертрофії це катехоламін- та ангіотензин II – чутливі G-протеїн пов'язані рецептори (GPCR), стимуляція яких призводить до активації мітоген-активованих протеїнкіназ (MAP), тоді як

шлях сигналізації для фізіологічної - це рецептор до інсуліноподібного фактору росту -1 (IGF -1) / PI3K(p110 α) [31].

5) Біомаркерами ПРМ можна розглядати реекспресію фетальних генів, серед яких передсердно-мозковий натрийуретичний пептид, α -склетний міозин та α -, β -міозиновий важкий ланцюг (МНС) [32].

1.2 Компоненти ремоделювання міокарда при серцево-судинних захворюваннях

1.2.1 Гіпертрофія як ключова складова ремоделювання міокарда

Основними процесами, що індукують гіпертрофію міокарда, є збільшення АТ, серцевого викиду та ростових факторів, підвищення напруги на стінки шлуночків та центральних судин і активація атеросклеротичного процесу або вазоконстрикторних факторів, що, частіше за все, супроводжується гіпоксією міокарда [33]. Тобто, усі фактори, які призводять до збільшення навантаження на міокард шлуночків. Механічне перенапруження на стінки шлуночків впливає на конформацію функціональних протеїнів із активацією ряду ферментів, одним з яких є фосфоліпаза. Такі зміни призводять до збільшення швидкості біосинтезу та об'ємів міофібрилярних протеїнів, що є основою гіпертрофічного росту кардіоміоцитів [34].

Розвиток гіпертрофії направлено на підтримку серцевого викиду, але згодом, через тривалість біомеханічного стресу, призводить до порушення іотропної / люзитропної функцій і прогресування дисфункції ЛШ із розвитком серцевої недостатності [35]. Оцінку розвитку гіпертрофії проводять за рівнями експресії кардіотрофіну-1 (КТ-1).

1.2.2 Кардітрофін-1 (КТ-1) – важливий компонент ремоделювання міокарда

Уперше КТ-1 був ідентифікований як перспективний агоніст гіпертрофії *in vitro*. Проте пізніше, його експресію стали пов'язувати з патологією міокарда, підвищенням системного АТ і формуванням серцевої недостатності [36] з посиланням на те, що внесок КТ-1 у фізіологічне ремоделювання ще достатньо не вивчений. У численних експериментальних дослідженнях КТ-1 виступає в ролі фактора, що покращує серцеве виживання, сприяє гіпертрофії кардіоміоцитів *in vitro*, але ефекти *in vivo* визначити важче [37]. Jin та ін. досліджували наслідки хронічного введення rCT-1 здоровим мишам і спостерігали підвищення коефіцієнту співвідношення маси серця до маси тіла [38].

КТ-1 реалізує свої ефекти за допомогою унікальної системи рецепторів, що складається з глікопротеїну 90 і глікопротеїну 130, після яких сигнал передається 3 шляхами, ймовірно, комбінованими: 1) перетворювач сигналу янус-кінази та активатор транскрипції (JAK/STAT); 2) мітоген-активована протеїнкіназа p42/44 (p42/44 MAPK) - шлях, який також відомий як позаклітинний рецептор кінази-1/2 (ERK1/2); 3) шлях фосфатиділіносітол 3-ОН-кінази (PI3K/Akt) [39].

Варто відмітити, що КТ-1 обмежує ураження міокарда при введенні під час реоксигенації, що передбачає великі перспективи його клінічного застосування при ішемії-реперфузії [40].

На моделі Dahl соль-чутливих гіпертензивних щурах з діастолічною дисфункцією було продемонстровано, що КТ-1 підвищує рівень галектину-3, що, в свою чергу, опосередковує прозапальні та профібротичні ефекти в міокарді [41].

Також є інформація про залучення КТ-1 до процесів серцевої репарації при інфаркті міокарда [42].

Важливою для ефективної компенсації гіпертрофією перевантажених шлуночків є необхідність у збільшенні колагенів I і III типів як основних елементів позаклітинного каркасу. Прямий взаємозв'язок між ними доведено в дослідженнях Watanabe T. та ін., де надмірна експресія КТ-1 асоціюється з фіброзом міокарда і посиленою експресією колагену в пацієнтів з АГ та серцевою недостатністю [43]. Натомість / навпаки, дослідник López N з командою вважають, що таке підвищення КТ-1 не є індуктором фіброзу, а проявляє кардіопротективні властивості. КТ-1 захищає кардіоміоцити дорослих від апоптозу, спричиненим ангіотензином II та окислювальним стресом, за допомогою gp130 / LIFR та внутрішньоклітинних каскадів PI3K/Akt та p42/44-MAPK [44].

1.2.3 Фіброз міокарда, сучасні уявлення його формування

Наступним компонентом ремоделювання міокарда є фіброз, який може посилити серцеву дисфункцію, що призводить до несприятливих прогнозів у пацієнтів, перешкоджаючи як систолічній, так і діастолічній функції, потенціює аритмогенез і збільшує ймовірність серцевої недостатності [45].

Зростання потужності за рахунок активації фібробластів на тлі зменшення числа кардіоміоцитів індукується завдяки секреції трансформуючого фактору росту (TGF β 1), цитокінів, фактору росту тромбоцитів (PDGF) та ін. / інших [46]. Проте така реконструкція не обмежується фіброзом, а викликає зміни в інтрацелюлярному матриксі, що полягають в агрегації перинуклеарного глікогену, «виснаженні» саркомеру, експресії фетальних структурних генів (наприклад, α -актинініну і β -міозину, важкий ланцюг останнього дозволяє більш ефективно використовувати енергію) [47].

Основним клітинним медіатором кардіального фіброзу є резидентний фібробласт міокарда. Фібробласти у відповідь на різноманітні стимули швидко трансформуються в міофібробласти [48]. Такі фенотипічні зміни є

ключовим механізмом загоєння, але після реалізації своєї ролі міофібробласти мають зазнати апоптозу. Таким чином, проблема надмірності фіброзних змін полягає не тільки в надпродукції колагенів, але й у дефекті апоптозу, неможливості зворотної трансформації міофібробластів у фібробласти або в обох механізмах [49].

Вже достеменно відомо, що такого перетворення на міофібробластний фенотип зазнають ще і клітини ендотелію (ендотеліально-мезенхімальний перехід (EndMT)), і такий процес може бути важливим у розвитку фіброзу після перевантаження тиском [50]. Аналогічно, епітеліально-мезенхімальний перехід (EMT) також може сприяти утворенню рубців [51]. Циркулюючі мієлоїдні клітини при потрапленні в міокард можуть змінюватись самі та стимулювати перетворення ендогенних клітин на міофібробласти [52]. Ще одним потенційним джерелом колагену під час розвитку кардіального фіброзу є циркулюючі фіброцити [53].

Макрофаги в серці дуже неоднорідні і проявляють функціональну та фенотипічну універсальність, що дозволяє їм брати участь у широкому спектрі процесів, у тому числі регуляції запалення, фіброзі, реконструкції матриці, ангіогенезі та регенерації [54]. Таким чином, активовані макрофаги можуть регулювати фіброз шляхом вивільнення цитокінів, факторів росту з фіброгенними властивостями, протеаз, що беруть участь у матричному ремоделюванні шляхом утворення матрицелюлярних білків [55].

Незалежно від етіології, фіброз серця пов'язують з розширенням популяції тучних клітин міокарда [56]. Який саме посередник викликає скупчення тучних клітин у фіброзних ділянках міокарда, ще не встановлено. Вважають, що таким посередником є фактор стовбурових клітин (SCF), тоді як у дослідженні Ngkelo довів, що клітини-попередники тучних клітин, які інфільтрують інфарктний міокард, можуть походити з жирової тканини [57]. Існує думка про активну участь у фіброзі Т-лімфоцитів при інфаркті міокарда та серцевої недостатності [58]. Поява нейтрофілів, що частіше пов'язані з гострим запаленням міокарда, сприяє відновленню тканин шляхом модуляції

фенотипу макрофагів. Отже, внесок нейтрофілів у хронічний фіброз міокарда може бути обмежений ранньою фазою активації фібробластів [59].

Ремоделювання серця, незалежно від етіології, пов'язане з індукцією інтерстиціального відкладення матрицелюлярних білків [60]. Останні зв'язуються з компонентами структурної матриці та рецепторів клітинної поверхні (інтегрини та синдекани), функціонуючи як «молекулярні мости» між екстрацелюлярним матриксом і клітинами, трансдукуючи або модулюючи відповіді цитокінів та факторів росту. Сімейство включає тромбоспондини (TSPs), тенасцини-С і -Х, остеопонтин, SPARC, періостин і члени CCN та інші [61].

Окислювальний стрес критично регулює фенотип і функції фібробластів і відіграє важливу роль у фіброзі тканин [62]. Генерація АФК має пряму залежність від широкого спектру цитокінів і факторів росту і може представляти спільний зв'язок між різними формами серцевого стресу та фіброзом. Цитокінова індукція нікотинамід-аденін-динуклеотид фосфатних (NADPH) оксидаз відіграє вирішальну роль у генерації АФК та може опосередковувати фіброзну реакцію [63].

1.2.4 Колаген I типу в міокарді

Міокард ссавців складається з кардіоміоцитів і великої популяції інтерстиціальних клітин, укладених у складну мережу білків екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ). У здоровому стані ЕЦМ серця не просто є механічним каркасом, але може також передавати сигнали, які важливі для виживання і функціонування клітин [64]. ЕЦМ є неклітинною тривимірною макромолекулярною мережею, що складається з колагену, протеогліканів, глікозаміногліканів, еластину, фібронектину, ламініну і декількох інших глікопротеїнів [65].

При патологічному стані ремоделювання міокарда, накопичення фібриллярного колагену (ФК) може сприяти диференціюванню і проліферації міофібробластів, що формує хибне коло, збільшуючи синтез колагену [66].

У багатьох дослідженнях зазначається, що в процесі ремоделювання міокарда рівень ФК підвищується як при гострих [67], так і при хронічних серцево-судинних захворюваннях [68]. Метаболізм колагену в міокарді можна оцінити опосередковано за допомогою циркулюючих в плазмі крові біомаркерів. Зокрема, N-термінальний проколаген типу I вважається маркером синтезу колагену типу I, тоді як C-кінцевий телопептид колагену I типу є маркером його деградації. Виявлений асоціативний зв'язок між підвищенням синтезу колагену і розміром ЛШ, часом ізоволемічної релаксації і відносною товщиною стінки. Також були виявлені асоціації між підвищеною деградацією колагену і тривалістю QRS [69]. Деградацію ФК і інших білків ЕЦМ каталізують матричні металлопротеїнази (ММР), які представляють собою сімейство цинк-залежних протеаз. Протягом патологічного процесу міокардальні порушення і ремоделювання характеризуються накопиченням колагену, втратою міоцитів і порушенням перебудови структури серця, що свідчить про порушення гомеостазу колагену ЕЦМ, як одного з головних чинників прогресування серцевої дисфункції в умовах гіпоксії [70].

Колаген I типу служить маркером активності інших речовин при певних процесах, корелюючи з їхньою концентрацією, або представляючи наслідки їхньої функціональної діяльності. Прикладом може бути підвищені рівні експресії генів натрій-глюкозного котранспортера 1 (SGLT1), що пов'язані з гіпертрофічною і ішемічною кардіоміопатією [71].

Початковою реакцією міокарда на перевантаження тиском є концентричний гіпертрофічний ріст, метою якого є зменшення напруження стінки та збереження функції ЛШ. Тривале перевантаження тиском зазвичай призводить до інтенсивного інтерстиціального та периваскулярного фіброзу [72]. Колаген I та III типів помітно збільшуються при гіпертензивному фіброзі серця. Хоча профіль експресії ФК на ранній стадії демонструє переважання

колагену III, колаген I типу забезпечує більш інтенсивну і тривалу регуляцію як на стадії компенсації, так і декомпенсації [73].

Помітна втрата інтерстиціальних колагенів відбувається у відповідь на перевантаження об'ємом, що супроводжується змінами ізоформного профілю колагену та його організації [74]. Деградація ЕЦМ, що виникає при об'ємному перевантаженні, пов'язана з активацією MMP, запальною інфільтрацією та окислювальним стресом [75]. Частіше за все, такі зміни призводять до дилатаційного ремоделювання.

1.2.5 Тайтин – модулятор жорсткості міокарда

Тітин, тайтин або конектин (ТТ) – гігантський білок, що входить до складу саркомеру кардіоміоцитів. Якщо актин і міозин генерують силу скорочення завдяки механізму «ковзної нитки», то тайтин забезпечує цілісність саркомеру, модулюючи пасивне напруження. Більш того, цей білок здатен взаємодіяти з іншими компонентами міофіламенту, впливаючи на Ca^{2+} -залежну напругу [76].

Важливим компонентом ремоделювання міокарда у відповідь на різні гемодинамічні потреби є модуляція його жорсткості за рахунок посттрансляційної модифікації білка тайтину. Така модуляція загальної жорсткості міокарда впливає на стінки камер серця та діастолічне наповнення і наступні функції систолічного насоса за рахунок ауторегуляції – закону Франка-Старлінга [77]. Модифікація здійснюється двома шляхами. Перший – за рахунок окислення та фосфорилування. Це швидкий, ситуативний шлях контролю над пасивною пружністю [78]. Другий - за рахунок перемикання між двома ізоформами білку, базується на більш низькій жорсткості ізоформи N2BA, порівняно до N2B, та їх сумісної експресії в одному саркомері [79]. Наприклад, превалювання короткого, але жорсткішого N2B у дорослих, порівняно до більш м'якої ізоформи N2BA у плода [80].

Молекула тайтину має дві області: N-кінцеву I-смугу і C-кінцеву A-смугу. I-смуга – це еластична частина молекули, яка містить дві області тандемних імуноглобулінових доменів по обидва боки від PEVK-області. A-смуга виконує роль білкової направляючої і містить повторювані Ig та фібронектинові комплекси. N-кінець і C-кінець прикріплюються до Z-диску і M-лінії саркомеру, відповідно [81]. Таким чином, одна молекула тайтину простягається на половину довжини саркомеру. Тайтин містить ділянки зв'язування для м'язових білків, що дозволяє йому бути адгезивною матрицею для складання скорочувального апарату м'язової клітини [82].

1.2.6 Анексин V – діагностичний маркер апоптозу кардіоміоцитів

Розширення знань в області загибелі клітин міокарда і зростання стурбованості через доведену її патогенетичну значущість для ремоделювання серця із подальшим розвитком серцевої недостатності, призвело до появи попиту на встановлення головних принципів у кількісній оцінці цієї загибелі [83].

У зміненому серці загибель клітин міокарда регулюється кількома рецепторами та сигналізацією. У відповідь на вплив внутрішніх та зовнішніх подразників кардіоміоцити гинуть різними механізмами загибелі. Виділяють 6 основних форм загибелі кардіоміоцитів: апоптоз, некроптоз, мітохондріально-опосередкований некроз, піроптоз, фероптоз та аутофагічна клітинна смерть [84]. Так, клітини міокарда під час загибелі можуть бути неушкодженими, без порушення їхньої плазматичної мембрани, що відбувається при апоптозі та аутофагії і підтримує цілісність мембран клітин міокарда. З іншого боку, піроптоз і некроптоз призводять до порушення клітинної мембрани, що веде до вивільнення вмісту цитоплазми, включаючи запальні цитокіни. Це є сигналами стресу для сусідніх клітин і мобілізації захисних механізмів в організмі [85]. Хоча апоптоз не є головним механізмом загибелі кардіоміоцитів при серцевій патології (лише 80-250 міоцитів на 10^5 ядер),

використання його рівня як інформативного маркера на ранніх стадіях розвитку патології є підґрунтям для процесу скринінга пацієнтів, особливо з латентним перебігом ССЗ [86].

Перспективним маркером молекулярної візуалізації апоптозу, що використовується в сучасній кардіології, є анексин V (АН), через його високу афінність до фосфотидилсерину (PS) ($K_d = 7 \text{ нМ}$) – 8 молекул АН на молекулу PS [87].

Апоптоз регулюється генами [88] та включає протеоліз внутрішньоклітинних компонентів шляхом активації протеолітичних ферментів – каспаз та флопази з скрамблазою, що призводить до змін конфігурації плазматичної мембрани, яке візуально проявляється зморщуванням (усадкою) клітин із конденсацією хроматину [89]. Одночасно з цим проходить перерозподіл PS із внутрішньої поверхні мембрани до зовнішньої у бік пошкодження шляхом кальцій-залежного руху до місця надходження Ca^{2+} . Цей процес оголює аніонну голівку, виступаючи в ролі рецептора-мітки «з'їж мене» або «фенотипу смерті». Поряд з зовнішнім механізмом, апоптоз може викликати внутрішній шлях, ініціюючими факторами в якому виступають мітохондрії та ендоплазматичний ретикулум [90]. PS є доступним для зв'язування з АН також у клітинних плазматичних мембранах під час некрозу через той самий механізм [91]. Дослідження біологічної ролі PS виявило, що його екстерналізація проходить не тільки при апоптозі, але й в активованих макрофагах та клітинах, що піддаються стресу. Ці результати доводять цінність АН для візуалізації запалення і клітинного стресу [92].

АН являє собою білок, що інгібує фосфоліпазу A_2 і протеїн С, впливає на активність кальцієвого каналу, трансдукцію клітинного сигналу, запалення, зростання і диференціювання. Ген містить 13 екзонів, білок з молекулярною масою близько 35 кДа [93].

Анексини (AnxA) – це Ca^{2+} - регульовані фосфоліпід-зв'язуючі білки, які відіграють важливу роль у клітинному життєвому циклі, екзоцитозі та

апоптозі. Таким зв'язуванням вони збільшують порядок двошарових ліпідів, що служить захистом і відновлює проникність клітинної мембрани після її пошкодження. Він здатний викликати агрегацію гранул в присутності вільного кальцію. Області контакту між гранулами, утвореними цим білком, структурно подібні до тих, що спостерігаються між везикулами і плазматичною мембраною в процесі екзоцитозу [94].

Раніше було виявлено понад 100 анексинів у живих істот різних видів, з них дванадцять білків знайдені в людському організмі; умовно їх називають анексинами А1-13. Перший білок цього сімейства, відкритий у 1977 році, називався сінексіном, в даний час відомий як АН А7 [95].

При дослідженні окремої патології в різних органах важливо враховувати рівень експресії генів *AnxA*. Кожен з відомих видів людських анексинів має органи «пікової» експресії. Саме цим Крейц пояснює високий рівень експресії *AnxA* у всіх клітинах організму [96].

Усі анексини розташовані внутрішньоклітинно, а під дією проапоптотичних чинників вони транслокуються з зовнішньої мембрани, проте існує всього кілька білків цієї групи (*AnxA1*, *AnxA2* і *AnxA5*), що містяться не тільки в цитоплазмі, але й у позаклітинному середовищі [97].

Анексини V, VI та VII мають найвищі рівні експресії у ССС. Першим за величиною експресії в серці є *AnxA VI*. Рівень *AnxA VII* нижче, ніж *AnxA V* [98, 99].

АН А6 грає важливу роль у біомеханіці скорочення. Його надекспресія призводить до дилатаційної кардіоміопатії, у той час як його дефіцит веде до швидких змін кальцію та підвищення скоротливої функції міокарда, що вказує на негативний ізотропний ефект. На мишиних моделях, нокаутуваних за геном АН А7, було виявлено зменшення співвідношення сили та частоти скорочень у зрілих кардіоміоцитах, що узгоджується з регуляцією кальцію. Роль анексинів у ССС ще вивчається [100].

Ще о 2000-х роках були розроблені неінвазивні протоколи використання АН кількісного вимірювання запрограмованої загибелі клітин у пацієнтів як *in*

vitro, так і *in vivo* [101]. Дослідження апоптозу з використанням анексіну флуоресцеїну *in vitro* продемонстрували сильну кореляцію з оцінками апоптозу, підтвердженими деградацією ядерної ДНК і активацією каспаз. Локалізація *in vivo* внутрішньовенно введеного Tc 99m- АН була продемонстрована на численних доклінічних моделях апоптозу. Сцинтиграфічне дослідження на людях з використанням Tc 99m-gh АН дало можливість візуалізації загибелі клітин при гострому інфаркті міокарда, в пухлинах з високим апоптичним індексом і у відповідь на протипухлинну хіміотерапію та інші варіації клінічного використання [102].

Voss A., і Strasser A. (2020) у своєму дослідженні функціональної ролі апоптозу при ембріогенезі різних ссавців і людини припускають, що апоптоз необхідний переважно для балансування проліферації клітин, і ці взаємозалежні процеси разом ефективніше регулюють ріст тканини, ніж кожний процес окремо [103].

Вчені неодноразово відзначали зміни експресії даного білка при різній серцево-судинній патології. Перш за все, АН асоціюється з есенціальною гіпертензією, гіпертрофічною кардіоміопатією і серцевою недостатністю [104]. Так, експресія натрій / кальцієвого обмінника-1 (NCX1) збільшується під час серцевої гіпертрофії і серцевої недостатності, відіграючи важливу роль у виході Ca^{2+} . Вміст АН при цьому змінюється прямо пропорційно експресії NCX1, що грає моделюючу роль під час серцевої недостатності. Водночас надекспресія АН уповільнює виведення Ca^{2+} в кардіоміоцитах [105].

Також є припущення, що підвищення рівня АН у плазмі при АГ, ймовірно, є захисним механізмом, асоційованим з його протизапальним і антикоагулянтними ефектами [106].

При серцевій недостатності в міокарді визначається достовірно підвищений рівень АН, у порівнянні до контролю. Також реєстрували збільшення рівня АН VI. Ці явища супроводжувалися зміною локалізації скупчення анексінів: у нормальному міокарді АН знаходиться на антисарколемальних і інтеркалірованих дисках, тоді як в міокарді при

серцевій недостатності – в інтерстиції [107]. Цікавим є те, що при хронічній серцевій хворобі апоптоз може відбуватися без перебігу фази, що призводить до незворотної загибелі клітини. Він виникає шляхом вивільнення цитохрому С, активації каспази 3 та 8. Проте ядро клітини залишається неушкодженим, і клітина ще є життєздатною, хоча і дисфункціональною. Цей клітинний стан називається переривання апоптозу [108].

На різноманітних тваринних моделях «ішемії-реперфузії» та інфаркта міокарда, був доведений факт того, що тривалі періоди ішемії міокарда призводять до зростання швидкості некрозу, тоді як реперфузія призводить до посилення апоптозу. Пов'язано це, ймовірно, з відновленням постачання кисню та глюкози, продукцією АТФ, яка є необхідною не тільки для виживання життєздатних клітин, але й для завершення апоптозу, тим самим прискорюючи цей процес. Таке збільшення зони ураження напряму корелює з високим рівнем експресії АН. Схожа картина, як вважається, має місце й у людини [109].

Таким чином, використання анексину в ролі ідентифікатора процесів апоптозу є дуже актуальним для оцінки характеру ремоделювання міокарда при ССЗ. Апоптоз ініціюють як фізіологічні, так і патологічні проапоптотичні стимули, що робить вагомий внесок у структуру ремоделювання. Більше того, завдяки оборотності процесу, поступовості та його розвитку на ранніх етапах формування патології, наявності вже створених протоколів дослідження апоптозу як *in vivo*, так і *in vitro*, використання анексину дає змогу пошуку нових ланок патогенезу та терапевтичних мішеней, спрямованих на поліпшення перебігу ССЗ та обмеження їхнього прогресування [108].

1.3 Експериментальні моделі та дослідження фізіологічних і патологічних механізми дії переривчастої гіпоксії

Механізми гіпоксичної сигналізації в серцево-судинній системі. За умов гіпоксії кожна клітина організму запускає каскад реакцій, спрямованих

на адаптування до нових умов. ССС не є виключенням. Класичними відповідями на такий стрес є транскрипційні, трансляційні та пострансляційні шляхи. Частіше за все, транскрипційний рівень експресії генів супресується за умов гіпоксії. Але є група генів, експресія яких індукуюється гіпоксією. Завдяки цьому індукуванню реалізується здатність до адаптації, яка морфологічно проявляється у «структурному сліді гіпоксії». Ця група включає гени, що викликають гіпертрофію міокарда ЛШ, ангіогенез (судинний ендотеліальний фактор росту α , Vegf- α), еритроцитоз (еритропоетин, Epo), зміни клітинного метаболізму (піруватдегідрогеназа 1 або лактатдегідрогеназа) та запалення (iNOS) [110].

Індуцибельний гіпоксією фактор - 1α (HIF- 1α) та - 1β (HIF- 1β) виступають у ролі транскрипційних медіаторів. Активність HIF- 1α регулюється на посттранскрипційному рівні. За нормооксичних умов, цей білок інактивується кисневозалежною убіквілін-протеосомною системою. Натомість, у випадку з гіпоксією цього не стається, і HIF- 1α транслокується в ядро, формуючи гетеродімерний комплекс з HIF- 1β та впливає на чутливі до гіпоксії елементи геному, що, в свою чергу, індукуює цільові гени [111].

Патогенез гіпоксичного пошкодження міокарда та адаптація до нього. Якщо з ангіогенезом та еритропоезом достатньо добре зрозуміло, то питання запалення та ролі iNOS у ремоделюванні при дії гіпоксії є дуже дискутабельним.

Багато клінічних дослідів довели, що запалення лежить в основі атеросклерозу. Моноцити мігрують в субендотеліальний простір, де диференціюються в макрофаги. Вторинна імунна відповідь провокує накопичення в стінці судин ліпідів, що ініціює секрецію макрофагами та піністими (ксантомними) клітинами про-запальних медіаторів, таких як інтерлейкін-6 та С-реактивний білок. Підвищення в плазмі крові цих показників у пацієнтів з артеріальною та легеневою гіпертензією і людей із серцевою недостатністю після перенесення інфаркту міокарда, дає можливість припускати вклад запалення в серцево-судинне ремоделювання [112]. Але чи

виконує це стерильне запалення адаптивну роль – досі достеменно не доведено /залишається ще під питанням.

Раніше вважали, що макрофаги лише активують запалення у відповідь на пошкодження тканин та представлені однією популяцією клітин [113]. Останні дослідження довели, що макрофаги є гетерогенною клітинною популяцією і можуть бути класифікованими за місцем походження або функцією [114]. Цікавим є розподіл на M1 – прозапальну та M2-протизапальну популяції [115]. В експериментах *in vitro* дослідили, що M1 макрофаг зазвичай індукується комбінацією цитокіну Th1, інтерферону- γ , лігандом толл-подібного рецептора-4 і ліпополісахаридами. Вони індукують експресію прозапальних генів, включаючи iNOS, викликаючи гіперпродукцію NO. Таким чином, розглядається ген iNOS як класичний маркерний ген M1. З іншого боку, M2 макрофаги індукуються цитокінами Th2, такими як інтерлейкін-4 або інтерлейкін-13. Аргіназа 1 (Arg1) або експресія рецептора маннози дуже виражена в M2 макрофагах, отже, ці гени відомі як M2 маркерні гени [116]. Слід зазначити, що обидва iNOS і Arg1 ферменти каталізують і конкурують за однаковий метаболічний субстрат – L-аргінін. При цьому iNOS продукує NO з L-аргініну, сприяючи запаленню, Arg1 в M2 макрофагах пригнічує утворення NO [117]. У дослідженнях Norihiko Takeda та його команди було доведено, що HIF-1 α потенціює продукування NO, індукуючи iNOS у M1-макрофагах, тоді як HIF-2 α супресує продукцію NO, маючи прямий зв'язок з Arg1 генною експресією у M2-макрофагах [118]. Ці результати показали, що баланс між HIF-1 α і HIF-2 α , названий як перемикач HIF- α , регулює вмикання / вимикання утворення NO.

Як вже відмічалось вище, плазмові показники медіаторів запалення, таких як фактор некрозу пухлин α , інтерлейкін-6, достовірно збільшуються в пацієнтів з серцевою недостатністю, що супроводжується накопиченням макрофагів у серцевому м'язі [119].

На мишачих моделях інфаркту міокарда *in vivo* досліджували роль запалення [120]. Було виділено 2 типи моноцитів/макрофагів, які включали

Ly-6Chi та Ly-6Clo, і мали послідовність накопичення в залежності від стадії міокардіальної загибелі. Поки Ly-6Chi моноцит/макрофаг поглинає пошкоджені клітини, Ly-6Clo активує ангиогенез та рубцювання тканини [121].

1.4 Експериментальні моделі та дослідження патогенетичних механізмів розвитку артеріальної гіпертензії

Через високу поширеність АГ, пошук адекватної експериментальної моделі представляє актуальну тему вже багато років. Складність використання таких моделей в тому, що вони повинні не тільки відтворювати всі етапи патогенезу, а й демонструвати сформоване стійке підвищення АГ і пошкодження органів-мішеней. Нажаль, різноспрямованість ланок патогенезу артеріальних гіпертензій не дозволяє обрати одну універсальну модель. Для вибору найбільш відповідної до цілей дослідження моделей був проведений літературний пошук, результати якого виявили 2 найбільш адекватні моделі, якими стали спонтанно гіпертензивні щури лінії SHR – еквівалент есенціальної АГ у людей, та розроблена на кафедрі патологічної фізіології ЗДМУ модель ендокринно-сольової АГ, що відповідає вторинній АГ людини.

1.4.1 Патогенез гіпертензивного пошкодження міокарда в щурів лінії SHR та адаптація до нього

Найбільш всесвітньо відомою моделлю генетичної АГ вважаються щури лінії SHR (Spontaneously hypertensive rat). Генетичні механізми гіпертензії у SHR були віднесені як до нервових, так і до судинних змін.

Так, у щурів лінії SHR АГ розвивається поступово і спонтанно у віці біля 4-5 тижнів через підвищення периферичного опору судин та зниження їхньої чутливості до гуморальних факторів регуляції тонуусу [122]. У дослідженнях Li J. ті ін. було доведено, що зміни міокарда, а саме гіпертрофія

і фіброз розвиваються лише з 6-7 місяців, а до цього існує метаболічний і енергетичний дисбаланс, що ймовірно і провокує розвиток гіпертрофії [123].

Андрогени можуть модулювати гіпертензію та вікові ураження нирок, зміни натрійурезу та тубуло-клубочковий зворотній зв'язок таким чином, що потенційно нагадує гіпертензію в людини. Отже, ця помітна роль андрогенів у SHR імітує постменопаузальну гіпертензію [124].

1.4.2 Патогенез гіпертензивного пошкодження міокарда в щурів з ендокринно-сольовою артеріальною гіпертензією та адаптація до нього

За даним ВООЗ, кожна третя доросла людина в світі страждає на АГ. На долю вторинних АГ припадає 5-10 % від усіх виявлених причин стійкого підвищення АТ, з яких гіперкортицизм та гіперальдостеронізм призводять до розвитку АГ у 70-85 % пацієнтів віком від 40 років. Необхідно відмітити, що в хворих на гіперкортицизм спостерігається поєднання високого рівня кортизолу з підвищеною секрецією мінералокортикоїдів [125].

Патогенез стійкого підвищення АТ, викликаного гіперпродукцією стероїдів, пов'язаний, в першу чергу, з їхнім впливом на глюкокортикоїдні (GRs) та мінералокортикоїдні рецептори нирок (MRs), результатом чого стає збільшення реабсорбції натрію, затримка води та виведення калію. Зазвичай кортизол взаємодіє з MRs рецептором як антагоніст в тому сенсі, що зв'язує його, але не активує. За умов патології, особливо при утворенні супероксиду, він стає агоністом MRs, імітуючи дію альдостерону [126].

Така зміна ефекту відбувається внаслідок дефекту 11-бета-гідроксистероїд-дегідрогенази, дефіциту NADH і термінального зв'язуючого білка корепресора (c-terminal-binding protein), роллю яких є підтримувати кортизон в рецептор-неактивному стані [127]. Не менш важливим для розвитку АГ є рівні споживаного натрію, що моделює жорсткість ступеню вираження патогенетичних ланок при серцево-судинних захворювань [128].

Раніше у наших дослідженнях було доведено, що використана модель, окрім стійкого підвищення АТ, включає розвиток гіперкортицизму, гіперальдостеронізму, гіпернатріємії, зрушення циркадного ритму продукції гормонів, що призводить до збільшення ОЦК, периферичного опору судин, ендотеліальної дисфункції та формування АГ зі специфічним ПРМ, що відповідає меті нашого дослідження [129].

Наступним, та не менш важливим, етіологічним чинником ПРМ у щурів з ендокринно-сольовою АГ є запальні реакції з генерацією великої кількості вільних радикалів (O_2^- , OH^- , $ONOO^-$), що формують нітрузо-оксидативний стрес. Стероїди індують вироблення супероксиду через MRs рецептор-опосередковану активацію NADPH-оксидази, тим самим сприяючи розвитку ендотеліальної та міокардіальної дисфункції із запаленням та апоптозом [130]. Доведено, що супероксид відіграє важливу фізіологічну роль, включаючи сигнальні шляхи клітин та активуючи місцевий імунітет, але при збільшенні його кількості може швидко реагувати з NO і утворювати пероксинітрид або перетворюватися на перекис водню з утворенням гідроксил-радикалів [131]. Ця взаємодія знижує біодоступність NO, унеможливаючи адаптаційно-компенаторні зміни [132]. Цікавим є те, що NO синтази (NOS), особливо ендотеліальна (eNOS), можуть перемикатися з NO продукуючої, кардіопротективної ізоформи, на фактор пошкодження через її «роз'єднання» та синтез супероксиду [133].

Такий взаємозв'язок дає можливість припустити патогенетичну важливість системи NO при розвитку ПРМ. Доказом цього припущення може слугувати зменшення вираженості структурних змін серця в щурів з ДОКА-сольовою АГ при хронічному введенні L-аргініну, який є субстратом для утворення NO [134].

1.5 Роль системи оксиду азоту в експериментальному ремоделюванні міокарда

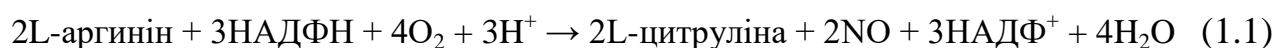
Система NO є газотрансмітерною системою, що широко представлена в усіх тканинах організму. Її основний ефектор – молекула NO, яка за фізіологічних умов стає універсальним регулятором клітинного метаболізму та міжклітинних взаємин. Але ефект NO залежить від концентрації, наявності субстратів, метаболітів оксидативного стресу та антиоксидантів. При їхньому надлишку збільшується кількість NO, а його сигнальна та фізіологічна функції змінюються на патологічні, запускаючи процеси, що призводять до апоптозу або некрозу клітин. Основним джерелом NO є фермент NOS, представлений трьома ізоформами: нейрональною (nNOS), індукцибельною (iNOS) та ендотеліальною (eNOS). Метою змін стану цієї системи у відповідь на фізіологічні впливи або стресорні навантаження є покращення функціонування та пристосування до нових умов [135].

Тема гіпоксичних впливів на стан системи NO біологічних організмів сьогодні дуже актуальна. Необхідно відокремити роботи, які присвячені впливам на серцевий м'яз. Зокрема, в роботах Manukhina E. V. і Treuer A. було доведено, що система NO є важливим компонентом адаптації до умов переривчастої гіпоксії [136, 137]. Встановлено, що остання впливає на стан системи NO міокарда декількома шляхами: по-перше, формує субстратний дефіцит та через лімітування надходження O₂ знижує продукцію NO [136]; але змінює ізоформний профіль NOS через активацію Ca²⁺ / кальмодулін-залежних ізоформ NO синтази (eNOS та nNOS), насамперед ендотеліальної (eNOS), що компенсує зниження NO, підвищує його біодоступність та покращує васкуляризацію тканин [137]; по-друге, активує білки теплового шоку, в тому числі HSP90, який не тільки стимулює конститутивні ізоформи, а й запобігає утворенню супероксид-аніону під час синтезу NO [138, 139] та стимулює експресію індукovanого гіпоксією фактору HIF-1 α та HIF-1 β . За гіпоксичних умов HIF-1 α транслокується в ядро та індукує цільові гени, що

призводить до розвитку гіпертрофії міокарда, посилення ангиогенезу, еритроцитозу, стимулює перебудови клітинного метаболізму шляхом активації ферментів піруватдегідрогенази-1 та /або лактатдегідрогенази [140].

Тим самим, ізоформи NOS можна розглядати як ключовий фактор регуляції ефектів NO, що виступає в ролі протектора або агента-агресора, який порушує функцію та пошкоджує ССС [141].

В організмі NO синтезується ферментативним шляхом з L-аргінину за допомогою гемопротейнів, подібних до цитохрому P-450. Кофакторами синтезу є нікотинамід-аденін-дінуклеотид-фосфат (НАДФ-Н), флавін-аденін-дінуклеотид (ФАД), флавін-мононуклеотид (ФМН), тетрагідробіоптерін, гем і кальмодулін [137]. Схема утворення NO:



У структурі ізоформ ферменту встановлені домени з оксидативною та редуцтажною активністю. До активного центру ферменту входить залізорпорфіриновий комплекс, що включає цистеїн або метіонін. За характером індукції та дії, ізоформи поділяють на: конститутивні, Ca^{2+} -залежні – nNOS й eNOS ізоформи та Ca^{2+} -незалежна – iNOS [142].

Але існує й неферментативний шлях утворення NO з нітритів та нітратів за допомогою нітрит- та нітрат-редуктаз, що перебігає більшою мірою в умовах гіпоксії через зниження активності NOS. Деякі реакції відновлення нітритів у тканинах опосередковані протеїнами з нітрит-редуктажною активністю, що містять гем [143].



За умов надлишку NO депонується, зв'язуючись з пептидами. У такій формі він може мігрувати в міжклітинний простір, де буде здійснювати сигнальну, протекторну або пошкоджуючу дію. Це, на думку багатьох авторів, є основою формування резистентності організму до пошкодження вільними радикалами, викликаними як дефіцитом NO, так і його гіперпродукцією [144].

NO швидко окислюється до двоокису азоту (NO_2), який у водних розчинах перетворюється в нітрит (NO^{2-}), або нітрат (NO^{3-}). Нітрити мають

цитотоксичну дію, а нітрати викликають апоптоз тому, що відновлюються в нітрит за допомогою ксантиноксидази [145].

Особливий інтерес до системи NO пов'язаний із його впливом на ССС, як одну з вітально важливих. Так, у 1998 році за відкриття сигнальної ролі NO у функціонуванні ССС Роберту Фурчготту, Льюїсу Ігнарро та Феріду Мюраду була присуджена Нобелівська премія в галузі фізіології та медицини [146].

У ССС NO і NOS виступають як нейромедіатори, вазодилататори, антиагреганти, є факторами гемостазу й нітрозативного гомеостазу, регулюють місцеву імунну відповідь та є універсальними регуляторами ЦНС і периферичних нервів і гангліїв. Кардіопротективна роль полягає в моделюванні скорочення кардіоміоцитів, стимулюванні кардіальної релаксації, регулюванні внутрішньоклітинного рівня кальцію [147]. Міокардіальні NOS регулюють серцеве скорочення як у базальному стані, так і в умовах класичного ізотропного впливу: механізм Франка-Старлінга, збірни сила-частотної характеристики та β -адренергічна стимуляція [148].

1.5.1 Нейрональна синтаза оксиду азоту (nNOS)

Однією з найважливіших ізоформ для ССС є нейрональна синтаза. Вона виступає в ролі основного ендогенного джерела міокардіального NO [149]. nNOS забезпечує швидку, ситуативну зміну рівня NO у відповідь на зовнішньо клітинні сигнали медіаторів, гормонів та біологічно активних речовин [150]. nNOS експресується в нейронах, епітеліоцитах, нейтрофілах, тромбоцитах, міоцитах, ендотеліоцитах та β -клітинах підшлункової залози [151].

Експресія nNOS регулюється геном *n-nos*, локалізованим у хромосомі 12q24.2-12q24.3. Ген складається з 4299 нуклеотидів, включаючи 1434 амінокислоти [152].

Ця ізоформа локалізується у саркоплазматичному ретикулумі, сарколемі та частково є цитозольним білком. Така локалізація та здатність до транслокації поблизу білків-мішеней є важливим компонентом її

компетентних ефектів, як протидія лімітованої області дифузії NO та його короткого періоду життя [151].

Кардіопротективна роль nNOS здійснюється кількома механізмами. Завдяки експресії nNOS у нервових закінченнях локальної провідної системи серця вона здійснює контроль за парасимпатичною та симпатичною регуляцією серцевого ритму, завдяки компартименталізації у кардіоміоцитах вона впливає на скоротливість та релаксацію [153].

У досліджах на мишах з гіперекспресією цієї ізоформи доведено, що nNOS не тільки локалізується в парасимпатичних волокнах серця, але й потенціює в них вивільнення ацетилхоліну до синаптичної щілини. Вона також знижує адренергічний вплив в ортосимпатичних волокнах. Слід також відмітити, що nNOS локалізується також і в гладкій мускулатурі коронарних артерій, за рахунок чого регулює базальний кровообіг [154].

Цікавим є той факт, що експресія nNOS збільшується в початковій стадії дії пошкоджуючого фактору на серцевий м'яз, що дозволяє їй не тільки виконувати кардіопротективну роль, а й виступати в ролі біомаркеру асимптоматичних пошкоджень, наприклад, при початкових проявах АГ, коли тиск на стінку ЛШ вже запускає механізми ремоделювання, а симптомів АГ у пацієнта ще нема. Доведеним також є вплив цієї ізоформи на АТ та баланс рідини через реалізацію центрального та периферичного механізмів, регулюючи симпатичний відділ та модуляцію вивільнення реніну в нирках [155]. Ці механізми, в свою чергу, впливають на спрямованість ремоделювання міокарда.

Не менш важливою є здатність nNOS регулювати саркоплазматичну кальцій-АТФазу, яка зворотно захоплює внутрішньоклітинний кальцій [156].

nNOS контролює активність конститутивних кардіальних оксидаз, таких як ксантиноксидоредуктаза (XOR) та НАДФ-оксидази, модулюючи рівні внутрішньоклітинного супероксиду та реактивних форм кисню, тим самим граючи роль в оксидативному гомеостазі [157].

Сьогодні вже доведено, що виникнення міокардіальної дисфункції супроводжується транслокацією nNOS з саркоплазматичного реткулуму до сарколеми. Це переміщення грає роль в патогенезі серцевої недостатності, сприяючи зниженню β -адренергічної реактивності [158]. Сама XOR може каталізувати продукцію NO шляхом відновлення нітратів. Але максимальна активність цього ферменту спостерігається в анаеробних умовах, що забезпечує кардіопротекцію при ішемічній хворобі серця та інфаркті міокарда [159].

Експеримент з моделювання інфаркту міокарда на nNOS-нокаутуваних (nNOS^{-/-}) і дикого типу мишах одного виводку також довів значне прискорення патологічного ремоделювання ЛШ із функціональними порушеннями в міокарді мишей з видаленим nNOS, що дає змогу припустити кардіопротективні особливості цієї ізоформи, спрямовані на підтримку міокарда, Ca^{2+} гомеостазу (регулюючи активність іонного каналу та Ca^{2+} -зв'язуючого протеїну) та β_2 -адренергічного резерву [160]. Така ж сама протективна роль доведена й при моделюванні ішемії-реперфузії, при якій висока експресія nNOS забезпечує посткондиційний захист [161].

Більшість дослідників дотримуються теорії, що ізольоване зниження оксидативного стресу за допомогою антиоксидантів є недостатньою мірою терапії ССЗ. Найбільш перспективним напрямом боротьби з оксидативним стресом є одночасне зменшення метаболітів супероксиду та збільшення продукції NO (нітрузо-редокс баланс), що виробляється nNOS. Так, фізичні навантаження ефективно змінюють нітрузо-редокс баланс, що може позитивно впливати на серце при серцевій недостатності [162]. Саме цей вплив може бути використаним при фізіологічному ремоделюванні як програма превентивних заходів серцево-судинних катастроф.

1.5.2 Індуцибельна синтаза оксиду азоту (iNOS)

На думку багатьох авторів, iNOS викликає синтез високих рівнів NO, які стимулюють T-клітинний ланцюг імунітету, мають цитотоксичний та кардіодепресивний ефект. Цікавим є те, що цей синтез є Ca^{2+} -незалежним [163]. Раніше вважалося, що фізіологічні потреби в NO задовольняють тільки nNOS та eNOS, тоді як iNOS активується тільки у відповідь на патогенний фактор. Але зараз доведена фізіологічна роль iNOS у регуляції серцево-судинного тонуусу [164]. При дослідженні особливостей локалізації iNOS було доведено, що вона експресується в кардіоміоцитах, ендотеліоцитах, міоцитах судин, макрофагах, нейтрофілах, гліальних клітинах та нейронах. Внутрішньоклітинно iNOS локалізована в пероксисомах, фагосомах, мембрані та ядрі клітин [165]. У кардіоміоцитах iNOS локалізована вздовж скоротливих волокон, у плазматичній мембрані, включаючи T-тубули, ядерну оболонку, мітохондрії і комплекс Гольджи. Така її компартменталізація дозволяє припустити участь iNOS-продукованого NO в регуляції енергетичних процесів та скоротливості міокарда [166].

Ген, що кодує iNOS, локалізований у 17-й хромосомі, в позиції 17q11.2-q12 та містить 26 екзонів. ДНК кодує протеїн молекулярною масою 130 кДа, який складається з 1153 амінокислот [167].

При патологічних станах ССС реєструється зростання активності iNOS та накопичення великої кількості NO. Все це призводить до міокардіальної дисфункції, яка посилюється ендотеліальною дисфункцією та нітритативним стресом. Також негативними ефектами iNOS є перевантаження клітин Ca^{2+} , проапоптотичні властивості, пригнічення активності антиоксидантних систем, дисбаланс судинного контролю та збільшення проникності судин [168].

Але на моделях «класичного ішемічного прекодиціонування міокарда» доведена кардіопротективна роль iNOS у пізній фазі адаптації міокарда до ішемічного пошкодження. Саме тому направлення iNOS-генної терапії вважається досить актуальним і важливим для пацієнтів з патологією

кардіоваскулярної системи. Вона забезпечує локальне збільшення рівнів NO без розвитку системної побічної дії, що спостерігається при введенні інгібіторів NO синтази або донорів NO [169].

1.5.3 Ендотеліальна синтаза оксиду азоту (eNOS)

eNOS відводиться головна роль в підтримці базисного рівня NO. Її асоціюють з реалізацією механізмів локальної ендотеліальної цитопротекції та підтриманні судинного гомеостазу. Зниження активності цієї ізоформи призводить до недостатності NO, що є ключовим у патогенезі ішемічної хвороби серця і цереброваскулярної патології [170]. Крім вазодилатації, NO, що продукується eNOS, являє собою потужний інгібітор агрегації і адгезії тромбоцитів до судинної стінки. Разом із захистом від тромбозу, ця ізоформа перешкоджає вивільненню тромбоцитарних факторів росту, які стимулюють проліферацію гладкої мускулатури судин. eNOS являється Ca^{2+} -залежною, конститутивною ізоформою, яка має здатність впливати на функції міокарда, незалежно від коронарного кровообігу [171].

Внутрішньоклітинно eNOS переважно локалізується в кавеолах, разом з β -рецепторами, та кальцієвих каналах L-типу і, виступаючи в ролі медіатора механічного стресу, стимулює вивільнення внутрішньоклітинного Ca^{2+} від ріанодинових рецепторів. Ця ізоформа експресується в епітеліоцитах, кардіоміоцитах, міоцитах судин, клітинах глії, нейронах, епітеліоцитах, макрофагах та нейтрофілах. Субклітинно eNOS локалізована в мітохондріях, ядрі клітини, апараті Гольджі та мембрані клітини в області маленьких інвагінацій, які містять трансмембранний кавеолін [172].

Ген *eNOS* знаходиться в хромосомі 7q35-7q36 і містить 26 екзонів. Його матрічна РНК кодується 4052 нуклеотидами [173].

Цікавим є залежність експресії eNOS від надлишкової кількості H_2O_2 . Пероксид водню – дисмутаційний продукт кисню, збільшує експресію eNOS через транскрипційний та посттранскрипційний механізми, перетворюючи

eNOS з NO-продукуючого фермента в ензим, що генерує O_2 , це призводить до реалізації негативного ефекту NO та розвитку нітрозативного й оксидативного стресу. Цей процес має назву роз'єднування активності NOS [174].

Доведено, що eNOS потенціює постсинаптичний ефект ацетилхоліну, тобто посилює вагусні ефекти в кардіоміоцитах. Також ця ізоформа посилює «акцентований антагонізм», опосередкований ацетилхоліном у катехоламін-предстимульованому серці, що було доведено на мишах з гіперекспресією eNOS. Таке потенціювання координує підсилення пресинаптичних ефектів nNOS. Результатом такої співпраці є підтримка оптимального симпатовагального балансу для регулювання кардіальної функції на пре- і постсинаптичних рівнях [148].

В експерименті на щурах з використанням підсилювача eNOS «AVE9488» було доведено суттєве покращення постінфарктного ремоделювання ЛШ, покращення його функціональних та молекулярних характеристик із зменшенням проявів ендотеліальної дисфункції [175]. Вивчення механізмів eNOS залежної сигналізації NO в патогенезі ендотеліальної та міокардальної дисфункції є перспективним направленням у медичній науці.

Аналізуючи численні літературні джерела стосовно проблеми ремоделювання міокарда при фізіологічних та патологічних впливах, були виявлені деякі закономірності. В роботах було доведено, що ССС реагує на гострі та хронічні стреси розвитком ремоделювання міокарда. Одним з перших відділів, що реагує, є міокард ЛШ. Багато з авторів доповідають про різницю між ФРМ і ПРМ, але інформації щодо моменту переходу одного виду в інший небагато. Іншим малодослідженим виявилось питання морфоструктурних типів ремоделювання з переважанням одного чи іншого компонента у відповідь на коротко- або довготривалі впливи, різні за етіологією та ступенем вираженості. Більше того, не багато авторів використовують системний підхід у вивченні ремоделювання, обмежуючись використанням одного методу або конкретного маркера.

Необхідно відмітити, що більшість дослідників використовують лише одну модель ремоделювання, частіше за все, з короткотривалим впливом. Тоді як моделі з довготривалими строками чи поєднаннями декількох етіологічних факторів залишаються недостатньо вивченими. Недостатньо інформації щодо порівняльних моделей із різним ступенем інтенсивності стрес-фактору.

Потребує ретельного дослідження і описання система NO в ССС. Незважаючи на той факт, що її вивчають вже багато років через доведені кардіопротективні властивості, з'явилися факти її прооксидантних ефектів та участь у нітрузо-оксидативному стресі, що призведе до погіршення функціонування міокарда, особливо у пацієнтів з АГ. Але жодне з наведених в огляді досліджень не висвітлює комплексний підхід до діагностики статусу системи NO в міокарді, а саме: визначення експресії ізоформ NOS методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та імунофлюоресцентними методами із визначенням NO-кінцевих метаболітів як стабільних (нітрити), так і показників оксидативного стресу (нітротирозин).

Таким чином, проводячи науковий пошук, нами було сформовано системний та комплексний методичний підхід не тільки до вивчення ролі системи NO в ремоделюванні, що розвивається у відповідь на експериментальну гіпоксію різних строків та АГ різних походжень, але й для виявлення особливостей видів і типів ремоделювання, що покращить імуногістохімічну панель, яка використовується в практичній медицині.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено на базі лабораторії експериментальної патофізіології (ліцензія 2СК2 УМК2 Т6РВ SG5N SJLS4) навчального медико-лабораторного центру Запорізького державного медичного університету (свідоцтво про технічну компетентність № 033/18 від 25.12.2018, чинне до 25.12.2023).

Для встановлення ролі системи NO в ремоделюванні міокарда ЛШ при фізіологічних впливах та експериментальних патологічних станах було проведено комплексне дослідження, що включало патофізіологічний, інструментальний, масометричний, морфо-денситометричний, імунофлюоресцентний, біохімічний, імуноферментний та молекулярно-генетичний методи із статистичним аналізом отриманих результатів.

2.1 Матеріал дослідження

Використані в експерименті тварини були отримані з віварію Об'єднання ветеринарної медицини ПП «Біомодельсервіс» міста Києва. Всі дослідження були проведені в осінньо-зимовий період у віварії Запорізького державного медичного університету. Тварини знаходилися в приміщенні при температурі повітря +20-25 °С із вільним доступом до їжі та води.

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), «Положенням про використання тварин в біомедичних дослідженнях» та з директивою Ради 2010 / 63EU Європейського парламенту і Ради від 22 вересня

2010 року по захисту тварин, які використовуються для наукових цілей [176,177].

Протокол дослідження погоджено з локальним етичним комітетом (№ 11 від 29.10.2020 р.), порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено.

Усі прилади, які використовувались для дослідження, сертифіковані та проходять щорічну метрологічну експертизу (протокол № 366 від 26.10.2020 р.).

Об'єктом дослідження в експериментальних щурів була плазма крові та фрагменти верхівок сердець.

2.1.1 Дизайн дослідження

Для відтворення ремоделювання міокарда ЛШ були використані 58 нормотензивних щурів (самців) лінії Wistar масою 185-300 г. та 10 щурів (самців) лінії SHR, віком 6-10 місяців, масою $267,9 \pm 10,4$ г. Піддослідні тварини були розподілені на 5 експериментальних груп (рис. 2.1).

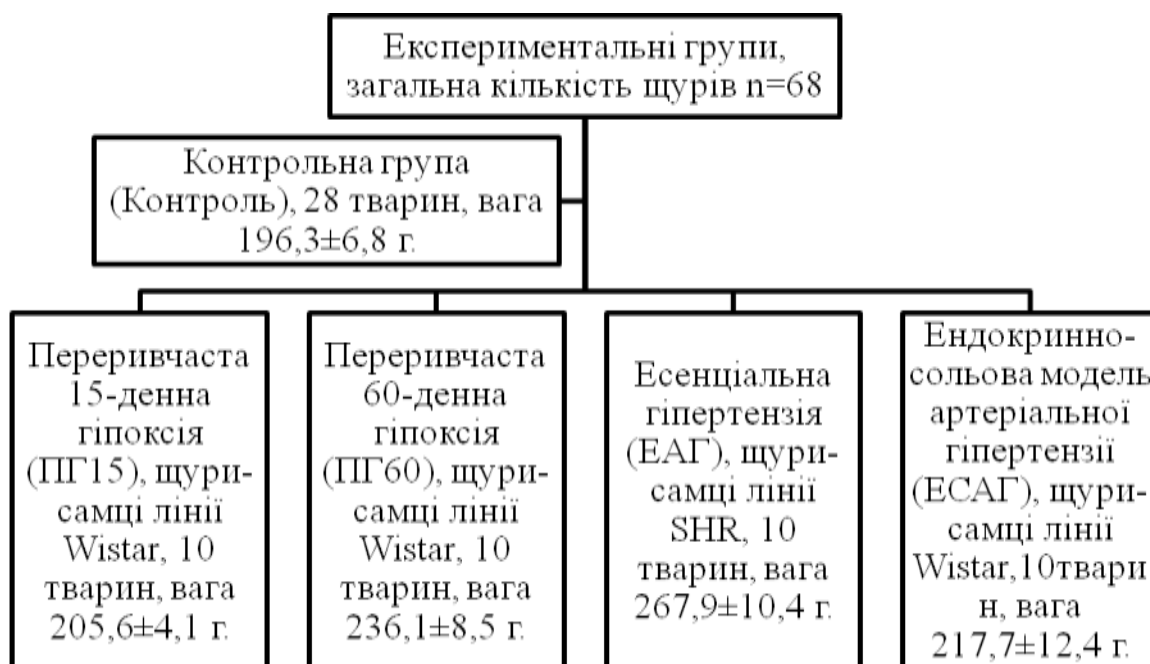


Рисунок 2.1 – Дизайн дослідження, розподіл тварин по групах

Першу контрольну групу (Контроль) склали 28 нормотензивних інтактних щурів-самців лінії Wistar, віком 6-7 місяців, маса на початку експерименту $196,3 \pm 6,8$ г., яких виводили з експерименту по 7 тварин з кожної експериментальної групи. Порівняльний аналіз усіх отриманих параметрів, що досліджувалися, показав відсутність достовірних розбіжностей, тому цифрові дані були представлені одною групою контролю.

Другу (ПГ15) групу склали 10 щурів-самців лінії Wistar, віком 6-7 місяців, маса тіла на початку експерименту $187,2 \pm 6,3$ г., які піддавалися гіпоксичній гіпоксії протягом 15 діб для моделювання короткотривалого фізіологічного впливу на ССС.

Третю (ПГ60) групу склали 10 щурів-самців лінії Wistar, віком 6-7 місяців, маса тіла на початку експерименту $270 \pm 8,9$ г. які піддавалися гіпоксичній гіпоксії протягом 60 діб, для моделювання довготривалого фізіологічного впливу на ССС.

Четверту групу (ЕАГ) склали 10 щурів-самців лінії SHR, віком 6-7 місяців, маса тіла в день виведення з експерименту $267,9 \pm 10,4$ г., як еквівалентна модель есенціальної АГ людини, для дослідження довготривалого патологічного впливу на ССС експериментальної патології - АГ.

П'яту групу (ЕСАГ) склали 10 щурів-самців лінії Wistar, віком 6-7 місяців, середня маса тіла щурів на початку експерименту $260 \pm 15,7$ г. із змодельованою ендокринно-сольовою АГ, яка відповідає вторинній ендокринній АГ людини, для дослідження довготривалого патологічного впливу на ССС експериментальної патології - АГ.

2.1.2 Експериментальні моделі

2.1.2.1 Методика переривчатих гіпоксичних тренувань різної тривалості

Для моделювання фізіологічних впливів на ССС різної тривалості щурам експериментальних груп проводили гіпоксичні тренування, які здійснювали у вентиляваній барокамері об'ємом $0,5 \text{ м}^3$ на «висоті» 6000 м ($\text{O}_2=9,8 \%$) за допомогою моделі, яка широко використовується в дослідженнях кафедри патологічної фізіології ЗДМУ МОЗ України. Тварини щодня в один і той же час доби (з 10 до 16 години) поміщувалися в барокамеру (рис. 2.2).



Рисунок 2.2 – Герметична барокамера для відтворення гіпобаричної гіпоксичної гіпоксії

Режим гіпоксичних тренувань виконувався за схемою: 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 по 6 км. Гіпоксичні тренування на висоті 6 км проводилися протягом 10 днів для 15-денної моделі та 55 - для 60-денної моделі. «Висота підйому» в барокамері реєструвалася за допомогою альтиметра [178].

2.1.2.2 Генетично детермінована модель первинної артеріальної гіпертензії

Полігенна модель спонтанної есенціальної АГ SHR (spontaneously hypertensive rat) була отримана селективним інбридингом за гіпертензивною ознакою дослідниками Okamoto и Aoki (1963). Ця модель надає багато можливостей для вивчення АГ та пов'язаною з нею патологією [179]. У щурів SHR без будь-яких втручань починає підвищуватися АТ, досягаючи 180-200 мм. рт. ст вже у віці 6 місяців. Згодом з'являються гіперглікемія, гіперінсулінемія з інсулінорезистентністю тканин, гіпертригліцерідемія, що дозволяє вивчати не тільки генетику АГ, але й зміни в метаболізмі тканин, особливо органів-мішеней [180]. Завдяки ранньому розвитку АГ та метаболічних змін, у цих щурів дуже швидко формується ПРМ ЛШ, що має свої патогномонічні особливості [181].

2.1.2.3 Ендокринно-сольова модель вторинної артеріальної гіпертензії

Для виявлення етіопатогенетичних особливостей ПРМ ЛШ при АГ, яка, як відомо, має різні типи, що залежать від провідних етіологічних чинників, була обрана друга модель АГ – ендокринно-сольова (аналог вторинної, ендокринно-асоційованої АГ людини) [182]. Така модель включає цілий комплекс змін та характеризується розвитком гіперкортицизму, гіперальдостеронізму, гіпернатріємії, зрушенням циркадіанного ритму вироблення гормонів, що призводить до збільшення ОЦК, периферичного опору судин, ендотеліальної дисфункції та формування стійкого підвищення АТ з характерним ПРМ [129].

Для відтворення моделі, нормотензивним щурам лінії Wistar інтраперітонеально вводили преднізолон із розрахунку 6 мк / кг протягом 30

діб в один і той же час доби, о 7 годині в дозі 2 мг / кг та о 20 годині в дозі 4 мг / кг. з паралельним примусовим випоюванням 5 мл 2,3 % розчином NaCl замість води. Введення преднізолону з випоюванням розчином призводило до стійкого підвищення АТ, що було зафіксовано вже на 3 день, який становив Рс/Рд: $135,7 \pm 1,79$ / $90,5 \pm 3,6$ мм рт.ст.

2.2 Методи дослідження

У всіх експериментальних групах щурів було проведено комплексне дослідження з використанням інструментального, масометричного, морфоденситометричного, імунофлюоресцентного, біохімічного, імуноферментного та молекулярно-генетичного методів із подальшим статистичним аналізом отриманих результатів.

Після комплектації груп та проведення комплексу попередніх досліджень, що включав зважування щурів і вимірювання АТ, тварин розміщували в клітки по 3-4 тварини. За добу перед виведенням щурів з експерименту, термін якого залежав від особливості моделі, тварин зважували та вимірювали АТ. В останній день експерименту тварин з 18-00 позбавляли їжі та наступного дня з 8-00 виводили з експерименту методом одномоментної декапітації під наркозом (тіопентал натрію 40 мг / кг внутрішньочеревно).

Після декапітації кров щурів негайно відбирали в пробірки з 2,7 % ЕДТА в 0,9 % розчині NaCl, які попередньо були розміщені на льоді. Після забору крові вміст ретельно перемішували. Для поділу плазми і формених елементів зразки крові центрифугували при 3000 об / хв на центрифугі СМ-6МТ (ELMI ltd.) протягом 15 хв. Плазму обережно відбирали в сухі пластикові пробірки, заморожували при -50°C та ліофілізували на апараті (Operating Manual Freeze Dryer ALPHA 1-2 LD plus) (рис. 2.2.2).

Фрагменти верхівок сердець щурів розділялися на 2 шматочки. Один відразу після забирання фіксували в розчині Буена на 1 добу. Після 2-годинного відмивання пікринової кислоти в проточній холодній воді серця

проводили 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 ($t=+37\text{ }^{\circ}\text{C}$), на 1 годину поміщали в рідкий парапласт (MkCormick, США) ($t=+56\text{ }^{\circ}\text{C}$). У кінці фіксували в парапластні блоки.

Другий фрагмент ЛШ серця масою 500 мг гомогенізували в сольовому ізотонічному середовищі 0,15 М розчину КСІ при $t = +4\text{ }^{\circ}\text{C}$ за допомогою гомогенізатора Silent Crusher S (Heidolph, Німеччина) в співвідношенні тканина/сольовий розчин 1:40. Після цього методом диференціального центрифугування при 15000g на центрифугі Sigma Laborzentrifugen D-37520 (ser. № 141672, Німеччина) виділялася цитозольна фракція, яку негайно обережно відбирали в сухі пластикові пробірки.

2.2.1 Методика вимірювання артеріального тиску

Всім щурам вимірювали систолічний та діастолічний АТ за допомогою системи неінвазивної реєстрації АТ Blood Pressure Analysis Systems ТМ ВР-2000 Series II (Visitech Systems, USA) (рис. 2.3).



Рисунок 2.3 – Система неінвазивної реєстрації артеріального тиску ВР-2000

Для отримання точних показників вимірювань АТ, щури проходили двотижневу адаптацію до іммобілізаційних світлозахисаючих тунелів, що розташовані на поверхні, що підігривається (+37 °С). Вимірювання проводилося за допомогою хвостової манжети в умовах повної тиші. Такий підхід дозволяє проводити точні багаторазові вимірювання без вірогідного впливу на показники тиску через стрес тварини.

Перший вимір АТ проводили на етапі формування груп, а надалі в залежності від потреб експерименту. У щурів з переривчастою гіпоксією групи ПГ-15 на 1-у, 7-у та 15-у доби; групи ПГ-60 на 1-у, 30-у та 60-у доби; у щурів з ендокринно-сольовою та есенціальною гіпертензією на 1-у, 5-у, 10-у, 15-у, 21-у і 30-у доби експерименту.

Після серій вимірювань АТ (не менше 7-10 реєстрацій з інтервалом 1,5-2 хв.) було розраховано показник середнього АТ (сАТ). Він розраховувався в автоматичному режимі згідно з програмним забезпеченнями від виробника за формулою:

$$\text{сАТ} = (2 (P_d) + (P_c)) / 3 \quad (2.1),$$

де сАТ – середній артеріальний тиск, мм рт.ст.;

P_d – діастолічний артеріальний тиск, мм рт.ст.;

P_c – систолічний артеріальний тиск, мм рт.ст.

2.2.2 Масометричний метод дослідження сердець щурів експериментальних груп

Масометричне дослідження включало визначення питомої маси серця та його часткової маси від маси тварини. Для цього перед виведенням з експерименту щурів зважували, а після декапітації проводили вимірювання маси серця.

Для вимірювання питомої маси (щільності, ρ) використовували пробірку з градацією, в яку попередньо наливали фізіологічний розчин, та після занурення серця записували об'єм рідини, що витіснився. Далі питому масу

розраховували за формулою:

$$\rho = m (\text{серця}) / \Delta V \quad (2.2),$$

$$\Delta V = V_2 - V_1, \quad (2.3),$$

де ρ – питома маса серця, г/см³;

m – маса серця, г

V_2 – об'єм після занурення органу, см³;

V_1 – стартовий об'єм фізіологічного розчину в пробірці, см³;

ΔV – об'єм витісненого фізіологічного розчину в пробірці, см³.

Розрахунок відсотку частки маси серця (ЧМС) від маси щурів здійснювався за формулою:

$$\text{ЧМС} = (m_2 * 100) / m_1 \quad (2.4),$$

де ЧМС – відсоткова частка маси серця від маси тварини, %;

m_1 – маса щура, г;

m_2 – маса серця щура, г.

2.2.3 Методика морфо-денситометричного дослідження міокарда в щурів експериментальних груп

Після попередньої гістологічної підготовки верхівок сердець (див. п.п. 2.2) зрізи протягом 48 годин забарвлювали галоціанін-хромовими галунами за Ейнарсоном. Цей метод фарбування на нуклеїнові кислоти дозволяє кількісно визначити їхній вміст у клітині. Після цього три рази промивали по 5 хв. в дистильованій воді, та проводили дегідратацію у висхідних спиртах і двічі в ксилолі. Після чого препарати покривали синтетичною сумішшю EUKITT (Balsamo, Німеччина), покривним склом, та під тиском 5 г гирьки залишали на 1 добу. Результат забарвлення зрізу міокарда ЛШ щура представлено на рисунку 2.4.

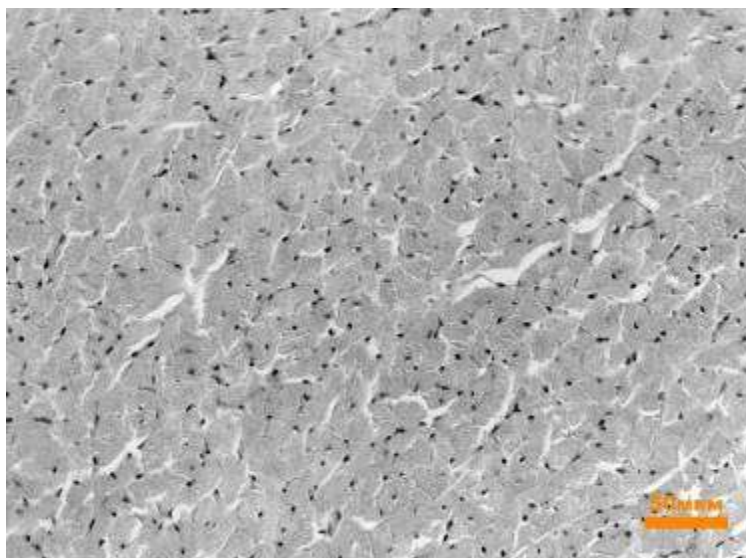


Рисунок 2.4 – Міокард лівого шлуночка щура контрольної групи. Забарвлення галоціанін-хромовими галунами за Ейнарсеном. Зб. 200x

Морфо-денситометричний аналіз забарвлених препаратів проводили на мікроскопі AxioImager-M2 («Carl Zeiss», Німечинна). Зображення міокарда, отриманого за допомогою високочутливої відеокамери AxioCam-ERc 5s («Carl Zeiss», Німечинна), записувались у вигляді комп'ютерного файлу за допомогою програмного забезпечення AxioVision 40 V 4.8.2.0 (№ ліцензії 3005339).

Далі ці файли аналізувались в автоматичному режимі за допомогою програмного забезпечення з відкритим кодом ImageJ («National Institutes of Health», США) (рис. 2.5).

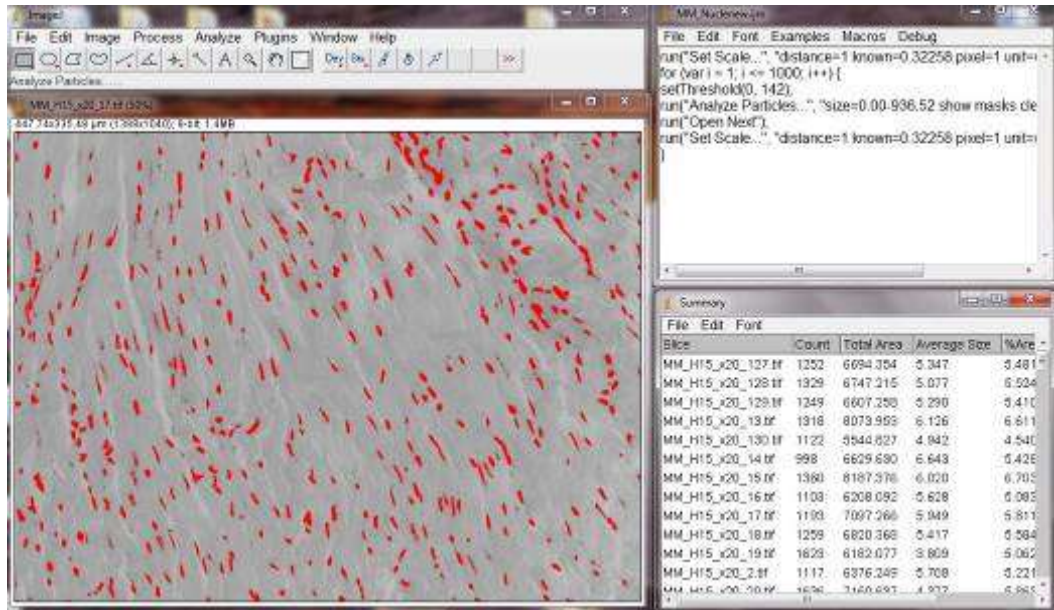


Рисунок 2.5 – Процес аналізу ядер кардіоміоцитів у ImageJ

В інтерактивному режимі на фотофайлі за допомогою програмно заданого скейлінгу, що перераховує пікселі в мкм, визначали параметри ідентифікації ядер, цитоплазми та фону, після чого формувався макрос для автоматичного вимірювання цільових параметрів (градації сірого від 0 до 250 рX). Аналізували не менше 100 полів зору в кожній серії. Площа кадру складала 150207,815 рX, або 465645,158 мкм².

Далі розраховувались цільові показники в табличному процесорі «Excel».

В результаті аналізу визначили наступні показники:

- кількість ядер у площі кадру (465645,158 мкм²) – автоматично розраховувалась програмою;
- розмір (середній лінійний розмір ширини та довжини) ядра кардіоміоциту (мкм) – автоматично розраховувалась програмою;
- площа всіх ядер кардіоміоцитів у кадрі ($S_{я}$, мкм²) – автоматично розраховувалась програмою;
- площа цитоплазми ($S_{ц}$, мкм²) всіх кардіоміоцитів у кадрі, яка розраховувалась за формулою:

$$S_{ц} = S_{з} - S_{ф} \quad (2.5),$$

де $S_{ц}$ – площа цитоплазми кардіоміоцитів у кадрі, мкм^2 ;

$S_з$ – загальна площа кадру, мкм^2 ;

S_{ϕ} – площа «фону», мкм^2 .

• щільність ядер кардіоміоцитів / мкм^2 (ЩЯ) до цитоплазми, яка розраховувалась за формулою:

$$\text{ЩЯ} = (S_{я} + S_{ц}) / S_{я} \quad (2.6),$$

де $S_{ц}$ – площа цитоплазми кардіоміоцитів у кадрі, мкм^2 ;

$S_{я}$ – площа всіх ядер кардіоміоцитів у кадрі, мкм^2 .

• вміст нуклеїнових кислот в ядрах кардіоміоцитів (*Integrated density, ID*) у кадрі – оптична щільність, що вимірювалася в умовних одиницях оптичної густини ($\text{уОД}_{\text{ог}} / \text{мкм}^2$), розраховувався за формулою:

$$\text{ID} = U_{\text{OD}} \times S_{я} \quad (2.7),$$

де U_{OD} – некалібрована оптична щільність, $\text{уОД}_{\text{ог}}$;

$S_{я}$ – площа всіх ядер кардіоміоцитів у кадрі, мкм^2 .

У свою чергу U_{OD} розраховувалася за наступною формулою:

$$U_{\text{OD}} = \log_{10}(255 / \text{MGV}) \quad (2.8),$$

де MGV (Mean Gray Value) – показник, що відображає середнє значення градацій сірого в межах зони «інтересу». Являє собою суму значень градацій сірого всіх пікселів у цій зоні, поділеної на загальну кількість пікселів.

• концентрацію нуклеїнових кислот в ядрі ($C_{я}$), що відображає функціональну активність кардіоміоцитів ($\text{уОД}_{\text{ог}}$), розраховували за формулою:

$$C_{я} = \text{ID} / S_{я} \quad (2.9),$$

де ID – вміст нуклеїнових кислот в ядрі, $\text{уОД}_{\text{ог}} / \text{мкм}^2$;

$S_{я}$ – загальна площа ядер у кадрі, мкм^2 .

• концентрацію нуклеїнових кислот у цитоплазмі ($C_{ц}$), що відображає функціональну активність кардіоміоцитів ($\text{уОД}_{\text{ог}}$), розраховували за формулою:

$$C_{ц} = \log_{10} (\text{MGV} (\text{фону}) / \text{MGV} (\text{ядра+цитоплазми})), \quad (2.10),$$

де $\text{MGV} (\text{фону})$ – середнє значення градацій сірого в межах фону, $\text{уОД}_{\text{ог}}$;

MGV (ядра+цитоплазми) – середнє значення градацій сірого в межах ядра разом із цитоплазмою, $uO_{D_{gr}}$.

2.2.4 Методика імунофлюоресцентного дослідження міокарда лівого шлуночка експериментальних щурів

Протокол імунофлюоресцентного дослідження для визначення pNOS, eNOS та маркерів ремоделювання міокарда включав декілька етапів.

Після стандартної гістохімічної обробки верхівок сердець, виготовлені 5 мкм зрізи депарафінізували за стандартною методикою (див. п.п. 2.2). Далі зрізи протягом 1 доби інкубували при $t=+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ з первинними антитілами («Santa Cruz biotechnology, Inc», США) в розведенні 1:200. Після відмивання надлишку первинних антитіл у 0,1 М фосфатному буфері (pH=7,2), зрізи інкубували 45 хв. у вологій камері ($t=+37\text{ }^{\circ}\text{C}$) з вторинними антитілами («Santa Cruz biotechnology, Inc», США), кон'югованими з FITC у розведенні 1:200. Після промивання фіксували в суміші «гліцерин/фосфатний буфер» (9:1).

Для дослідження iNOS, після депарафінізації протягом 1 доби ($t=+4\text{ }^{\circ}\text{C}$) інкубували з мишачими моноклональними антитілами NOS2 (C-11): sc-7271 кон'югованими з FITC («Santa Cruz biotechnology, Inc», США) в розведенні 1:200. Після промивання фіксували в суміші «гліцерин/фосфатний буфер» (9:1). Усі використані антитіла наведені в таблиці 2.2.4.

Таблиця 2.1 – Антитіла, що були використанні для імунофлюоресцентного дослідження

| Об'єкт дослідження | Первинні антитіла | Вторинні антитіла |
|--------------------|--|---|
| 1 | 2 | 3 |
| pNOS | кролячі поліклональні антитіла NOS1 (R-20): sc-648 | мишачі антитіла до IgG кроля, кон'юговані з FITC: sc-2359 |

| продовження таблиці 2.1 | | |
|-------------------------|--|---|
| 1 | 2 | 3 |
| iNOS | мишачі моноклональні антитіла NOS2 (C-11): sc-7271 кон'юговані з FITC | |
| eNOS | кролячі поліклональні антитіла NOS3 (C-20): sc-654 | мишачі антитіла до IgG кроля, кон'юговані з FITC: sc-2359 |
| тайтин | мишачі моноклональні антитіла Titin (E-2): sc-271946 | мишачі антитіла до IgG кроля, кон'юговані з FITC: sc-2359 |
| колаген I типу | козячі поліклональні антитіла COL1A1 (C-18): sc-8784 | мишачі антитіла до IgG кози, кон'юговані з FITC: sc-2356 |
| кардіотрофін-1 | козячі поліклональні антитіла Cardiostrophin-1 (N-20): sc-20867 | мишачі антитіла до IgG кози, кон'юговані з FITC: sc-2356 |
| анексин V | козячі поліклональні антитіла Annexin V (R-20): sc-1929 | мишачі антитіла до IgG кози, кон'юговані з FITC: sc-2356 |

Враховуючи той важливий факт, що на верхівці серця розташування (напрямо) м'язових волокон різноспрямоване, та на зрізах частіше отримуємо або поперечну, або повздовжню орієнтацію кардіоміоцитів, дослідження характеру експресії проводилося окремо в кардіоміоцитах із поперечною та повздовжньою локалізацією.

У зрізах за допомогою світлофільтра 38HE з високою емісією («Carl Zeiss», Німеччина) проводилося дослідження на мікроскопі AxioImager-M2 («Carl Zeiss», Німеччина) (рис.2.6).

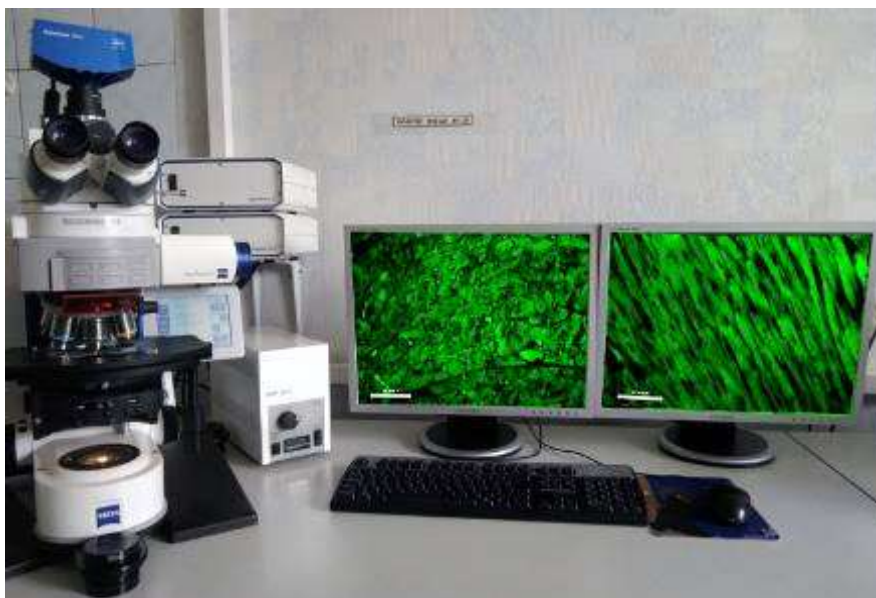


Рисунок 2.6 – Мікроскоп AxioImager-M2

Аналіз зображення, отриманого за допомогою високочутливої відеокамери AxioCam-ERc 5s («Carl Zeiss», Німеччина), проводили в програмному забезпеченні з відкритим кодом ImageJ («National Institutes of Health», США). При цьому виключався ефект "вигорання" препарату під впливом тривалого ультрафіолетового опромінення.

В автоматичному режимі визначалися зони зі статистично значимою флюоресценцією з подальшим розрахунком наступних параметрів:

- вміст імунореактивного матеріалу ($OD_{i\phi}$), яким вважався показник *corrected total cell fluorescence, CTCF*), розраховувався за формулою:

$$CTCF = (ID - (S * (M - SD))) / 1000 \quad (2.11),$$

де ID - показник інтегрованої щільності;

S - площа зони «інтересу», мкм^2 ;

M (Median) – середнє значення пікселів у зоні «інтересу», $OD_{i\phi}$.

SD – стандартне відхилення (*Standard deviation*) значень сірого, що розраховувалися в зоні «інтересу».

- концентрація (C) імунореактивного матеріалу (IPM), ($OD_{i\phi}/\text{мкм}^2$) розраховувалася за наступною формулою:

$$C = CTCF / S \quad (2.12),$$

де CTCF (corrected total cell fluorescence) – вміст IPM, $O_{d_{if}}$;

S – площа зони «інтересу», μm^2 .

Аналізували не менше 100 полів зору в кожній серії.

2.2.5 Метод молекулярно-генетичного дослідження експресії мРНК до ізоформ синтази оксиду азоту в гомогенатах міокарда лівого шлуночка щурів

Для аналізу експресії генів використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ПЛР-РЧ). Об'єктом дослідження були верхівки сердець, які були залиті в парапластові блоки після стандартної гістологічної підготовки (див. п.п. 2.2.) (рис. 2.7).



Рисунок 2.7 – Лабораторія молекулярно-генетичних досліджень навчального медико-лабораторного центру ЗДМУ

Молекулярно-генетичне дослідження включало декілька етапів:

1. Депарафінізація зразків, попередньо фіксованих у розчині Буена та залитих у парапласт

1.1 Гомогенізація зразка, видаленого з парапластового блоку, з 1 мл 100 % ксилолу за допомогою ступки і товкачика з подальшим переміщенням

гомогенату в пробірку типу «Eppendorf» («Ахуген», США) та інкубування протягом 5 хв. Перемішання на вортексі і короткочасне (протягом 1 хв) центрифугування для осадження тканини. Наступне видалення ксилолу, не порушуючи осаду.

1.2 Далі додавали 1 мл 100 % ксилолу і інкубували протягом 5 хв. Перемішували на вортексі та нагрівали зразок протягом 3 хв при $t = +50\text{ }^{\circ}\text{C}$, щоб розплавити парапласт. Після цього, зразок центрифугували протягом 2 хв при кімнатній температурі на максимальній швидкості для осадження тканини. Далі видаляли ксилол, не порушуючи осаду.

1.3 Далі до зразків додавали 1 мл 100 % етанолу, перемішували за допомогою вортекса протягом 5 хв. Після цього центрифугували 2 хв на максимальній швидкості для осадження тканини. Етанол містив слідові залишки ксилолу, саме тому його акуратно видалили не порушуючи осаду.

1.4 Після цього додавали 1 мл 96 % етанолу на зразок, інкубували протягом 5 хв, перемішували на вортексі. Центрифугували зразок впродовж 2 хв на максимальній швидкості (14000-16000 об / хв) для осадження тканини. Акуратно видаляли супернатант не порушуючи осаду.

1.5 Далі додавали 1 мл 70 % етанолу на зразок та інкубують протягом 5 хв, перемішували на вортексі, центрифугували зразок протягом 1-2 хв на максимальній швидкості (14000-16000 об / хв) для осадження тканини. Акуратно видаляли супернатант не порушуючи осаду. Висушували на повітрі осад протягом 15-30 хв з метою видалення залишку етанолу.

2. Виділення тотальної РНК

Виділення тотальної РНК з тканини щурів проводили з використанням набору «Trizol RNA Prep 100» («ИЗОГЕН», Росія), який містить наступні реагенти: Trizol reagent та ExtraGene E. РНК виділяли відповідно до протоколу набору з виконанням наступних етапів:

2.1 У пробірки загальним об'ємом 1,5 мл вносили по 100 мкл подрібненої тканини, що досліджували, додавали 1 мл Trizol reagent та

інтенсивно перемішували вміст до утворення гомогенної емульсії. Інкубували пробірки при $t = +4$ °C протягом 5 хв.

2.2 Додавали в пробірки 200 мкл хлороформу та інтенсивно перемішували вміст пробірок. Пробірки інкубували при $t = +4$ °C протягом 5 хв.

2.3 Центрифугували («СМ-50», Латвія) пробірки з сумішшю 5 хв при 14000 об/хв для розділення фаз. Прозору верхню фазу з РНК обережно переносили в стерильну пробірку загальним об'ємом 1,5 мл, намагаючись не зруйнувати пограничну між фазами білу плівку з ДНК та білками.

2.4 Додавали у пробірки рівний об'єм ізопропанолу, приблизно 600 мкл.

2.5 Інтенсивно перемішували вміст пробірок та переносили пробірки в морозильну камеру («LG», Корея) при $t = -20$ °C на 30 хв.

2.6 Центрифугували пробірки з сумішшю 15 хв при 14000 об / хв. Повністю видаляли супернатант перевертанням пробірки. Видалення супернатанту відсмоктуванням пов'язано з ризиком втратити осад РНК.

2.7 Додавали в пробірку 1 мл холодного 75 % етилового спирту, перемішували вміст пробірки перевертанням 4-5 разів, центрифугували пробірки з сумішшю 5 хв при 14000 об / хв та обережно видаляли супернатант перевертанням пробірки.

2.8 Просушували осад при $t = +65$ °C протягом 3 хв.

2.9 Додавали в пробірки 50-100 мкл реагенту ExtraGene E.

2.10 Суспендували вміст на вортексі 15-20 сек та залишали при кімнатній температурі на 15-20 хв. Потім ще раз суспендували вміст пробірок на вортексі.

3. Зворотна транскрипція (виділення кДНК)

Для зворотної транскрипції (синтез кДНК) використовували «Набор реагентів для проведення обратной транскрипции (ОТ-1)» («СИНТОЛ», Москва). Підготовку та проведення реакції проводили відповідно до протоколу набору за послідовністю:

3.1 Готували наступну реакційну суміш в пробірці на льоду:

- тотальна РНК (2 мкл);
- Random-6 праймер (1 мкл);
- деіонізована вода, очищена від нуклеаз (11 мкл).

Загальний об'єм — 14 мкл. Обережно перемішували.

3.2 В пробірку додавали наступні компоненти в зазначеному порядку:

- реакційна суміш 2,5x (10 мкл);
- зворотня транскриптаза MMLV-RT (1 мкл).

Загальний об'єм — 25 мкл. Обережно перемішували та центрифугували.

3.3 Інкубували суміш при $t = +45\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 45 хв.

3.4 Зупинили реакцію прогріванням при $t = +92\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 5 хв. Потім переносили пробірки на лід.

4. Полімеразно-ланцюгова реакція в режимі реального часу

Для визначення рівня експресії досліджуваних генів використовували ампліфікатор CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) та набір реактивів для проведення ПЛР-РЧ у присутності SYBR Green R-402 («Синтол», Росія).

Фінальна реакційна суміш для ампліфікації включала:

- барвник SYBR Green, ДНК – полімераза SynTaq з інгібуючими активність ферменту антитілами,
- по 0,2 мкл прямого та зворотного специфічних праймерів, dNTP-дезоксінуклеозидтрифосфати,
- 1 мкл матриці (кДНК).

Реакційну суміш доводили до загального об'єму 25 мкл додаванням деіонізованої H_2O . Специфічні пари праймерів (5'-3') для аналізу досліджуваних і референтного генів були підібрані за допомогою програмного забезпечення «PrimerBlast» (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast), виготовлені фірмою «ThermoScientific» («Thermo Fisher Scientific Inc», США) (табл.2.2).

Ампліфікація відбувалася за таких умов:

- ініціююча денатурація $+95\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 10 хв; далі 50 циклів:

- денатурація – +95° С, 15 сек,
- віджиг праймерів – +58-63 °С, 30 сек,
- елонгація – +72 °С, 30 сек.

Реєстрація інтенсивності флуоресценції відбувалася автоматично наприкінці стадії елонгації кожного циклу по каналу SybrGreen.

В якості референс-гену для визначення відносного значення зміни рівня експресії досліджуваних генів був використаний ген *actin, beta (Actb)*. Для вираження відносного рівня експресії генів використовували порівняльний $\Delta\Delta C_t$ метод ($\Delta\Delta C_t$ метод). Статистичний аналіз даних ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення «CFX Manager™» («Bio-Rad», США). В експеримент були включені негативні контролю: без додавання кДНК матриці в реакцію ПЛР, без додавання мРНК матриці в синтезі кДНК, без додавання ферменту в синтезі кДНК. Усі реакції ампліфікації виконували на індивідуальних зразках у трьох повторах.

Таблиця 2.2 – Специфічні праймери, що були використані в дослідженні експресії мРНК до ізоформ синтази оксиду азоту методом ПЛР-РЧ

| Ген | Нуклеотидна послідовність праймера | $T_{пл}$, °С | Довжина продукту ПЛР, п. н. | Екзон-екзонний стик |
|--------------------------|--|----------------|-----------------------------|---------------------|
| nNOS | F=GACGCAGATGAGGTTTTTCAGC R=GGGGGCAGGAGGATCCAG | 59,87 61,17 | 45 | 4477/4478 |
| iNOS | F=GTTCCCTCAGGCTTGGGTCTT R=CCGTGGGGCTTGTAGTTGAC | 59,6 60,95 | 49 | 143/144 |
| eNOS | F=CCCAGGAGAGATCCACCTCA R=CAGCACATCCTGGGTTCTGT | 60,03 59,96 | 58 | 2899/2900 |
| actin, beta (Actb) | F=ACAACSTTCTTGCAGCTCCTC R=TCGTCATCCATGGCGAACTGG | 60,54 60,76 | 64 | 72/73 |

Примітка. F — прямий праймер; R — зворотний праймер; $T_{пл}$ — температура плавлення.

2.2.6 Методика біохімічного дослідження концентрації нітритів з реактивом Грісса в гомогенатах міокарда лівого шлуночка експериментальних щурів

Для отримання комплексної картини стану системи NO, розуміння характеру змін та спрямованості процесів метаболізму газотрансмітерної системи NO було проведено дослідження вмісту кінцевих метаболітів нітритів у гомогенатах міокарда ЛШ щурів експериментальних груп за методикою Горбунова Н.В., 1995 р.

Використані реактиви:

1. Депротейнізатор: 750 мг $ZnSO_4$ + 100 мг NaOH, доведений до 100 мл H_2O ;

2. Реактив Грісса 10 г, розведений в 90 мл 12,5 % оцтової кислоти

До 0,5 мл гомогенізату додавали 2,0 депротейнізатора та інкубували 15 хв. за температури $+27-30$ °С. Після цього проби центрифугували при 1500 обертів за хв. протягом 20 хв. Супернатант переміщували в чисту пробірку та додавали 1 мл реактиву Грісса, залишали на 15 хвилин за кімнатної температури. Спектрофотометрію проводили на спектрофотометрі Libra S32 (Biochrom Ltd, USA) при 540 нм (рис. 2.8).



Рисунок 2.8 – Спектрофотометр Libra S32

Контролем використовувався розчин 1 мл реактиву Грісса в 2 мл дистильованої води.

Результати обчислювали згідно з каліброваною кривою в діапазоні значень 0-200 мкмоль / л за формулою:

$$NO_x = E * K - E_0 * K \quad (2.13),$$

де NO_x - концентрація стабільних метаболітів NO, мкм/л;

E – результат спектрофотометрії експериментальної проби згідно з каліброваною кривою;

E_0 – результат контрольної проби згідно з каліброваною кривою;

K – розрахунковий коефіцієнт 331,75.

2.2.7 Методика імуноферментного дослідження рівня нітротирозину в плазмі експериментальних щурів

Концентрацію нітротирозину в плазмі крові щурів досліджували імуноферментним методом згідно з інструкцією до набору реактивів («Nucultbiotech» НК501 – Nitrotyrosine) на спектрофотометрі Sirio S (Seac, Італія) (рис. 2.9).



Рисунок 2.9 – Спектрофотометр Sirio S із планшеткою з пробами

2.2.8 Методи статистичного аналізу

Всі отримані експериментальні дані обробляли пакетом прикладних та статистичних програм «EXCEL-7,0» (Microsoft Corp., США) та програмою «Statistica» (ліцензія №JPZ804I382130ARCN10-J).

Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії і помилки середньої (m). Для виявлення достовірності відмінностей результатів досліджень в експериментальних і контрольних групах щурів визначали коефіцієнт Стьюдента (t) для вибірки з нормальним законом розподілення даних та визначали критерій Манна-Уїтні (U) для вибірки, дані якої не розподілялися за нормальним законом. Після чого визначали ймовірність відмінності вибірок (p). Достовірними вважали значення, для яких $p_s \leq 0,05$ [183].

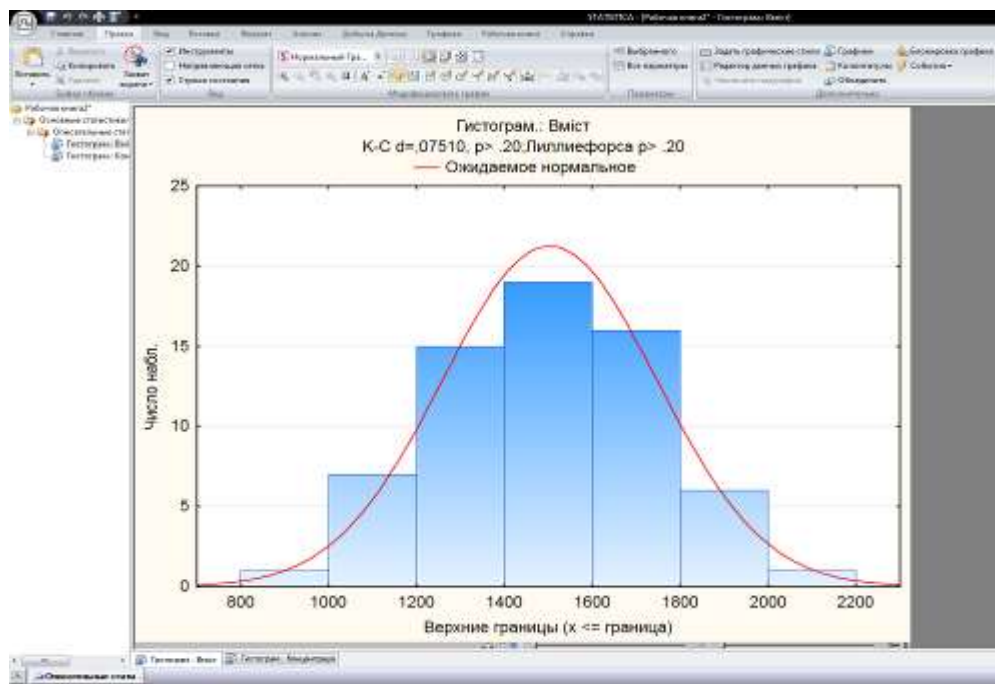


Рисунок 2.10 – Гістограма нормальності розподілу даних у програмі «Statistica»

РОЗДІЛ 3

МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ДОСЛІДЖУВАНИХ ПАРАМЕТРІВ СЕРЦЕВО-СУДИННОЇ СИСТЕМИ В ЩУРІВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ГРУП

У наведеному розділі представлені результати дослідження параметрів ССС у щурів із змодельованими фізіологічними (переривчаста гіпоксія різної тривалості: 15 і 60 діб) та патологічними (есенціальна та ендокринно-сольова АГ) впливами.

Для отримання цілісної картини морфо-функціонального стану ССС при різних за етіологією та тривалістю впливами було сформовано комплекс досліджень, що включав: вимірювання АТ, масометричне та морфо-денситометричне дослідження сердець щурів. Використання діагностичного комплексу дозволило провести комплектацію груп, підтвердити адекватність моделей АГ, оцінити ступінь важкості сформованої патології та виявити загальні ознаки, що формуються при тривалих впливах на ССС.

Необхідність визначення спроможності та ефективності функціонування ССС в експерименті пов'язана із тим, що морфо-функціональні зміни в серцевому м'язі при тривалому напруженні характеризуються, переважно, формуванням гіпертрофії кардіоміоцитів. Головним чинником структурних перебудов міокарда є підвищення АТ із збільшення ОЦК, активація симпато-адреналової системи та, при довготривалих гіпоксичних впливах, формування «системного структурного сліду» [111].

Відповідно, для комплексної оцінки впливів на ССС та виявлення ключових ознак морфо-функціональних змін, дослідження повинно бути багатокomпонентним і базуватися на цілій низькі методів: інструментальних із багаторазовим неінвазивним вимірюванням АТ, масометричних із розрахунком питомої щільності та відсоткової частки серця від загальної маси тварини та морфо-денситометричних із визначенням середньої кількості ядер

кардіоміоцитів у площі кадру, їхнього середнього лінійного розміру (мкм), щільності ядер до цитоплазми/мкм², а також визначення концентрації нуклеїнових кислот в ядрі та цитоплазмі, (Oog). Проведення саме такого багаторівневого обстеження щурів експериментальних груп надало можливість чітко підтвердити характер впливу етіологічного фактору на серцевий м'яз, виявити непрямі ознаки гіпертрофії міокарда та безпосередньо підтвердити її формування в ЛШ серця.

3.1 Показники артеріального тиску щурів експериментальних груп

Усім групам щурів вимірювання АТ здійснювалося багаторазово. Кратність та методика проведення описана в розділі 2. Останнє вимірювання здійснювалося в день виведення з експерименту, значення якого наведено в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 – Артеріальний тиск у щурів експериментальних груп ($M \pm m$)

| Експериментальні групи | Артеріальний тиск, мм рт.ст | | |
|------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | Систолічний | Діастолічний | Середній |
| Контроль | 115,0 ± 1,8 | 68,1 ± 1,2 | 83,8 ± 0,9 |
| ПГ15 | 123,4 ± 2,1 ¹ | 69,3 ± 1,9 | 87,3 ± 1,4 ¹ |
| ПГ60 | 135,1 ± 1,7 ^{1,2} | 82,6 ± 3,2 ^{1,2} | 92,4 ± 3,5 ¹ |
| ЕАГ | 174,9 ± 1,9 ¹ | 101,2 ± 1,6 ¹ | 125,8 ± 1,1 ¹ |
| ЕСАГ | 174,8 ± 1,8 ¹ | 119,3 ± 1,7 ^{1,3} | 137,8 ± 1,2 ^{1,3} |

Примітка 1. (¹) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи

Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників ПГ60 ($p_{st} < 0,05$) відносно показників групи ПГ15.

Примітка 3. (³) – достовірна різниця показників ЕСАГ ($p_{st} < 0,05$) відносно показників групи ЕАГ.

Проведене вимірювання АТ показало, що в щурів контрольної групи АТ протягом всіх вимірювань не перевищував показники середньої фізіологічної

норми (див. табл. 3.1), що за даними літературних джерел становлять: систолічний тиск 100-120 мм рт.ст. та 70-80 мм рт.ст. діастолічний [184, 185].

Аналіз значень АТ у щурів з експериментальною гіпоксією в обох групах показав, що показники систолічного та діастолічного тиску знаходилися в межах нормотензивного діапазону, але в групі щурів із ПГ15 систолічний тиск достовірно перевищував значення контролю на 7 % ($p_{st}<0,05$), середній – на 4 % ($p_{st}<0,05$). Тоді як при ПГ60, значення систолічного АТ перевищували показники контролю на 17 % ($p_{st}<0,05$), діастолічного – на 21 % ($p_{st}<0,05$), середнього – на 10 % ($p_{st}<0,05$) (див. табл. 3.1).

Таким чином, навіть короткотривалі гіпоксичні впливи сприяють помірному підвищенню судинного тону за рахунок активації негайних механізмів адаптації [22], тоді як довготривалий вплив призводить до стабільного підвищення АТ, який все ж таки знаходиться в межах нормотензивного діапазону (див. табл. 3.1).

Формування АГ в обох групах щурів із експериментальною АГ очікувано супроводжувалось стійким підвищенням АТ. У щурів з ЕАГ систолічний, діастолічний та середній АТ достовірно перевищували показники контролю на 52 %, 49 % та 50 %, відповідно. У щурів з ЕСАГ перевищення систолічного тиску склало 52 % ($p_{st}<0,05$), тоді як діастолічний значно перевищував контрольні значення на 75 %, і, як наслідок, відбулося збільшення середнього тиску на 64 % ($p_{st}<0,05$) (див. табл. 3.1).

Згідно з рекомендаціями Інтернаціонального товариства гіпертензії діагноз артеріальної гіпертензії у людини ставиться за умов стійкого підвищення АТ у пацієнтів більше ніж 140/90 мм рт.ст. Відповідно до них, у щурів експериментальних груп із змодельованими АГ виявлене стійке підвищення АТ (у тварин з ЕАГ Рс/Рд склало $174,95\pm 1,91/101,2\pm 1,58$ мм рт.ст., у щурів з ЕСАГ – $174,8\pm 1,81/119,25\pm 1,66$ мм рт.ст.) за класифікацією відповідало II ступеню АГ людини [186].

Необхідно зазначити, що в щурів обох експериментальних групах з АГ значення систолічного тиску не мали достовірних відмінностей, тоді як показники діастолічного переважали на 17,8 % у групі з ЕСАГ, порівняно до щурів з ЕАГ (див. табл. 3.1). Ймовірно, головним чинником встановленої відмінності судинного тонусу необхідно розглядати етіо-патогенетичні особливості ендокринно-сольової моделі АГ, що відповідає вторинній, ендокринно-асоційованій, АГ людини та розвивається через збільшення рівня глюкокортикоїдів, підвищення загального периферичного опору судин та ОЦК [187].

3.2 Масометричні показники сердець щурів експериментальних груп

Для скринінгової оцінки характеру морфо-структурних змін серця щурів було проведено визначення комплексу масометричних показників, що включав вимірювання маси вилученого серця, його питомої щільності та розрахунку відсоткової частки органу від загальної маси тіла щура – ЧМС (див. розд. 2, пп. 2.2.2). Проведене дослідження показало, що в щурів групи ПГ15, порівняно до контролю, достовірні зміни виявлялися в масі серця, що перевищувала значення групи порівняння на 17,9 %, питомої щільності – на 11,2 %, та ЧМС, яка була більшою на 12,7 % (табл. 3.2).

Таблиця 3.2 – Масометричні показники щурів з експериментальною гіпоксією, ($M \pm m$)

| Показник | Експериментальні групи | | |
|-------------------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Контроль | ПГ15 | ПГ60 |
| Маса тварин, г | 196,3±6,8 | 205,0±4,1 | 236,1±8,5 ¹ |
| Маса серця, г | 0,722±0,032 | 0,851±0,034 ¹ | 0,902±0,074 ¹ |
| Питома щільність, г/см ³ | 1,724±0,070 | 1,917±0,066 ¹ | 2,102±0,158 ¹ |
| Частка маси серця від ваги, % | 0,368±0,013 | 0,415±0,015 ¹ | 0,381±0,052 |

Примітка. (¹) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Тривалі гіпоксичні навантаження в щурів з ПГ60 сприяли достовірному збільшенню ваги щурів на 20,3 %, порівняно до контролю. При цьому відбувалося паралельне збільшення маси серця на 25 % та його питомої щільності майже на 22 %. Проте ЧМС достовірно не відрізнялася від значення контролю, що було пов'язано з одночасним та рівномірним збільшенням як загальної маси тварин, так і їхніх сердець (див. табл. 3.2).

Порівняння ефектів впливу гіпоксичних тренувань у залежності від їхньої тривалості показало, що достовірні відмінності мала лише загальна маса тварин, яка була більшою в групі ПГ60, порівняно до ПГ15, на 15,2 %. Відсутність достовірних міжгрупових відмінностей масометричних показників сердець щурів була пов'язана із однотипним впливом гіпоксії на серцевий м'яз, що характеризувався достовірним збільшенням маси серця та його питомої щільності вже на 15 добу експерименту зі збереженням цього ефекту до 60-ї доби (див. табл. 3.2).

Формування АГ та тривалий вплив підвищеного АТ у щурів з ЕАГ, порівняно до контролю, призводило до достовірного збільшення загальної маси щурів на 36,5 %. Це супроводжувалося збільшенням маси серця на 31,1 % та питомої щільності на 19,4 %. При цьому через рівномірність збільшення як загальної маси тіла, так і маси серця, ЧМС достовірно не змінювалась (табл. 3.3).

Таблиця 3.3 – Масометричні показники сердець щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією, ($M \pm m$)

| Показник | Експериментальні групи | | |
|----------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Контроль | ЕАГ | ЕСАГ |
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| Маса тварин, г | 196,3±6,8 | 267,9±10,4 ¹ | 217,7±12,4 |
| Маса серця, г | 0,722±0,032 | 0,947±0,040 ¹ | 0,920±0,054 ¹ |

| продовження таблиці 3.3 | | | |
|-------------------------------------|-------------|--------------------------|----------------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| Питома щільність, г/см ³ | 1,724±0,070 | 2,057±0,133 ¹ | 1,999±0,062 ¹ |
| Частка маси серця від ваги, % | 0,368±0,013 | 0,355±0,013 | 0,424±0,019 ^{1,2} |

Примітка 1. (¹) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st}<0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників ЕСАГ ($p_{st}<0,05$) відносно показників групи ЕАГ.

Дещо інша картина характеру змін масометричних параметрів відмічалася в групі щурів із ЕСАГ. Було встановлено, що серед досліджуваних параметрів достовірні зміни відбулися в масі серця, яка перевищила значення контрольної групи на 27,4 %, і супроводжувалось більшим показником питомої щільності на 16 % ($p_{st}<0,05$). Важливо відмітити, що збільшення маси серця відбувалося на фоні незмінної маси тіла щурів, через це розрахунковий показник ЧМС став більшим за контроль на 15,1 % (див. табл. 3.3).

Таким чином, вже на першому етапі досліджень були виявлені етіопатогенетичні особливості змін масометричних показників у щурів з АГ різного генезу. Так, при обох видах АГ у щурів відмічалось рівномірне збільшення маси їхніх сердець та питомої щільності. Тоді як загальна маса тіла та розрахунковий показник ЧМС змінювалися інакше, при ЕАГ за рахунок одночасного збільшення маси тіла та серця, ЧМС не відрізнявся від значення контролю, тоді як при вторинній ендокринно-асоційованій АГ в групі щурів з ЕСАГ маса тіла тварин достовірно не змінювалась, але через збільшення маси серця відбулося достовірне збільшення ЧМС (див. табл. 3.3).

Враховуючи вищенаведене, можна констатувати, що особливості змін масометричних показників добре характеризують спрямованість морфо-структурних перебудов у серці, що формуються через тривалі фізіологічні або патологічні впливи на ССС. Серед встановлених закономірностей необхідно відмітити збільшення маси серця як при гіпоксичних впливах різної тривалості, так і при сформованій АГ. Особливу цікавість становить збільшення питомої щільності серця в усіх 4-х моделях, що можна

розцінювати як показник збільшення його розмірів не за рахунок дилатації камер, а саме через гіпертрофію міокарда.

Необхідно відмітити інформативність розрахункового ЧМС, що дозволив виявити різке збільшення серця в щурів із ПГ15 та ЕСАГ, що не пов'язано із фізіологічним зростанням тварин і є ознакою «гострого» впливу етіологічних факторів на ССС. Тоді як у групах із ПГ60 та ЕАГ достовірних змін не було, що, ймовірно, пов'язано з хронічним впливом етіофактору через довший строк моделювання експерименту та фізіологічним зростанням тварин продовж цих термінів.

3.3 Морфо-денситометричні показники міокарда лівого шлуночка щурів експериментальних груп

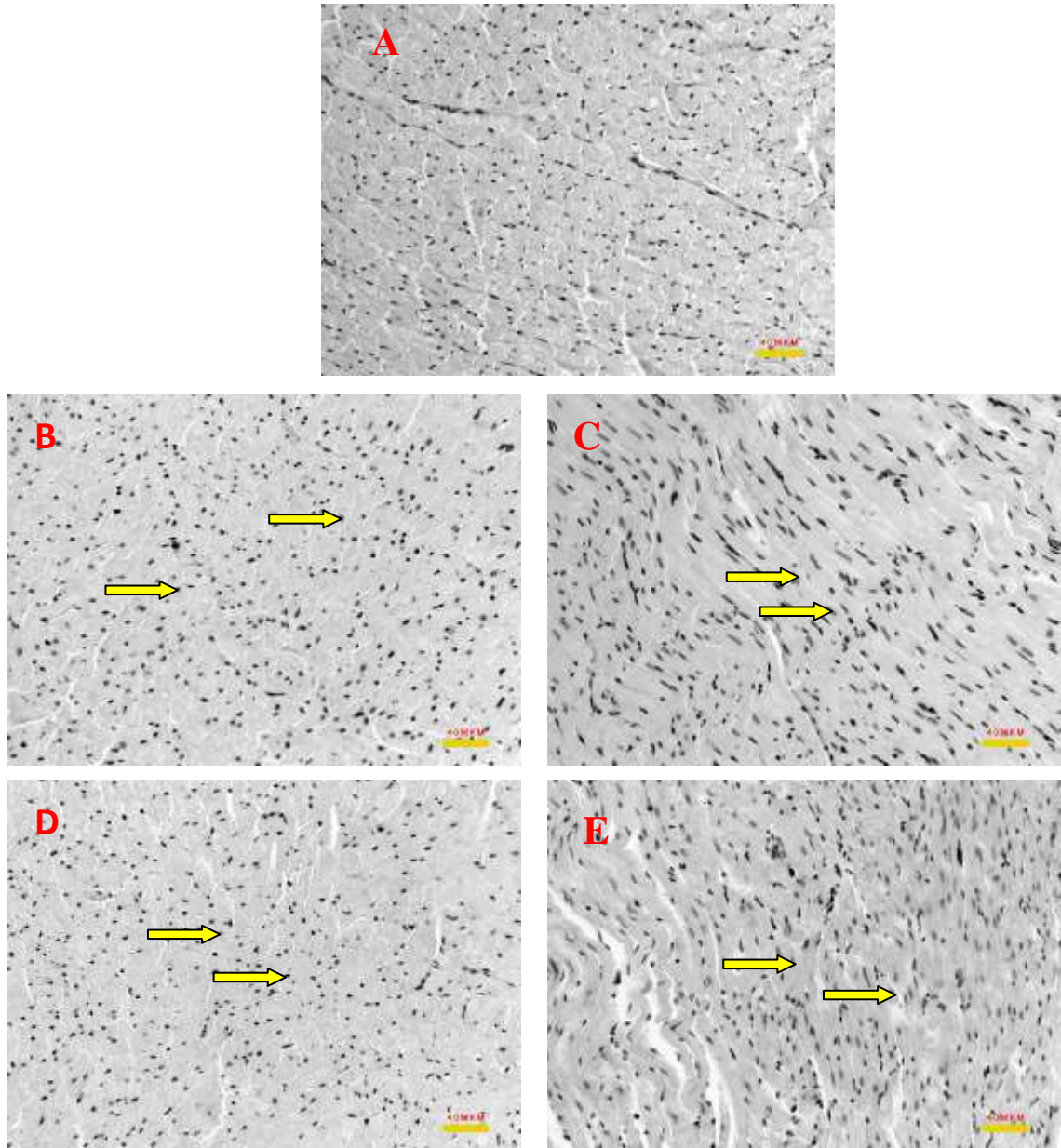
Для отримання детальної характеристики структурних змін серцевого м'язу при ремоделюванні міокарда багато років достатньо широко використовують гістохімічний метод, який сьогодні включає не тільки візуальний огляд та описовий принцип, більшість дослідників проводять кількісний аналіз морфо-метричних та денситометричних показників. Застосування такого підходу надає можливість отримувати достовірні та високоінформативні данні вже на початковій стадії формування патології [9].

Необхідно зазначити, що саме кардіоміоцити шлуночків складають близько 75 % білкової маси міокарда та забезпечують значний внесок в формування «кардіальної гіпертрофії». Поряд з ними є й інші, але менш активні компоненти: фібробласти, клітини гладкої мускулатури судин, ендотеліальні клітини [188]. Тому, виявлення гіпертрофії кардіоміоцитів, розуміння її функціонально-морфологічних та структурних особливостей є необхідним для розуміння процесу ремоделювання і подальших прогнозів.

Для встановлення характеру морфо-структурних перебудов у серцевому м'язі щурів експериментальних груп було визначено морфо-денситометричні показники кардіоміоцитів, а саме, кількість їхніх ядер у площі кадру, середній

лінійний розмір ядра (мкм), щільність ядер/мкм², концентрація нуклеїнових кислот в ядрі та цитоплазмі (Oog).

Оглядовий порівняльний аналіз зрізів міокарда щурів експериментальних груп показав різного ступеня виразності порушення цитоархітекτονіки, полінуклеарність та ядерний поліморфізм (рис. 3.1).



Примітка. – стрілками виділено різні за формою та розмірами ядра.

Рисунок 3.1 – Міокард щурів експериментальних груп (А – контроль, В – ПГ15, С – ПГ60, D – ЕАГ, Е – ЕСАГ), забарвлення галоціанін-хромовими галунами за Ейнарсоном. Зб. 200х

При аналізі цифрових значень середніх лінійних розмірів ядер кардіоміоцитів виявлено їхній поліморфізм, який виражається в значному коливанні каріометричного показника в групах ПГ15, ПГ60 і в щурів із ЕСАГ (рис. 3.2).

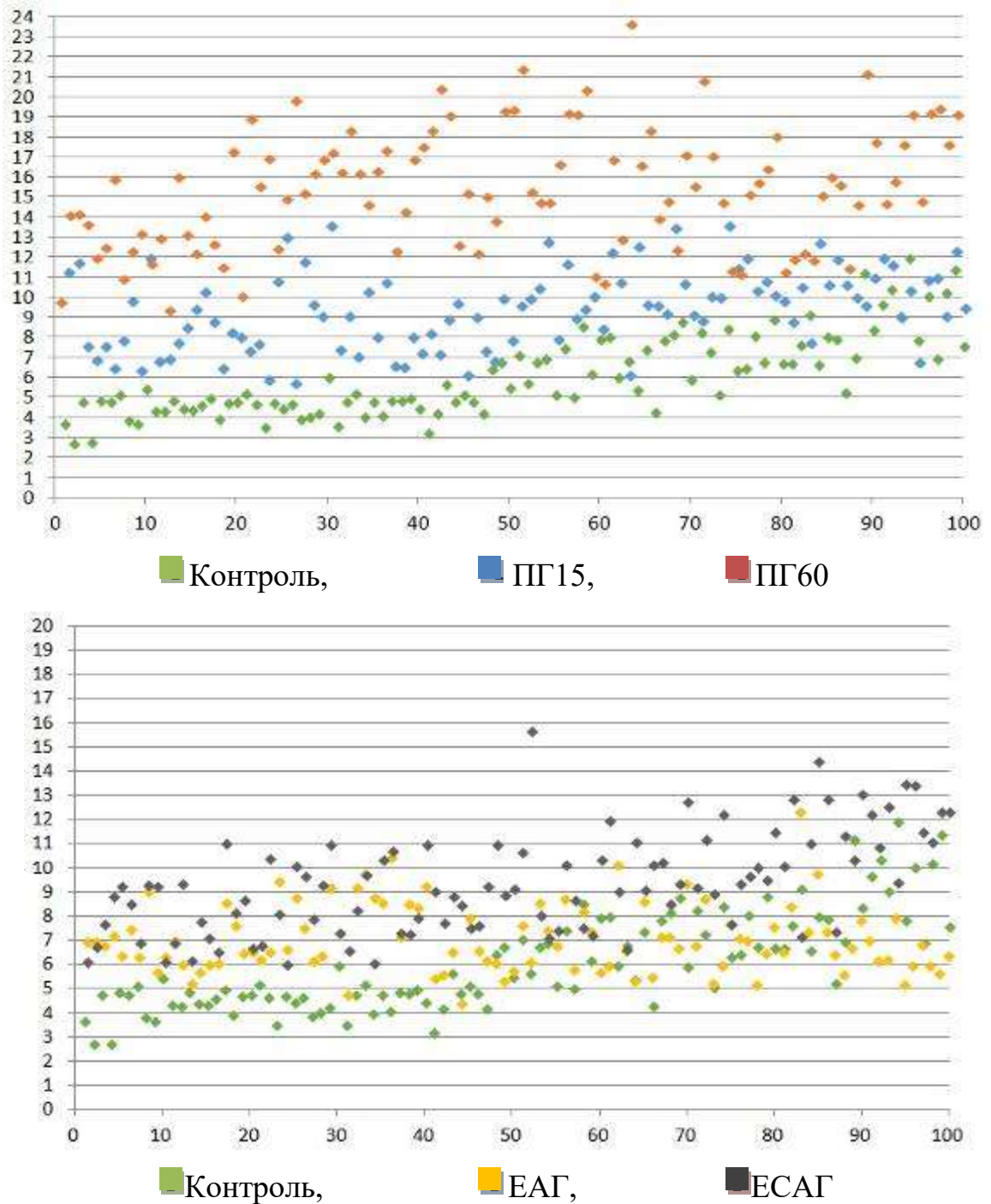


Рисунок 3.2 – Діаграма розсіювання каріометричних параметрів ядер кардіоміоцитів щурів експериментальних груп ($M \pm m$)

3.3.1 Морфо-денситометрична характеристика міокарда лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією

Проводячи аналіз кількісних значень досліджуваних морфо-денситометричних параметрів було виявлено, що в щурів ПГ15, порівняно до контролю, спостерігалися достовірно більші розміри ядер на 53 % та концентрації РНК у них на 13,7 % при незмінному значенні РНК у цитоплазмі (табл. 3.4).

Таблиця 3.4 – Морфо-денситометрична характеристика міокарда щурів з експериментальною гіпоксією, ($M \pm m$)

| Показник | Експериментальні групи | | |
|------------------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------------|
| | Контроль | ПГ15 | ПГ60 |
| Розмір ядер, мкм | 6,10±0,20 | 9,33±0,19 ¹ | 15,46±0,30 ^{1,2} |
| Концентрація РНК в ядрах, Оог | 0,241±0,007 | 0,274±0,006 ¹ | 0,140±0,003 ^{1,2} |
| Концентрація РНК у цитоплазмі, Оог | 0,0519±0,0007 | 0,0528±0,0004 | 0,0639±0,0006 ^{1,2} |
| Кількість ядер | 1069±24 | 1008±18 ¹ | 652±15 ^{1,2} |
| Щільність ядер/мкм ² | 21,88±0,46 | 17,60±0,55 ¹ | 17,25±0,54 ¹ |

Примітка 1. (¹) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників ПГ60 ($p_{st} < 0,05$) відносно показників групи ПГ15.

Описані зміни параметрів кардіоміоцитів у групі щурів ПГ15 супроводжувалися структурними перебудовами в серцевому м'язі. При цьому в площі кадру гістологічного зрізу кількість ядер кардіоміоцитів ставала меншою за контрольні значення на 5,7 % ($p < 0,05$), через що відбулося достовірне зменшення їхньої щільності до цитоплазми на 19,6 % (див. табл. 3.4).

Подібна закономірність зберігалася і при тривалому гіпоксичному впливі в щурів ПГ60: розміри ядер ставали достовірно більшими за контрольні на 153,4 %, однак, на відміну від ПГ15, концентрація РНК у них ставала меншою на 41,9 %. Разом з тим, концентрація РНК у цитоплазмі була достовірно більшою за контрольний показник на 23 %. Слід зазначити, що такі суттєві каріометричні зміни в кардіоміоцитах формувалися на тлі зменшення кількості ядер на 39 % із зменшенням їхньої щільності до цитоплазми на 21,2 %, порівняно до контролю (див. табл. 3.4).

Виявлені ефекти впливу гіпоксичного навантаження різної тривалості на ССС дають змогу припустити формування гіпертрофії міокарда, яка при 15-денній гіпоксії носить компенсаторний характер, про що свідчать збільшені каріометричні та денситометричні параметри ядер кардіоміоцитів, тоді як довготривалий вплив призводить до патологічних змін з ознаками ядерної дисфункції (зменшення концентрації РНК в ядрах кардіоміоцитів на фоні суттєвого збільшення їхньої площі) та патологічними структурними змінами в серцевому м'язі (зниження загальної кількості ядер кардіоміоцитів та їхньої щільності) (див. табл. 3.4).

3.3.2 Морфоденситометрична характеристика міокарда лівого шлуночка щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією

Дослідження морфо-денситометричних показників кардіоміоцитів у щурів ЕАГ виявило більший за контроль розмір ядер кардіоміоцитів на 15,9 %. Разом з тим, концентрація РНК в них зменшувалася на 44,4 %, але виявлено достовірно збільшення її у цитоплазмі на 19,5 %. Ці зміни в щурів ЕАГ супроводжувались меншою кількістю ядер на 15 %, порівняно до контролю, та меншою за контроль щільністю на 18,5 % (табл. 3.5).

Таблиця 3.5 – Морфо-денситометрична характеристика міокарда щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією, ($M \pm m$)

| Показник | Експериментальні групи | | |
|------------------------------------|------------------------|----------------------------|------------------------------|
| | Контроль | ЕАГ | ЕСАГ |
| Розмір ядер, мкм | 6,10±0,20 | 7,07±0,14 ¹ | 10,94±0,27 ^{1,2} |
| Концентрація РНК в ядрах, Оог | 0,241±0,007 | 0,134±0,003 ¹ | 0,075±0,001 ^{1,2} |
| Концентрація РНК в цитоплазмі, Оог | 0,0519±0,0007 | 0,0620±0,0005 ¹ | 0,0740±0,0008 ^{1,2} |
| Кількість ядер | 1069±24 | 909±18 ¹ | 785±14 ^{1,2} |
| Щільність ядер/мкм ² | 21,88±0,46 | 17,84±0,52 ¹ | 16,09±0,51 ¹ |

Примітка 1. (¹) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників ЕСАГ ($p_{st} < 0,05$) відносно показників групи ЕАГ.

У той час у щурів з ЕСАГ було відмічено достовірно більші за контроль ядра на 79,3 %, але меншу концентрацію РНК в них на 68,9 % на тлі збільшення РНК у цитоплазмі на 42,6 %. Описані зміни кардіоміоцитів розвивалися на тлі меншої загальної кількості їхніх ядер 26,6 % та щільності на 26,5 % (див. табл. 3.5).

Проведене дослідження показало, що формування АГ, незалежно від її етіопатогенетичної форми, призводить до розвитку ремоделювання міокарда. При цьому відбуваються зміни цитоархітекtonіки, які супроводжуються ядерною дисфункцією кардіоміоцитів. Про її формування свідчить поліморфізм ядер із збільшенням їхнього розміру на тлі зменшення їхньої загальної кількості та щільності.

Необхідно відмітити, що окрім однотипних змін у міокарді, які формуються через тривале напруження тиском на ССС, були виявлені етіопатогенетичні особливості. Серед них, більш виразні зміни морфо-денситометричних показників у групі щурів з ЕСАГ.

Резюме

Проведений аналіз результатів дослідження морфо-функціонального стану ССС при різних за етіологією та тривалістю впливами, які були отримані за допомогою комплексу досліджень, що включав вимірювання АТ, масометричне та морфо-денситометричне дослідження сердець щурів, дозволив дійти деяких проміжних висновків.

Гіпоксичний вплив на ССС щурів експериментальних груп, незалежно від його тривалості, сприяє помірному підвищенню АТ. При короткотривалому впливу ПГ15 це відбувається за рахунок активації негайних механізмів адаптації із достовірним, але незначним збільшення систолічного тиску, тоді як 60-денна гіпоксія призводить до стабільного підвищення АТ, як систолічного так і діастолічного, котрий залишається в межах нормотензивного діапазону.

Формування експериментальної АГ у щурів супроводжується стійким підвищенням АТ в обох групах: з ЕАГ Рс/Рд складає $174,95 \pm 1,91 / 101,2 \pm 1,58$ мм рт.ст., у щурів з ЕСАГ – $174,8 \pm 1,81 / 119,25 \pm 1,66$ мм рт.ст., що за класифікацією відповідає II ступеню АГ людини. Етіопатогенетичною відмінністю показників судинного тонуусу стало більш значне підвищення діастолічного АТ у щурів з ЕСАГ на 17,8 %, порівняно до ЕАГ.

Характер змін масометричних показників сердець щурів з гіпоксичними тренуваннями продемонстрував, що від тривалості їх впливу, відбувається збільшення маси серця та його питомої щільності. Але на відміну від ПГ15, маса тіла яких протягом тренувань достовірно не змінювалась, у щурів ПГ60 зміни маси серця супроводжувались збільшенням загальної маси тіла тварин, через це показник частки маси серця від ваги в щурів з ПГ 15 ставав вище значень контролю на 12,7 %, а у ПГ60 не змінився.

Дослідження масометричних показників у щурів із АГ різного генезу показало етіопатогенетичні особливості змін. Так, при обох видах АГ у щурів відмічається рівномірне збільшення маси їхніх сердець та питомої щільності.

Тоді як зміни загальної маси тіла та розрахункового показника ЧМС відрізнялися. При ЕАГ за рахунок одночасного збільшення маси тіла та серця ЧМС не відрізняється від значення контролю, тоді як в ЕСАГ протягом терміну експерименту маса тіла тварин достовірно не змінюється, але через збільшення маси серця відбувається достовірне збільшення ЧМС.

Враховуючи вищенаведене, можна констатувати, що особливості змін масометричних показників добре характеризують спрямованість морфо-структурних перебудов у серці, що формуються через тривалі фізіологічні або патологічні впливи на ССС. Серед встановлених закономірностей необхідно відмітити збільшення маси серця, як при гіпоксичних впливах різної тривалості, так і при сформованій АГ. Особливу цікавість становить збільшення питомої щільності серця в усіх 4-х моделях, що можна розцінювати як показник збільшення їхніх розмірів не за рахунок дилатацій камер, а саме через гіпертрофію міокарда.

Морфо-денситометричне дослідження показало наявність закономірності змін морфології кардіоміоцитів і залежності від виду і тривалості впливу на ССС, в той час як порушення цитоархітектоніки і поліморфізм ядер були виражені в щурів усіх експериментальних груп. Виявлені ефекти впливу гіпоксичного навантаження різної тривалості на ССС дали змогу припустити формування гіпертрофії міокарда, яка при 15-денній гіпоксії носить компенсаторний характер, про що свідчили збільшені каріометричні та денситометричні параметри ядер кардіоміоцитів, тоді як довготривалий вплив показав патологічні зміни з ознаками ядерної дисфункції (зменшення концентрації РНК в ядрах кардіоміоцитів на фоні суттєвого збільшення їхньої площі) та патологічні структурні зміни в серцевому м'язі (зниження загальної кількості ядер кардіоміоцитів та їхньої щільності).

Формування АГ, незалежно від її етіопатогенетичної форми, призводить до розвитку ремоделювання міокарда. При цьому відбуваються зміни цитоархітектоніки кардіоміоцитів, які супроводжуються ядерною

дисфункцією. Про її формування свідчить поліморфізм ядер із збільшенням їхнього розміру на тлі зменшення їхньої загальної кількості та щільності.

Необхідно відмітити, що окрім однотипних змін у міокарді, які формуються через тривале напруження тиском на ССС, виявляються етіопатогенетичні особливості, серед яких – більш виражені зміни морфоденситометричних показників у групі щурів з ЕСАГ.

Матеріали розділу відображені в 5 статтях [189-193].

РОЗДІЛ 4

ПАТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ МАРКЕРНОГО ПРОФІЛЮ РЕМОДЕЛЮВАННЯ МІОКАРДА ЛІВОГО ШЛУНОЧКА ЩУРІВ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

У розділі наведені результати проведених досліджень маркерного профілю ремоделювання міокарда ЛШ щурів експериментальних груп при різних за видом та тривалістю впливів. Було проведено порівняльний аналіз результатів впливів фізіологічного (переривчаста гіпоксія) та патологічного (експериментальна АГ) характерів. Для цього були визначені кількісні дані про експресію та характер розподілу маркерів ремоделювання, таких як кардіотрофін-1, тайтин, колаген I типу та анексин V. Оцінка показників експресії маркерів ремоделювання була здійснена із використання імунофлюоресцентного методу, кількісними параметрами були вміст і концентрація ІРМ до зазначених маркерів. Для визначення ступеня вираженості фіброзних змін у міокарді було розраховано коефіцієнт тайтин-колагененового співвідношення.

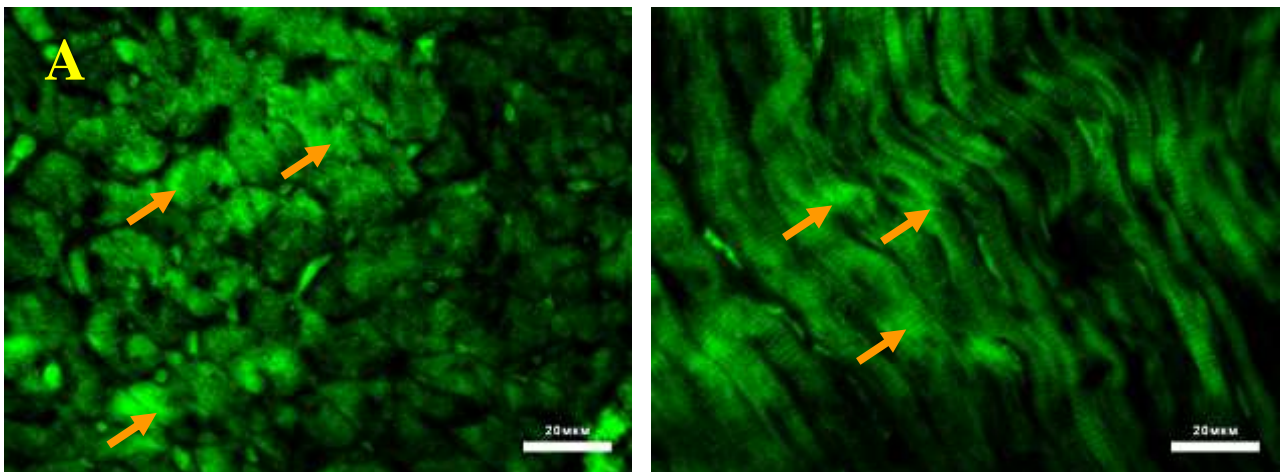
Актуальність виконаного дослідження полягає в тому, що різні стресорні впливи на міокард, навіть за відсутності клінічно явних проявів, сприяють формуванню його ремоделювання – структурно-функціональних змін компонентів серцевого м'язу у відповідь на гемодинамічні, механічні, нейрогуморальні, запальні та окислювальні впливи [35].

Слід зазначити, що для ефективного діагностування та якісного прогнозу перебігу захворювань ССС необхідне не тільки виявлення ремоделювання, важливо диференціювати його за напрямом: фізіологічне або патологічне, визначати його характер, ступінь вираженості та спрямованість перебудов «геометрії» серця. «Золотим стандартом» у клінічній медицині використовується комплекс досліджень із проведенням УЗД серця, двомірної ехокардіографії, МРТ і визначення біомаркерів фіброзу й апоптозу в плазмі та

біоптатах пацієнтів [194]. Перевагами експериментального дослідження є можливість використання найінформативніших і маркерів для поставленої мети. В представленій роботі імуногістохімічна панель була сформована з: кардіотрофіну-1 (КТ-1), який є не тільки маркером ремоделювання, але й незалежним предиктором серцевих подій у пацієнтів з серцевою недостатністю [195]; колагену I типу (КЛ), як показника фіброзу міокарда [196]; тайтину (ТТ) – гігантського білку, що входить до складу саркомеру кардіоміоцитів, забезпечуючи його цілісність і модулюючи пасивне напруження [66] та анексину V (АН), який розглядають як перспективний маркер молекулярної візуалізації апоптозу [86].

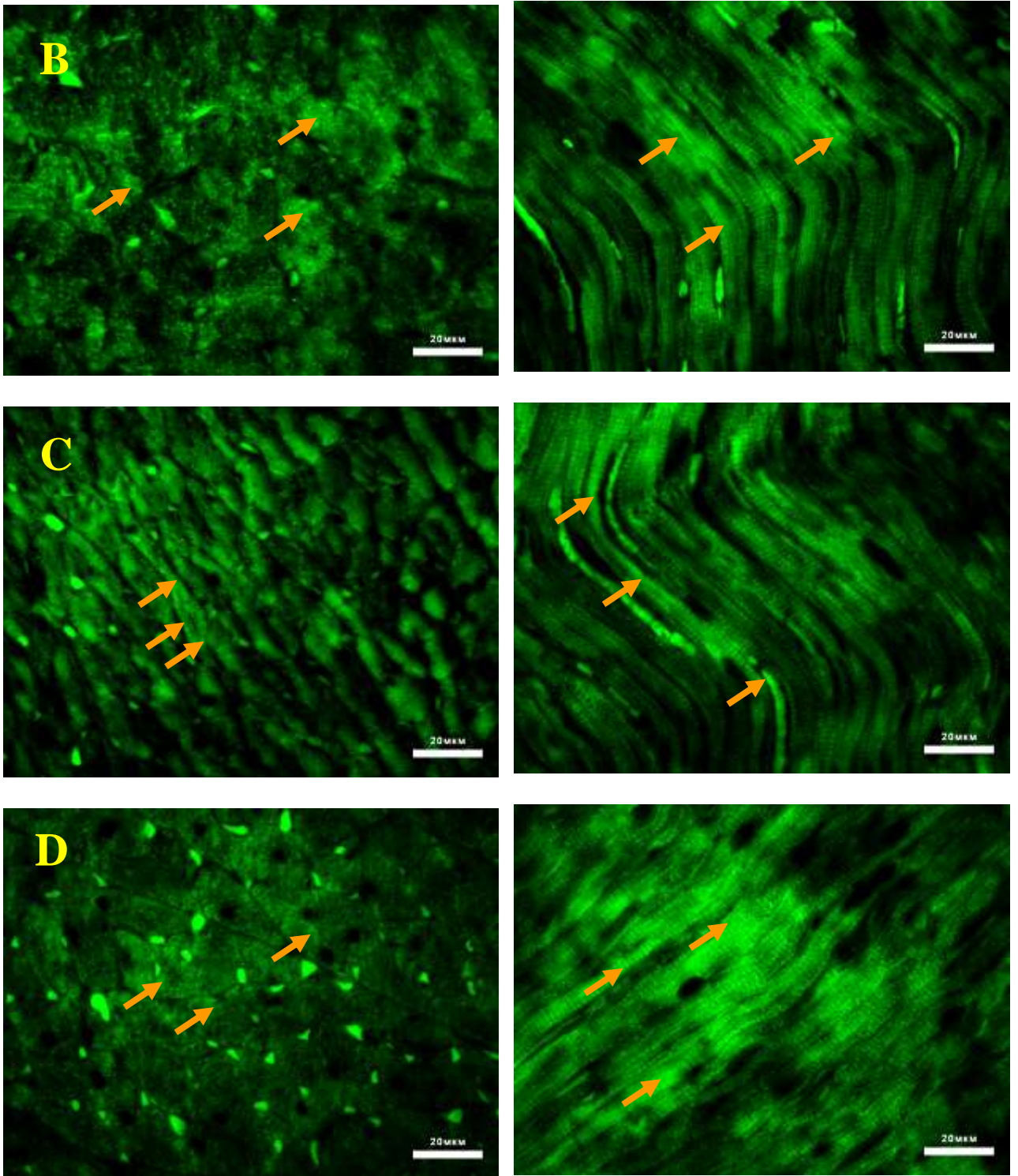
4.1 Патерн експресії маркерів ремоделювання в міокарді лівого шлуночка щурів експериментальних груп

Візуальний аналіз зображень міокарда щурів контрольної групи показав, що імунореактивний матеріал до КТ-1, ТТ та АН розташовувався виключно в цитоплазмі кардіоміоцитів, тоді як КЛ – у міжклітинному інтерстиції (рис. 4.1).



Примітка. Стрілками позначені гранули імунореактивного матеріалу.

Рисунок 4.1 – Експресія маркерів ремоделювання у міокарді лівого шлуночка контрольних тварин (А – кардіотрофін-1, В – тайтин, С – колаген I типу, D – анексин V. Реакція непрямой імунофлюоресценції, збільшення 630^x



Примітка. Стрілками позначені гранули імунореактивного матеріалу.

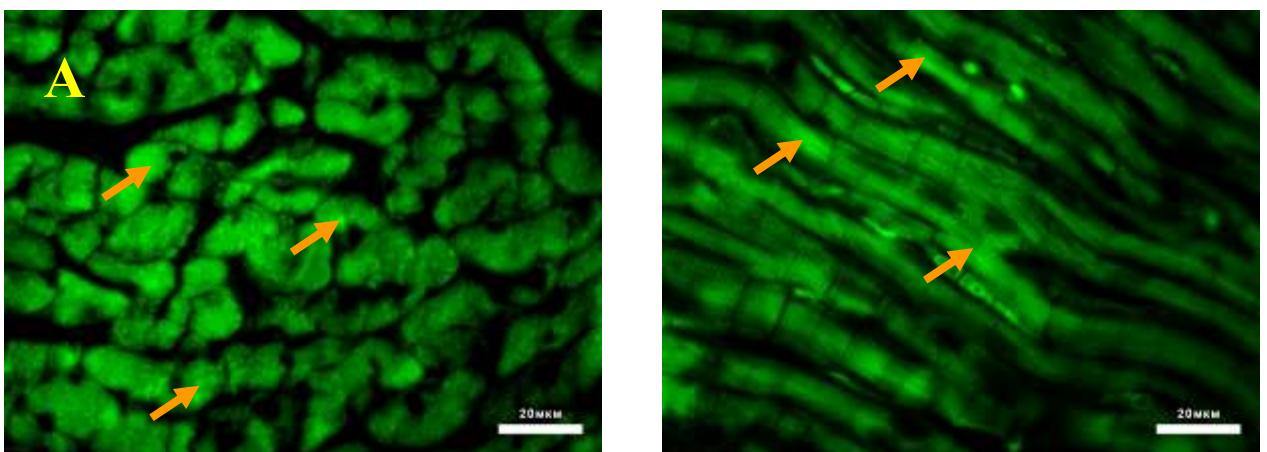
Рисунок 4.1, аркуш 115

4.1.1 Особливості експресії кардіотрофіну-1 у міокарді лівого шлуночка щурів експериментальних груп

Кардіотрофін-1 – білок, що входить до складу першого компенсаторного механізму, який міокард використовує при геодинамічному перевантаженні [197]. Він забезпечує на клітинному рівні ріст кардіоміоцитів, що являє собою відповідь на механічне розтягнення або гуморальну сигналізацію [195]. КТ-1 являє собою цитокін, частину інтерлейкіна-6, що синтезується кардіоміоцитами та серцевими фібробластами під впливом біомеханічної перенапруги та/або гуморальних факторів, таких як ангіотензин II [37]. Саме через ці його властивості та діагностичну цінність при серцево-судинній патології визначення кількісних значень КТ-1 було включено до панелі маркерів ремоделювання міокарда.

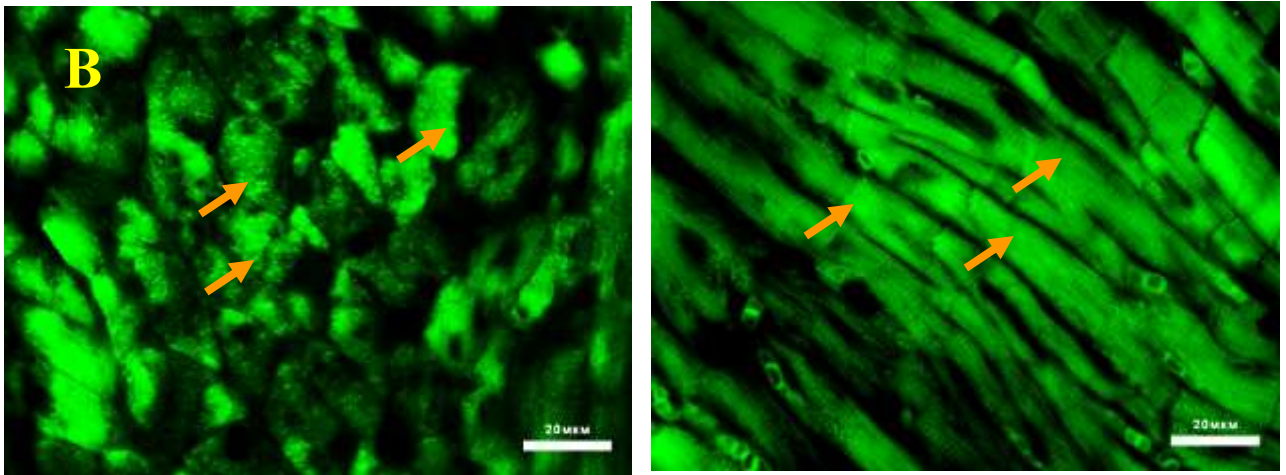
4.1.1.1 Характер експресії кардіотрофіну-1 у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією

При візуальному аналізі зрізів міокарда щурів із гіпоксичним впливом різної тривалості було відмічене, що ІРМ до КТ-1 розташовується в цитоплазмі кардіоміоцитів, на поперечних зрізах виглядає дрібними гранулами, а в повздовжніх – стрічкоподібними скупченнями (рис. 4.2).



Примітка. Стрілками позначені гранули імунореактивного матеріалу.

Рисунок 4.2 – Експресія кардіотрофіну-1 у міокарді лівого шлуночка щурів групи ПГ15 (А) та ПГ60 (В). Реакція непрямой імуофлюоресценції, збільшення 630^x



Примітка. Стрілками позначені гранули імунореактивного матеріалу.

Рисунок 4.2, аркуш 117

Аналіз цифрових значень показників експресії КТ-1 у групі щурів із ПГ15 виявив достовірні відмінності лише в повздожніх волокнах, а саме більший за контроль показник вмісту на 11,5 %. Значення концентрації ІРМ до КТ-1 характеризувалися лише тенденцією до зниження (табл. 4.1).

Таблиця 4.1 – Експресія кардіотрофіну-1 у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією ($M \pm m$)

| Показники | | Експериментальні групи | | |
|---|----------------------|------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| | | Контроль | ПГ15 | ПГ60 |
| Вміст, Од _{іф} | Поперечні волокна | 663,58 ±23,79 | 682,51 ±21,19 | 1053,77 ±27,27 ^{1,2} |
| | Повздожні волокна | 620,81 ±21,55 | 692,29 ±19,66 ¹ | 1077,44 ±38,00 ^{1,2} |
| Концентрація, Од _{іф} /мкм ² | Поперечні волокна | 0,094 ±0,002 | 0,094 ±0,002 | 0,156 ±0,003 ^{1,2} |
| | Повздожні волокна | 0,096 ±0,003 | 0,091 ±0,002 | 0,150 ±0,004 ^{1,2} |

Примітка 1. (¹) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників групи ПГ60 ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників групи ПГ15.

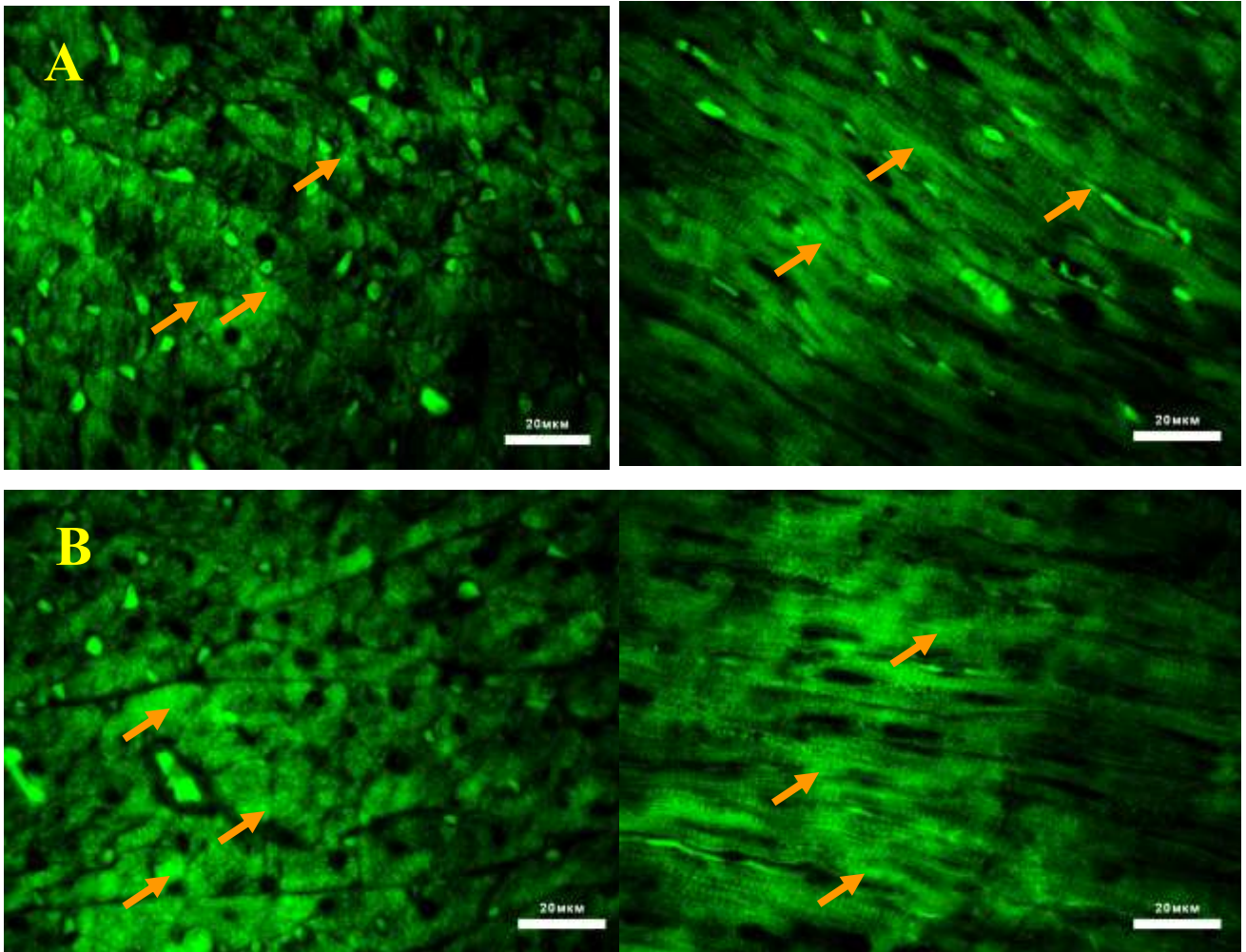
У групі щурів ПГ60, порівняно до контролю, показники експресії КТ-1 демонстрували більш значні зміни, чим у групі із ПГ15. При цьому, порівняно до контролю, в поперечних волокнах відмічались більші показники вмісту ІРМ на 58,8 % і концентрації на 65,8 %. У поздовжніх волокнах вміст КТ-1 був вище за контрольні значення на 73,6 %, а концентрація на 56,9 % (див. табл. 4.1).

Порівнюючи значення експресії КТ-1 у щурів групи ПГ15 із ПГ60, було встановлено, що довготривалість гіпоксичного впливу прогресивно збільшує вміст та концентрацію в поперечних волокнах на 54,4 % і 66,1 %, у повздовжніх – 55,6 % і 65,1 %, відповідно (див. табл. 4.1)

Проведене дослідження виявило, що обидві строки гіпоксії характеризуються збільшенням експресії КТ-1. Але, у випадку ПГ15, достовірно більші значення за контроль виявлено лише в повздовжніх волокнах. Тоді як для ПГ60 характерні достовірно більш виражені зміни, порівняно до контролю, та попереднього терміну гіпоксії, а саме, більші значення вмісту і концентрації КТ-1 у поперечних та повздовжніх волокнах.

4.1.1.2 Характер експресії кардіотрофіну-1 у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією

Візуальний огляд зрізів міокарда щурів із експериментальною АГ показав, що ІРМ до КТ-1 розташовувався в цитоплазмі кардіоміоцитів, але, порівняно до контролю, (див. рис. 4.1) мав характерні особливості: в щурів групи ЕАГ скупчення ІРМ мали «бляшкоподібний» вигляд, тоді як в групі ЕСАГ він заповнював майже всю цитоплазму клітини у вигляді великих гранул (рис. 4.3).



Примітка. Стрілками позначені гранули імунореактивного матеріалу.

Рисунок 4.3 – Експресія кардіотрофіну-1 у міокарді лівого шлуночка тварин групи ЕАГ (А) та ЕСАГ (В). Реакція непрямой імунofлюоресценції, збільшення 630^x

Порівняно до контролю, кількісний показник вмісту ІРМ до КТ-1 у поперечних волокнах міокарда щурів ЕАГ був достовірно більше на 27,4 %, тоді як концентрація – на 32,2 %. У поздовжніх волокнах переважання вмісту КТ-1 склало 42,6 %, а концентрації – на 35,1 % (табл. 4.2).

Таблиця 4.2 – Експресія кардіотрофіну-1 у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією ($M \pm m$)

| Показники | | Експериментальні групи | | |
|---|-------------------|------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| | | Контроль | ЕАГ | ЕСАГ |
| Вміст, Од _{іф} | Поперечні волокна | 663,58 ±23,79 | 845,35 ±20,10 ¹ | 1196,51 ±30,92 ^{1,2} |
| | Повздожні волокна | 620,81 ±21,55 | 885,01 ±66,24 ¹ | 1119,37 ±27,91 ^{1,2} |
| Концентрація, Од _{іф} /мкм ² | Поперечні волокна | 0,094 ±0,002 | 0,124 ±0,003 ¹ | 0,166 ±0,004 ^{1,2} |
| | Повздожні волокна | 0,096 ±0,003 | 0,129 ±0,009 ¹ | 0,155 ±0,004 ^{1,2} |

Примітка 1. (¹) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників групи ЕСАГ ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників групи ЕАГ.

У щурів групи ЕСАГ, порівняно до контролю, вміст ІРМ до КТ-1 у поперечних волокнах зрізу міокарда був достовірно більше на 80,3 %, а концентрація на 76,6 %. У поздовжніх волокнах ці показники також достовірно перевищували значення контролю на 80,3 % та 61,5 %, відповідно (див. табл. 4.2).

Міжгруповий порівняльний аналіз експресії КТ-1 у щурів з АГ показав, що при вторинній ендокринно-асоційовані АГ (щури групи ЕСАГ) його вміст та концентрація в поперечних волокнах зрізів міокарда були вище на 41,5 % та 33,6 %, відповідно, чим при есенціальній АГ (щури групи ЕАГ). Подібна картина зберігалася й у поздовжніх волокнах: вміст був вищим на 26,5 %, а концентрація – на 19,6 % (див. табл. 4.2).

Результат визначення характеру експресії КТ-1 у міокарді при сформованій АГ показав, що стійке підвищення АТ призводить до збільшення його вмісту та концентрації у щурів обох експериментальних моделей,

незалежно від етіопатогенезу патології. Слід зазначити, що ступінь збільшення його експресії мала модельну залежність – встановлені вищі показники в щурів групи ЕСАГ.

Порівняльний аналіз ефектів фізіологічних (гіпоксія різної тривалості) та патологічних (тривале підвищення АТ) впливів на міокард показав, що при гіпоксії (через активацію симпато-адrenalової системи та навантаження тиском) та при сформованій АГ (через навантаження тиском і об'ємом) завжди відбувається підвищення експресії КТ-1, ступінь вираженості якої залежить як від тривалості впливів, так і сумарно патологічних ланок.

4.1.2 Характер експресії тайтину у міокарді лівого шлуночка щурів експериментальних груп

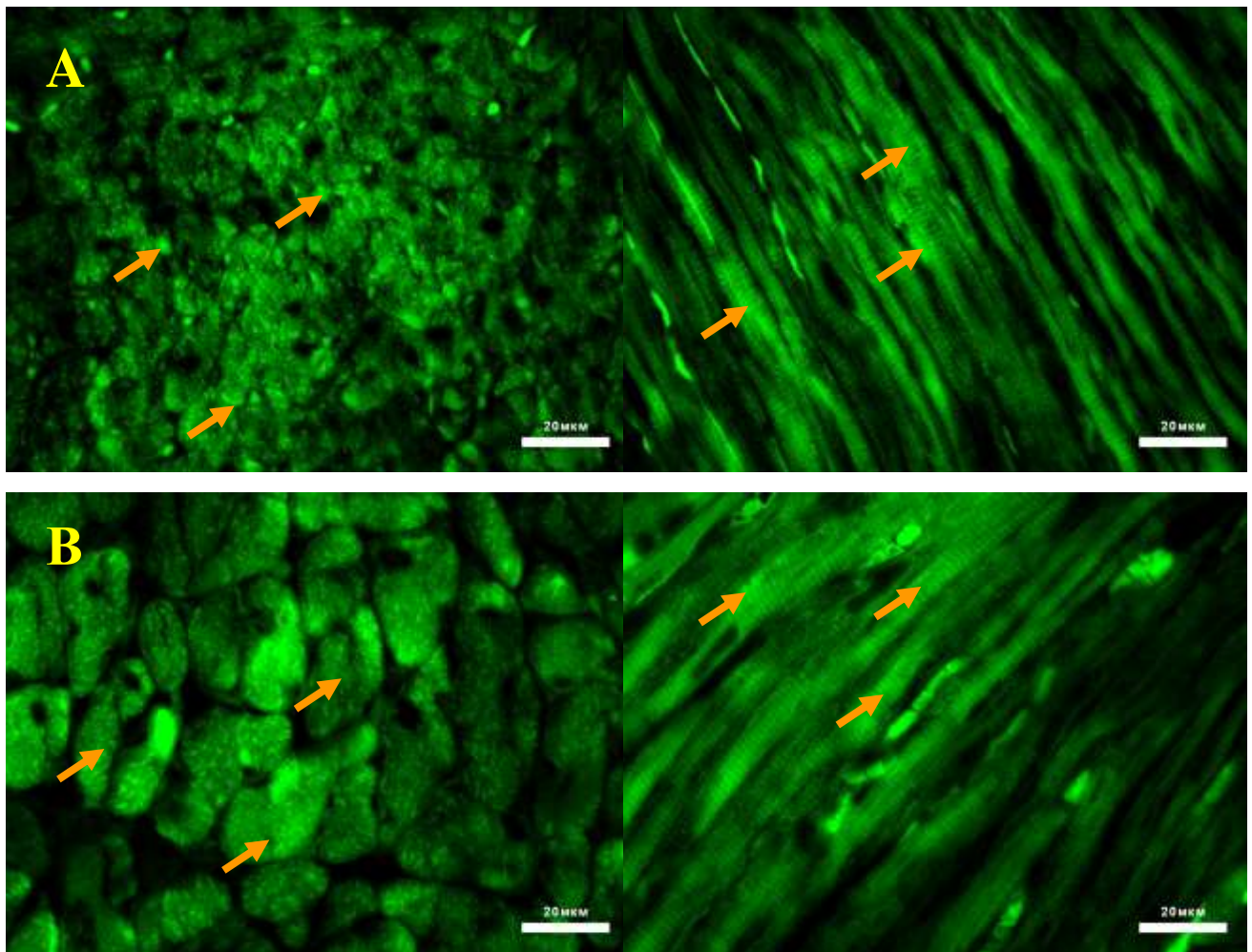
Тайтин – гігантський білок, що входить до складу саркомерів кардіоміоцитів. Якщо актин і міозин генерують силу скорочення завдяки механізму «ковзної нитки», то ТТ забезпечує цілісність саркомеру, модулюючи пасивне напруження. Більш того, цей білок здатен взаємодіяти з іншими компонентами міофіламента, впливаючи на Ca^{2+} -залежну напругу [66]. ТТ грає основну роль у механічній відповіді кардіоміоцита на навантаження в пасивному стані за відсутності сигналів. Модуляція загальної жорсткості міокарда здійснюється ауторегуляцією за законом Франка-Старлінга. Це реалізується шляхом посттрансляційної модифікації ТТ, що впливає на стінки камер серця, діастолічне наповнення і наступні функції систолічного насоса [77].

В процесі розслаблення нитки ТТ поведуться як генератори пасивної сили паралельно з скорочувальним апаратом. Зміна пружності саркомерів змінюється розплутувально-скручувальними рухами клубочків ТТ, і разом з колагеновими волокнами визначає міцність і еластичність сполучнотканинного каркасу. ТТ простягається від Z-диска до М-лінії –

центру саркомера. Пружність I-діапазону ТТ підтримує пружну віддачу на початку діастолі і раннє скорочення в систолу [198].

4.1.2.1 Характер експресії тайтину в міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією

При візуальному аналізі мікрофотографій зрізів міокарда з імуногістохімічним забарвленням до білку ТТ відмічене збереження характеру розташування ІРМ, подібно до контролю (див. рис. 4.1). Слід відмітити, що на зрізах серця щурів ПГ60 відмічається більш інтенсивна флюоресценція, порівняно до контролю та групи ПГ15 (рис. 4.4).



Примітка. Стрілками позначені гранули імунореактивного матеріалу.

Рисунок 4.4 – Експресія тайтину в міокарді лівого шлуночка тварин групи ПГ15 (А) та ПГ60 (В). Реакція непрямой імунофлюоресценції, збільшення 630^x

Визначення цифрових показників експресії ТТ у групі щурів із ПГ15 показало, що, порівняно з контролем, відмічався достовірно вищий вміст ІРМ до ТТ лише в повздовжніх волокнах на 23,1 %. У той час, показник концентрації був достовірно вищим як у поперечних, так і повздовжніх волокнах, а саме на 18,9 % та 23,5 %, відповідно (табл. 4.3).

Таблиця 4.3 – Експресія тайтину в міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією, ($M \pm m$)

| Показники | | Експериментальні групи | | |
|---|-----------------------|------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| | | Контроль | ПГ15 | ПГ60 |
| Вміст, Од _{іф} | Поперечні волокна | 566,46 ±15,35 | 611,64 ±18,71 | 1318,74 ±29,53 ^{1,2} |
| | Повздовжні волокна | 602,22 ±18,25 | 741,06 ±21,34 ¹ | 1354,53 ±27,21 ^{1,2} |
| Концентрація, Од _{іф} /мкм ² | Поперечні волокна | 0,079 ±0,002 | 0,094 ±0,002 ¹ | 0,160 ±0,004 ^{1,2} |
| | Повздовжні волокна | 0,090 ±0,002 | 0,111 ±0,0039 ¹ | 0,154 ±0,004 ^{1,2} |

Примітка 1. (¹) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників групи ПГ60 ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників групи ПГ15.

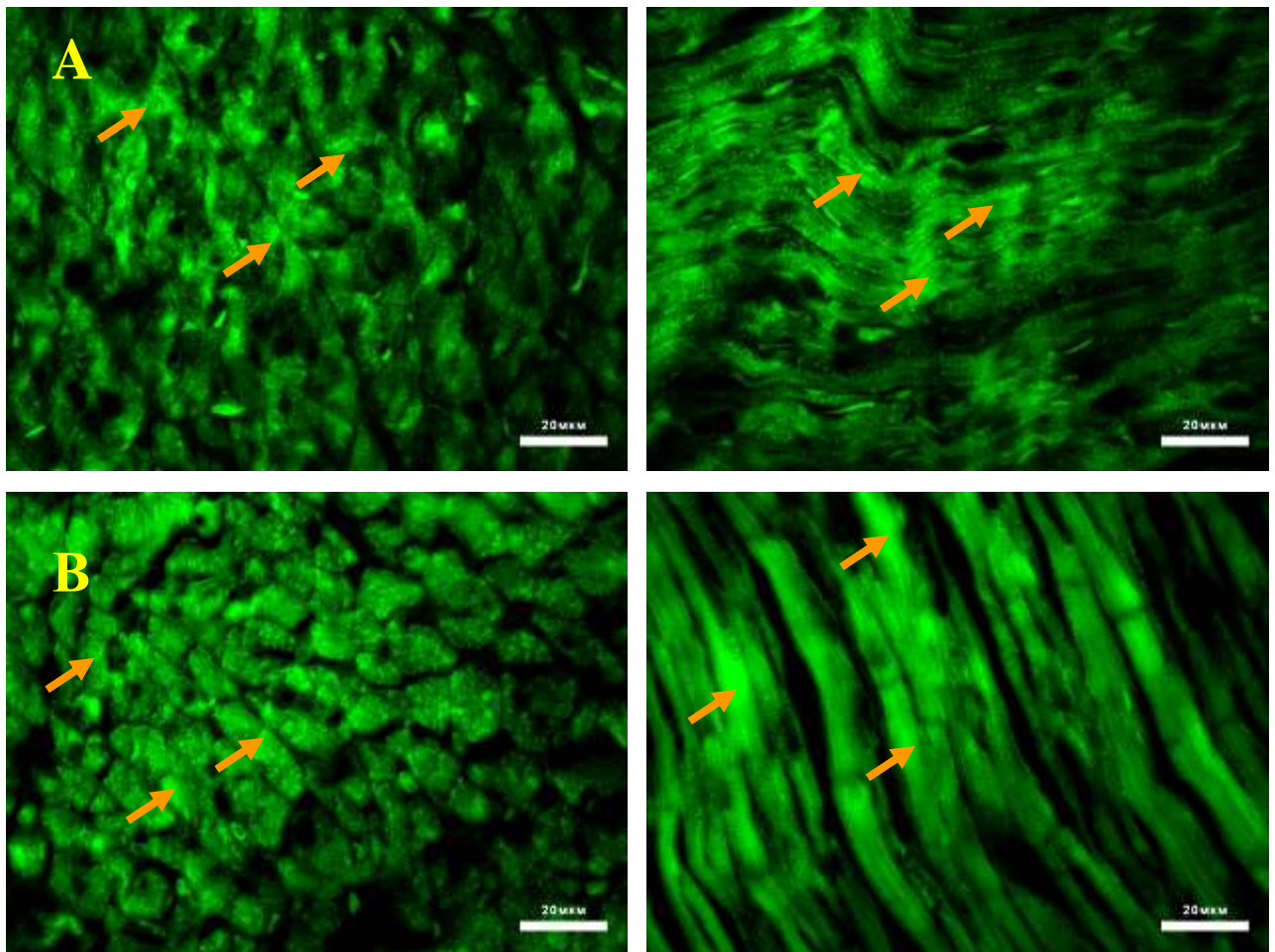
Порівняно до контролю, в групі щурів ПГ60 у поперечних волокнах також відмічався значно більший вміст ІРМ до ТТ на 132,8 %, а концентрації на 101,9 %. У повздовжніх волокнах це переважання склало 124,9 % та 71,2 %, відповідно (див. табл. 4.3).

Міжмодельне порівняння показало, що із збільшенням тривалості гіпоксичного впливу при ПГ60 відбувається суттєве, більш ніж у 2 рази, перевищення вмісту ТТ у поперечних та повздовжніх волокнах міокарда та на 69,8 % і 38,6 %, відповідно, його концентрації (див. табл. 4.3)

Відповідно до отриманих результатів можна стверджувати, що гіпоксичне навантаження на ССС при короткотривалому впливі сприяє збільшенню концентрації ТТ, тоді як довготривалий вплив впродовж 60 діб суттєво підвищує обидва показника експресії - його вміст і концентрацію.

4.1.2.2 Характер експресії тайтину у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією

При сформованій АГ експресія ТТ у міокарді характеризувалася подібністю мікроскопічної картини до контрольної групи (див. рис. 4.1). Серед відмінностей слід зазначити високу інтенсивність флюоресценції у групі щурів з ЕСАГ (див. рис. 4.5).



Примітка. Стрілками позначені гранули імунореактивного матеріалу.

Рисунок 4.5 – Експресія тайтину в міокарді лівого шлуночка тварин групи ЕАГ (А) та ЕСАГ (В). Реакція непрямой імунофлюоресценції, збільшення 630^x

Цифровий аналіз показав, що в поперечних волокнах міокарда щурів ЕАГ вміст та концентрація ІРМ до ТТ були достовірно вищими на 12,2 % та 23 %, відповідно, порівняно до контролю. У повздовжніх волокнах було виявлено достовірно менші значення концентрації на 11,5 % (табл. 4.4).

Таблиця 4.4 – Експресія тайтину в міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією ($M \pm m$)

| Показники | | Експериментальні групи | | |
|---|-----------------------|------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| | | Контроль | ЕАГ | ЕСАГ |
| Вміст, Од _{іф} | Поперечні волокна | 566,46 ±15,35 | 635,65 ±16,81 ¹ | 1222,13 ±37,28 ^{1,2} |
| | Повздовжні волокна | 602,22 ±18,25 | 631,53 ±16,80 | 1247,02 ±30,52 ^{1,2} |
| Концентрація, Од _{іф} /мкм ² | Поперечні волокна | 0,079 ±0,002 | 0,097 ±0,002 ¹ | 0,166 ±0,005 ^{1,2} |
| | Повздовжні волокна | 0,090 ±0,002 | 0,080 ±0,001 ¹ | 0,168 ±0,006 ^{1,2} |

Примітка 1. (¹) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників групи ЕСАГ ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників групи ЕАГ.

У групі щурів ЕСАГ зміни експресії були значно більшими за контроль. У поперечних волокнах вміст ТТ був більшим на 115,8 %, а концентрація на 110,2 %. У повздовжніх волокнах вміст достовірно перевищував значення контролю на 107,1 %, тоді як концентрація на 86,2 % (див. табл. 4.4).

Порівняння отриманих значень експресії ТТ у щурів з АГ показало, що більш виражені зміни спостерігалися в групі з ЕСАГ, які показали перевищення відповідних значень групи ЕАГ в поперечних та повздовжніх волокнах, вмісту на 92,3 % і 97,5 %, концентрації – на 70,9 % і 110,4 %, відповідно (див. табл. 4.4).

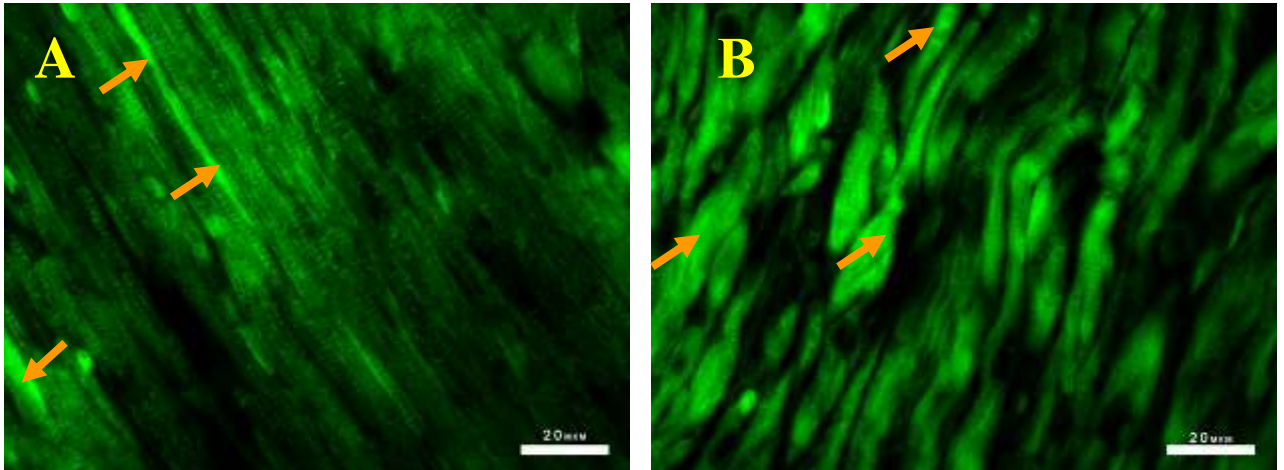
Встановлений в дослідженні факт, що АГ, незалежно від її етіопатогенетичних особливостей, супроводжується збільшенням у міокарді вмісту та концентрації ТТ, дає змогу припустити формування при сформованій АГ адаптаційно-компенсаторних механізмів задля підвищення жорсткості стінки ЛШ та покращення її пружно-еластичних властивостей.

4.1.3 Особливості експресії колагену I типу в міокарді лівого шлуночка щурів експериментальних груп

Багатьма дослідниками доведено, що важливим компонентом ремоделювання міокарда є фіброз, який може виникати як наслідок розширення позаклітинного простору (реактивний фіброз) або відновлення апоптотичних клітини (фіброз заміщення). Він розвивається у відповідь на ураження міокарда, ішемію, дію тиску, розтягнення, запалення або нітросо-оксидативний стрес [199]. Частіше, фіброз пов'язаний з переважанням синтезу молекул КЛ над незміненою їхньою деструкцією, як наслідок ряду процесів шляхом механічних та гуморальних механізмів. Представленість КЛ в міокарді складає близько 85 % всіх колагенів міокарда [200]. Роль КЛ полягає в забезпеченні механічної потужності міокардіального матриксу, а також здатності передавати силу, яку генерують кардіоміоцити. У фізіологічних умовах КЛ виступає в якості потенційного інгібітора проліферації фібробластів в екстрацелюлярному матриксі, але при ПРМ його накопичення сприяє диференціюванню та проліферації міофібробластів, що формує хибне коло, збільшуючи синтез КЛ [66].

4.1.3.1 Характер експресії колагену I типу в міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією

Під час візуального огляду зрізів міокарда щурів виявлено, що накопичення КЛ під впливом короткотривалої гіпоксії має характер розподілу, подібний до контрольної групи (рис. 4.6).



Примітка. Стрілками позначені гранули імунореактивного матеріалу.

Рисунок 4.6 – Експресія колагену I типу в міокарді лівого шлуночка тварин групи ПГ15 (А) і ПГ60 (В). Реакція непрямой імунofлюоресценції, збільшення 630^x

Показники вмісту КЛ у щурів ПГ15, порівняно до контролю, були достовірно вище як у поперечних, так і в повздожніх волокнах. У перших на 38,4 %, тоді як у других – на 19,9 %. Показник концентрації змінювався не так рівномірно. У поперечних волокнах він достовірно не змінювався, тоді як у повздожніх був меншим на 10,4 % (табл. 4.5).

Таблиця 4.5 – Експресія колагену I типу в міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією ($M \pm m$)

| Показники | | Експериментальні групи | | |
|----------------------------------|----------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| | | Контроль | ПГ15 | ПГ60 |
| Вміст, Od_{if} | Поперечні волокна | 561,54 $\pm 15,41$ | 777,28 $\pm 21,15^1$ | 905,06 $\pm 37,02^{1,2}$ |
| | Повздожні волокна | 664,63 $\pm 22,06$ | 796,94 $\pm 18,50^1$ | 943,21 $\pm 36,82^{1,2}$ |
| Концентрація, Od_{if}/mkm^2 | Поперечні волокна | 0,094 $\pm 0,002$ | 0,098 $\pm 0,002$ | 0,159 $\pm 0,005^{1,2}$ |
| | Повздожні волокна | 0,111 $\pm 0,003$ | 0,099 $\pm 0,002^1$ | 0,157 $\pm 0,055^{1,2}$ |

Примітка 1. (¹) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників групи ПГ60 ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників групи ПГ15.

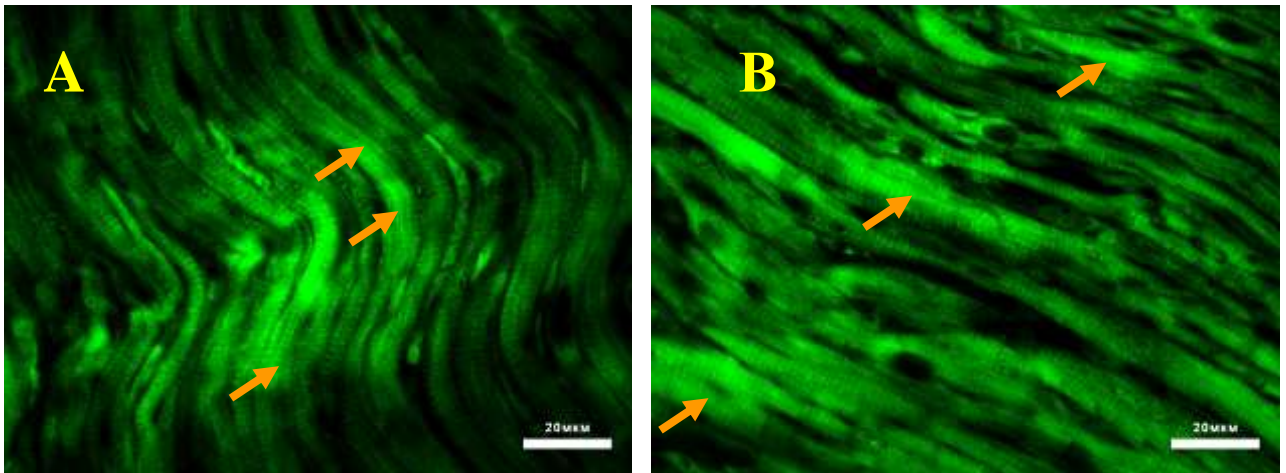
Порівняно до контролю, в щурів ПГ60 вміст та концентрація ІРМ до КЛ були достовірно вище в обох типах волокон: у поперечних збільшення складало 61,2 % і 68,8 %, тоді як у повздожних - 41,9 % та 42,1 %, відповідно (див. табл. 4.5).

Співставлення показників експресії КЛ у щурів з гіпоксією різної тривалості показало, що на 60-у добу, порівняно до 15-денної гіпоксії, відбулося подальше збільшення вмісту та концентрації ІРМ до КЛ в поперечних волокнах міокарда на 16,4 % і 60,8 %, у повздожних – на 18,4 % і 58,6 %, відповідно (див. табл. 4.5).

Отже, інтервальна гіпоксія підвищує накопичення КЛ в міокарді щурів, ступінь вираженості якої залежить від тривалості впливу та характеризується суттєвим збільшенням всіх показників його експресії при 60-денній гіпоксії.

4.1.3.2 Характер експресії колагену I типу в міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією

На оглядових мікрофотографіях зрізів міокарда в щурів із сформованою АГ при візуальному огляді було відмічено, що накопичення КЛ не відрізняється від контрольної групи, але має більш інтенсивну флюоресценцію (рис. 4.7).



Примітка. Стрілками позначені гранули імунореактивного матеріалу.

Рисунок 4.7 – Експресія колагену I типу в міокарді лівого шлуночка тварин групи ЕАГ (А) та ЕСАГ (В). Реакція непрямой імунofлюоресценції, збільшення 630^x

У щурів з ЕАГ, порівняно до показників контрольної групи, вміст та концентрація КЛ були достовірно вище у поперечних волокнах на 48,8 % і 34,1 %, відповідно. У повздовжніх вміст перевищував значення групи порівняння на 31,2 %, в той час як концентрація була менше на 8,6 % (табл. 4.6).

Таблиця 4.6 – Експресія колагену I типу в міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією ($M \pm m$)

| Показники | | Експериментальні групи | | |
|-------------------------------------|-------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| | | Контроль | ЕАГ | ЕСАГ |
| Вміст, $Od_{i\phi}$ | Поперечні волокна | 561,54 $\pm 15,41$ | 835,79 $\pm 25,16^1$ | 941,40 $\pm 22,87^{1,2}$ |
| | Повздожні волокна | 664,63 $\pm 22,06$ | 872,03 $\pm 17,44^1$ | 942,98 $\pm 24,00^{1,2}$ |
| Концентрація, $Od_{i\phi}/mkm^2$ | Поперечні волокна | 0,094 $\pm 0,002$ | 0,126 $\pm 0,003^1$ | 0,114 $\pm 0,003^{1,2}$ |
| | Повздожні волокна | 0,111 $\pm 0,003$ | 0,101 $\pm 0,002^1$ | 0,136 $\pm 0,003^{1,2}$ |

Примітка 1. (¹) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників групи ЕСАГ ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників групи ЕАГ.

Проведений аналіз показників експресії КЛ у групі щурів із ЕСАГ показав, що порівняно з контролем, достовірно перевищення показника вмісту спостерігалось у поперечних волокнах на 67,6 %, а концентрації на 21,2 %. У повздожних волокнах ці показники були достовірно вищими за контрольні на 41,9 % і 23,1 %, відповідно (див. табл. 4.6).

Порівняння цифрових показників експресії КЛ у щурів з ЕСАГ до ЕАГ виявило достовірні відмінності між показниками вмісту та концентрації в обох типах волокон, а саме: в поперечних вище на 12,6 %, але з меншою за ЕАГ концентрацією на 9,6 %, тоді як у повздожних – переважання на 8,1 % і 34,7 %, відповідно.

Отримані результати експресії у міокарді КЛ та проведений порівняльний аналіз її цифрових значень в експериментальних групах показав, що серцевий м'яз відповідає на тривале напруження його накопиченням, яке

значно збільшується за патологічних умов та залежить від особливостей етіопатогенезу експериментальної патології.

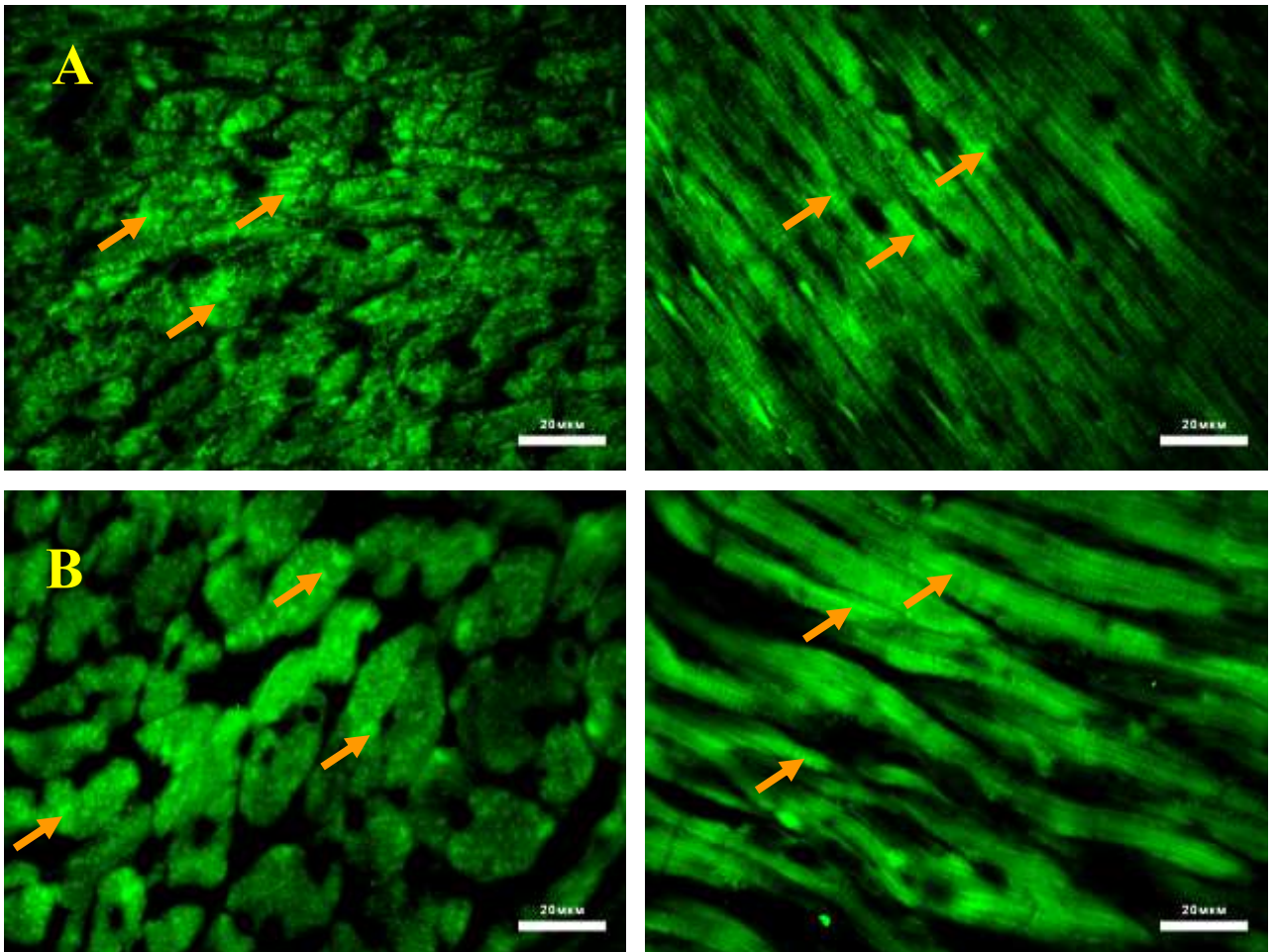
4.1.4 Характер експресії анексину V у міокарді лівого шлуночка щурів експериментальних груп

Апоптоз кардіоміоцитів, хоча і не є основним шляхом загибелі клітин, залучений до зниження функції ЛШ, що призводить до розвитку серцевої недостатності [86]. Він включає протеоліз внутрішньоклітинних компонентів кардіоміоцитів шляхом активації протеолітичних ферментів, що призводить до змін конфігурації плазматичної мембрани (зморщуванням клітин) із конденсацією хроматину.

Одночасно з цим проходить перерозподіл фосфотиділсерину з внутрішньої поверхні мембрани до зовнішньої у бік пошкодження шляхом кальцій-залежного руху, до місця надходження кальцію. АН має високу афінність до фосфотиділсеріна, тому є перспективним маркером молекулярної візуалізації апоптозу [87].

4.1.4.1 Особливості експресії анексину V у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією

При візуальному огляді фотофайлів, отриманих в роботі, виявлені крупні гранули ІРМ до АН, що розташовувались дифузно в цитоплазмі кардіоміоцитів щурів обох експериментальних груп (рис. 4.8).



Примітка. Стрілками позначені гранули імунореактивного матеріалу.

Рисунок 4.8 – Експресія анексину V у міокарді лівого шлуночка тварин групи ПГ15 (А) і ПГ60 (В). Реакція непрямой імунофлюоресценції, збільшення 630^x

Дослідження показників експресії АН в міокарді в групі щурів із ПГ15 показало, що порівняно до контролю, відмічена достовірно менша його концентрація на 11,5 % у поперечних волокнах. Усі інші показники характеризувались лише тенденцією до збільшення (табл. 4.7).

Таблиця 4.7 – Експресія анексину V у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією ($M \pm m$)

| Показники | | Експериментальні групи | | |
|---|-----------------------|------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| | | Контроль | ПГ15 | ПГ60 |
| Вміст, Од _{іф} | Поперечні волокна | 537,55 ±17,32 | 558,59 ±20,39 | 1208,50 ±41,74 ^{1,2} |
| | Повздовжні волокна | 594,05 ±23,69 | 598,78 ±19,24 | 1163,77 ±50,86 ^{1,2} |
| Концентрація, Од _{іф} /мкм ² | Поперечні волокна | 0,093 ±0,002 | 0,082 ±0,002 ¹ | 0,189 ±0,007 ^{1,2} |
| | Повздовжні волокна | 0,087 ±0,003 | 0,093 ±0,002 | 0,169 ±0,005 ^{1,2} |

Примітка 1. (¹) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників групи ПГ60 ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників групи ПГ15.

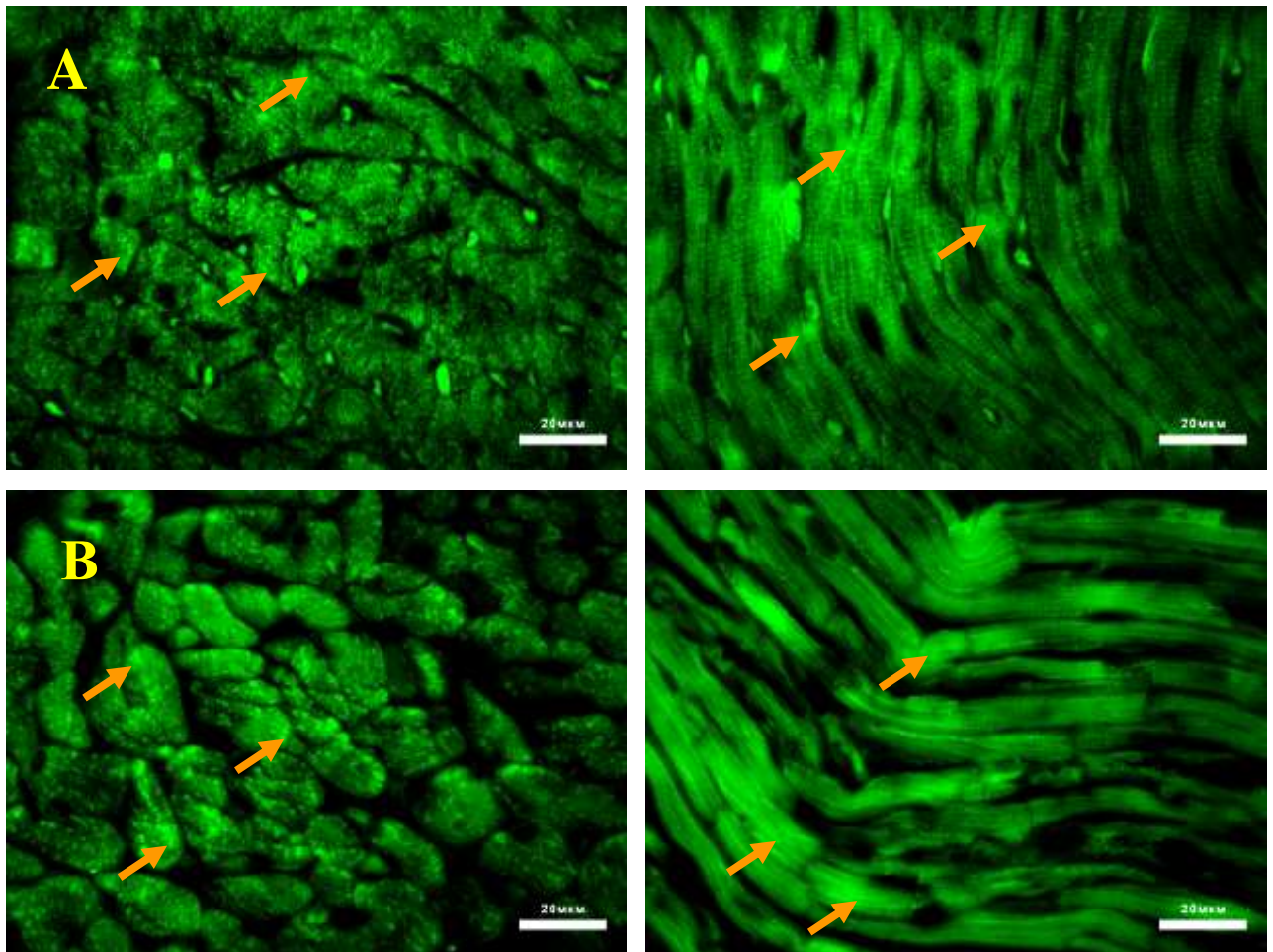
У групі щурів ПГ60, порівняно до контролю, як у поперечних, так і в повздовжніх волокнах міокарда відмічені достовірно вищі всі показники експресії АН: у поперечних волокнах вміст та концентрація - на 124,8 % і 103,6 % , тоді як у повздовжніх – на 95,9 % і 95,5 %, відповідно (див. табл. 4.7).

Міжмодельне порівняння показників експресії АН між ПГ60 і ПГ15 показало прогресування апоптозу, про що свідчило достовірне збільшення вмісту та концентрації АН в обох типах волокон: у поперечних – на 116,4 % і 130,1 %, у повздовжніх – на 94,4 % і 82,5 %, відповідно.

Таким чином, проведене дослідження показало, що короткотривалі гіпоксичні впливи на міокард достовірно зменшують вираженість апоптотичного процесу, тоді як гіпоксичні навантаження протягом 60 діб чинять патологічний вплив на кардіоміоцити та стимулюють їхню загибель шляхом апоптозу.

4.1.4.2 Характер експресії анексину V у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією

Отримані дані візуального огляду зрізів міокарда щурів з експериментальною АГ виявили в обох групах більшу інтенсивність дифузного розподілу гранул ІРМ до АН, порівняно до контролю (рис. 4.9).



Примітка. Стрілками позначені гранули імунореактивного матеріалу.

Рисунок 4.9 – Експресія анексину V у міокарді лівого шлуночка тварин групи ЕАГ (А) та ЕСАГ (В). Реакція непрямой імунофлюоресценції, збільшення 630^x

Порівняно до контролю, в щурів з ЕАГ вміст та концентрація АН були достовірно вище в поперечних волокнах на 58,4 % та 26,3 %, відповідно; у повздожніх – на 52,2 %, а концентрації на 27,7 % (табл. 4.8).

Таблиця 4.8 – Експресія анексину V у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією, ($M \pm m$)

| Показники | | Експериментальні групи | | |
|---|----------------------|------------------------|-------------------------|----------------------------|
| | | Контроль | ЕАГ | ЕСАГ |
| Вміст, Od_{if} | Поперечні волокна | 537,55 $\pm 17,32$ | 851,65 $\pm 32,03^1$ | 883,21 $\pm 45,10^1$ |
| | Повздожні волокна | 594,05 $\pm 23,69$ | 904,25 $\pm 30,26^1$ | 931,97 $\pm 33,54^1$ |
| Концентрація, $Od_{if}/\text{мкм}^2$ | Поперечні волокна | 0,093 $\pm 0,002$ | 0,117 $\pm 0,004^1$ | 0,170 $\pm 0,005^{1,2}$ |
| | Повздожні волокна | 0,087 $\pm 0,003$ | 0,111 $\pm 0,004^1$ | 0,158 $\pm 0,003^{1,2}$ |

Примітка 1. (¹) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників групи ЕСАГ ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників групи ЕАГ.

У щурів ЕСАГ вміст АН у поперечних волокнах був вище значень контролю на 64,3 %, а концентрація на 83 %. У повздожних волокнах ці показники перевищували показники контролю на 56,9 % і 82,2 %, відповідно (див. табл. 4.8).

Порівняння показників вмісту та концентрації ІРМ до АН у щурів із ЕСАГ та ЕАГ виявило наступні особливості: вміст достовірно не відрізнявся в обох типах волокон, в той час як показник концентрації був більший у поперечних волокнах на 44,9 %, тоді як у повздожних – на 42,7 %.

Таким чином, можна констатувати, що вплив АГ на міокард, як есенціальної (ЕАГ) за етіологією, так і вторинної, ендокринно-асоційованої (ЕСАГ), характеризується індукцією та прогресуванням апоптозу. Ступінь вираженості загибелі клітин показує залежність від етіології та патогенезу АГ, що ймовірно обумовлене специфікою механізмів розвитку та прогресування патології: меншої при ЕАГ через переважне підвищення судинного опору, при

ЕСАГ – сумації руйнуючого впливу на серцевий м'яз не тільки перевантаженням тиском і об'ємом, але й прямого ураження глюкокортикоїдами.

4.2 Коефіцієнт тайтин-колагенового співвідношення

Пасивна напруга міокарда визначається КЛ і ТТ. ТТ виступає в ролі пружини усередині саркомера. При слабкому розтяганні м'язу, у фізіологічних межах, ТТ забезпечує основну частину пасивної напруги, тоді як при великих ушкодженнях сітка колагенових волокон витягується уздовж осі розтягування і дає все більший внесок в пасивну напругу [198].

Для оцінки ступеня вираженості фіброзних змін стінки ЛШ та жорсткості міокарда був розрахований тайтин-колагеновий коефіцієнт, як співвідношення вмісту (концентрації) ТТ у міокарді до вмісту (концентрації) КЛ. Запропонований коефіцієнт дозволив оцінити схильність до прогресування фібротичних змін у міокарді щурів експериментальних груп (рис. 4.10).

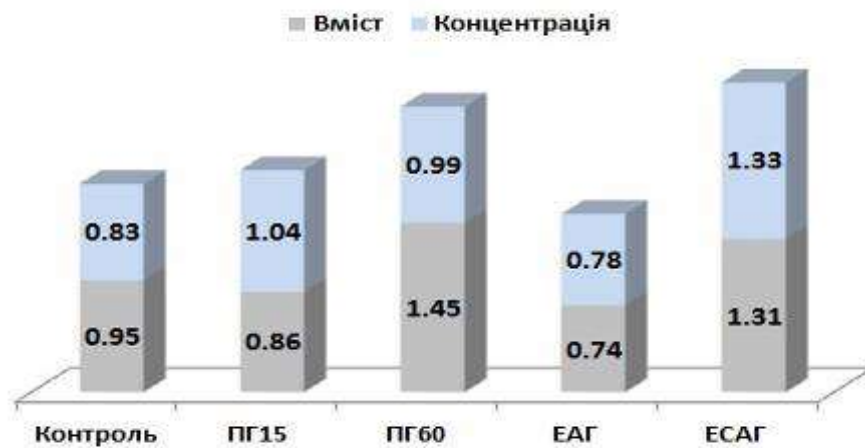


Рисунок 4.10 – Коефіцієнт тайтин-колагенового співвідношення

Проведене вивчення коефіцієнтів показало, що в щурів групи ПГ15 зберігається нормальне співвідношення ТТ до КЛ, що свідчить про збереження міокардіальної пружності в межах норми і компенсованість

ремоделювання. В той час, у групі ПГ60 виявлено значне збільшення коефіцієнтів за вмістом ТТ до КЛ, порівняно до контролю (див. рис. 4.10). Ймовірно, це свідчить про розвиток фіброзу за рахунок збільшення вмісту та концентрації КЛ, але, разом з тим, і значним підвищенням експресії ТТ, що, за даними інших науковців, пов'язано з дією $\text{NfY1}\alpha$ та розвитком системного структурного сліду адаптації [201].

При експериментальній АГ у щурів ЕАГ був відмічений нижчий коефіцієнт, порівняно до контролю, що вказує на поступове формування фіброзу з підвищенням жорсткості міокарда. У випадку з щурами ЕСАГ був встановлений зворотній ефект: доведений факт значного підвищення коефіцієнту, порівняно до контролю та групи ЕАГ (див. рис. 4.10), що може бути пов'язане із компенсаторною модифікацією гену та структури ТТ [202] або надмірним накопиченням ТТ. Тобто, отримані в щурів ЕСАГ зміни коефіцієнту мають зв'язок з особливостями етіопатогенезу АГ у цієї моделі. Такі зміни вказують на формування поступового протеїнового дисбалансу в міокарді, що в подальшому може призвести до виснаження компенсаторних механізмів та формування діастолічної дисфункції ЛШ.

Резюме

Загальний результат проведеного комплексного дослідження, а саме оцінка характеру ремоделювання міокарда ЛШ щурів експериментальних груп за змінами маркерного профілю дозволив зробити декілька проміжних висновків.

Важливим результатом дослідження ефекту впливу короткотривалої 15-денної гіпоксії стало отримання цілісної картини морфо-структурних перебудов у серцевому м'язі. Імунофлюоресцентним методом було встановлено, що в щурів ПГ15 результатом фізіологічного стимулюючого гіпоксичного впливу на ССС стала активація компенсаторних механізмів, що включали *розвиток помірної гіпертрофії* кардіоміоцитів, про що свідчив

достовірно більший вміст кардіотрофіну-1 у повздовжніх волокнах; *помірні зміни пружно-еластичних властивостей міокарда* за рахунок збільшення вмісту та концентрації тайтину та вмісту колагену I типу в обох типах волокон; *зниження інтенсивності загибелі кардіоміоцитів*, ознакою чого було зменшення концентрації анексину V у поперечних волокнах на 11,5 %. Таке співвідношення маркерів свідчить про початок формування *гіпертрофічного типу ремоделювання* міокарда у відповідь на короткотривалі гіпоксичні впливи, який носить захисно-компенсаторний характер, проявляється збереженням тайтин-колагенового співвідношення та зменшенням апоптозу, порівняно до контролю.

Довготривала гіпоксична експозиція протягом 60 діб призвела до патологічних морфо-структурних перебудов міокарда лівого шлуночка щурів із значним збільшенням експресії усіх досліджуваних маркерів. Такі зміни маркерного профілю свідчать про виражену *гіпертрофію* кардіоміоцитів, індикаторами якої виступають більші за контроль вміст і концентрація кардіотрофіну-1 в обох типах волокон – на 58,8 % і 65,8 % і 73,6 % і 56,9 %, відповідно; *прояви збільшення жорсткості міокарда із значним фіброзом*, про що свідчать достовірно більші за контроль значення вмісту і концентрації тайтину у поперечних волокнах на 132,8 % і 101,9 %, а у повздовжніх волокнах – а 124,9 % та 71,2 %, відповідно, разом із підвищення експресії колагену I типу (вміст і концентрація в поперечних волокнах більша за контроль на 61,2 % та 68,8 %, а в повздовжніх – на 41,9 % та 42,1 %, відповідно) та збільшений коефіцієнт тайтин-колагенового співвідношення; *масивний апоптоз кардіоміоцитів*, оцінкою ступеня якого виступили більші за контроль рівні вмісту і концентрації анексину V в обох типах волокон майже в 2 рази. Описані зміни маркерного профілю ремоделювання міокарда в щурів ПГ60 дає змогу припустити *фіброзно-апоптотичний тип ПРМ*.

Розвиток стійкого підвищення артеріального тиску у щурів із експериментальною артеріальною гіпертензією в обох моделях призвело до формування патологічного ремоделювання міокарда, проявом якого стало

збільшення експресії усіх досліджуваних маркерів. Слід відмітити, що при есенціальній артеріальній гіпертензії у щурів ЕАГ ремоделювання характеризувалося *помірною гіпертрофією* (вміст і концентрація кардіотрофіну-1 у поперечних волокнах більші за контроль на 27,4 % та 32,2 %, а у повздожних волокнах – на 42,6 % і 35,1 %, відповідно); *формуванням фібротичних змін з підвищенням жорсткості міокарда*, ознаками чого було збільшення вмісту та концентрації тайтину у поперечних волокнах на 12,2 % та 23 % ,відповідно, вмісту колагену І типу в обох волокнах на 49 % і 31 %, відповідно, з більшою його концентрацією на 34 % у поперечних волокнах, що супроводжувалось зниження коефіцієнту тайтин-колагенового співвідношення, порівняно до контролю; *помірною апоптотичною активністю в міокарді* (більші за контрольні показники вмісту та концентрації анексину V у поперечних волокнах на 58,4 % і 26,3 %, у повздожних волокнах – на 52,2 % і 27,7 %, відповідно). Виявлені структурні зміни в серцевому м'язі відповідають *гіпертрофічно-фіброзному типу ремоделювання з помірно вираженими процесами апоптозу*.

При експериментально змодельованій вторинній ендокринно-асоційованій АГ у щурів ЕСАГ вміст і концентрація всіх маркерів ремоделювання достовірно були більшими за контроль. Такі зміни характеризують патологічне ремоделювання міокарда, що включає: *значну гіпертрофію кардіоміоцитів* (показники експресії кардіотрофіну-1 у поперечних волокнах більші на 80,3 % і 76,6 %, а в повздожних волокнах – на 80,3 % і 61,5 %); *виражений фіброз із значним підвищенням жорсткості міокарда*, оцінити які дозволили більші показники експресії тайтину у поперечних волокнах на 115,5 % і 110,2 %, а у повздожних – на 107,1 % і 86,2 %, відповідно, що супроводжувалось більшим вмістом і концентрацією колагену І типу в поперечних волокнах на 67,6 % і 21,2 %, а у повздожних – на 41,9 % і 23,1 %, відповідно, як результат - суттєве підвищення коефіцієнту тайтин-колагенового співвідношення; *значною вираженістю виразністю апоптотичного процесу* – вміст і концентрація анексину V більші за контроль

у поперечних волокнах на 64,3 % і 83 %, а у повздовжніх волокнах – на 56,9 % і 82,2 %, відповідно, що свідчить про відповідає *гіпертрофічно-апоптотичний тип ремоделювання міокарда*.

Матеріали розділу відображені у 2 статтях [192-193].

РОЗДІЛ 5

ОСОБЛИВОСТІ СТАНУ СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ В МІОКАРДІ ЛІВОГО ШЛУНОЧКА ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ РЕМОДЕЛЮВАННЯМ

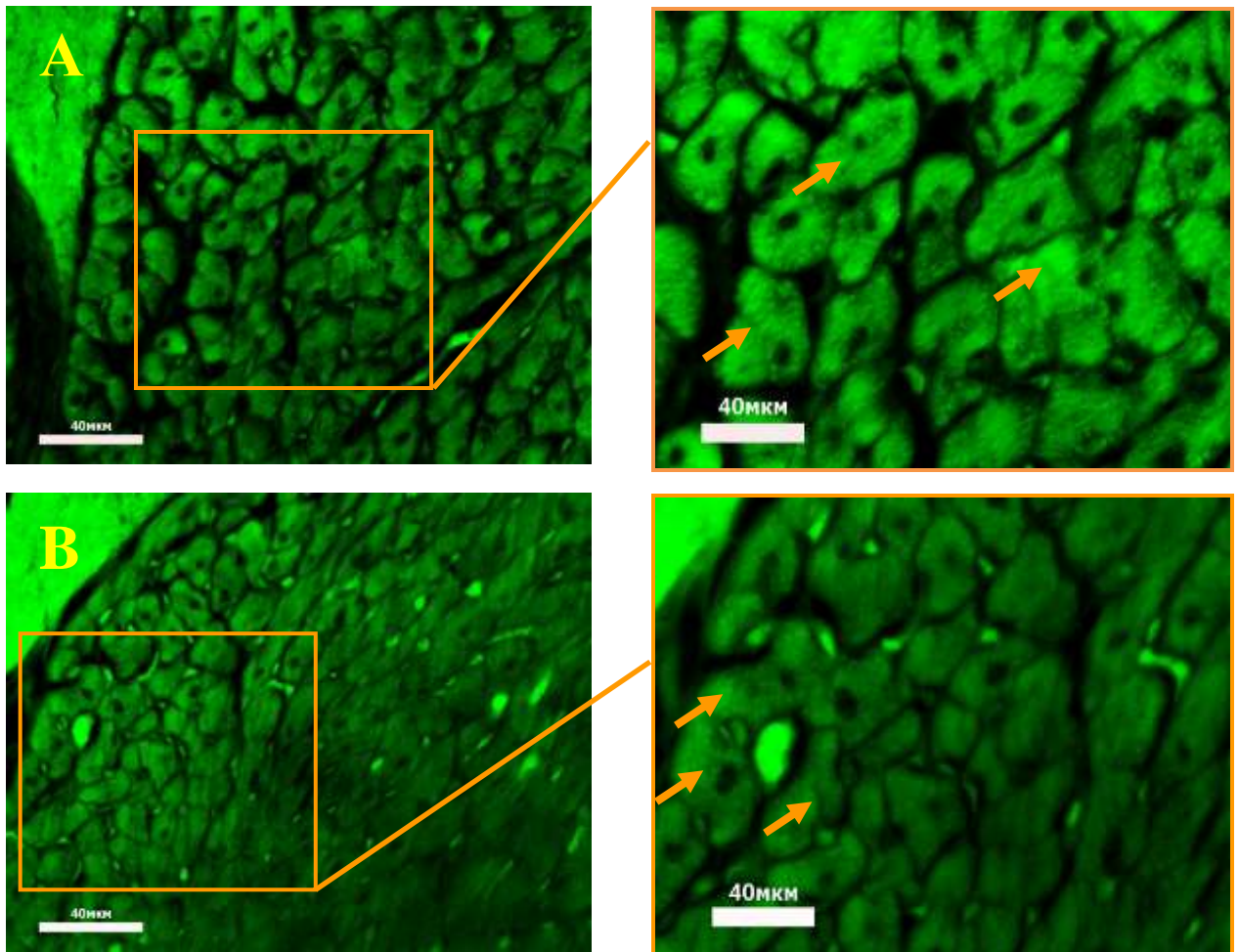
У представленому розділі наведені результати проведених досліджень стану системи NO в міокарді ЛШ щурів з експериментальним ремоделюванням серцевого м'язу. Для цього було визначені кількісні характеристики експресії та характер ізоформного профілю NOS, а саме нейрональної, індукцйбельної та ендотеліальної NOS за допомогою імунофлюоресцентного методу з визначенням показників вмісту флюоресценції та концентрації IPM.

Для отримання цілісної картини стану системи NO, встановлення характеру змін та спрямованості процесів метаболізму газотрансмітерної системи NO було визначено концентрацію мРНК ізоформ NOS. Біохімічним методом з реактивом Грісса визначили концентрацію нітритів у гомогенатах фрагментів міокарда, імуноферментним методом дослідили концентрацію нітротирозину.

Сьогодні вже добре відомо, що NO є унікальним та універсальним газотрансмітером, біорегулятором клітинного метаболізму та міжклітинних взаємодій. Цікавим є те, що NO чинить різноспрямований вплив на біологічні процеси на різних тканинних рівнях. Його ефекти залежать від концентрації у клітинах, типу ізоформи ензиму NOS, що його утворює, наявності кисню, метаболітів оксидативного стресу й антиоксидантів [203]. Логічно припустити, що головним «диригентом», який має прямий вплив на кількість газотрансмітера в клітині, його сигнальну функцію та спрямованість активності в бік фізіологічний чи патологічний, повинен бути ізоензим NOS.

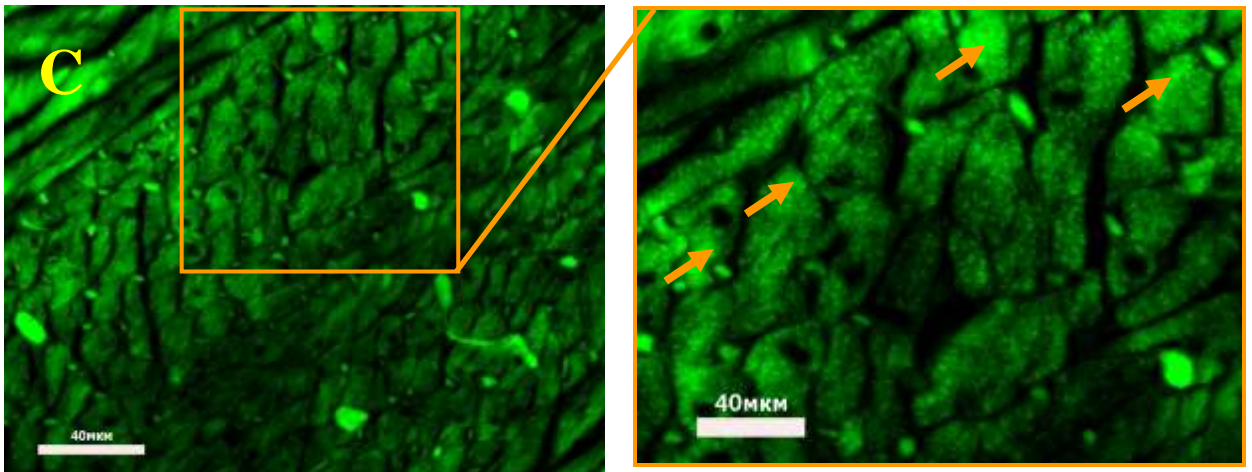
5.1 Характер ізоформного профілю NOS у міокарді лівого шлуночка щурів експериментальних груп

Після проведеного імуофлюоресцентного дослідження було виявлено, що в міокарді ЛШ щурів імуореактивний матеріал до усіх 3-х ізоформ розподілений переважно дифузно в формі гранул (рис. 5.1).



- Примітка 1. Стрілками позначені гранули імуореактивного матеріалу.
 Примітка 2. А – Експресія ІРМ до nNOS у міокарді.
 Примітка 3. В – Експресія ІРМ до iNOS у міокарді.
 Примітка 4. С – Експресія ІРМ до eNOS у міокарді.

Рисунок 5.1 – Експресія ізоформ NOS у міокарді лівого шлуночка контрольних тварин. Реакція непрямой імуофлюоресценції, збільшення 400^x



- Примітка 1. Стрілками позначені гранули імунореактивного матеріалу.
 Примітка 2. А – Експресія IPM до nNOS у міокарді.
 Примітка 3. В – Експресія IPM до iNOS у міокарді.
 Примітка 4. С – Експресія IPM до eNOS у міокарді.

Рисунок 5.1, аркуш 143

5.1.1 Патогенетичні особливості експресії нейрональної синтази оксиду азоту (nNOS) в міокарді лівого шлуночка щурів експериментальних груп

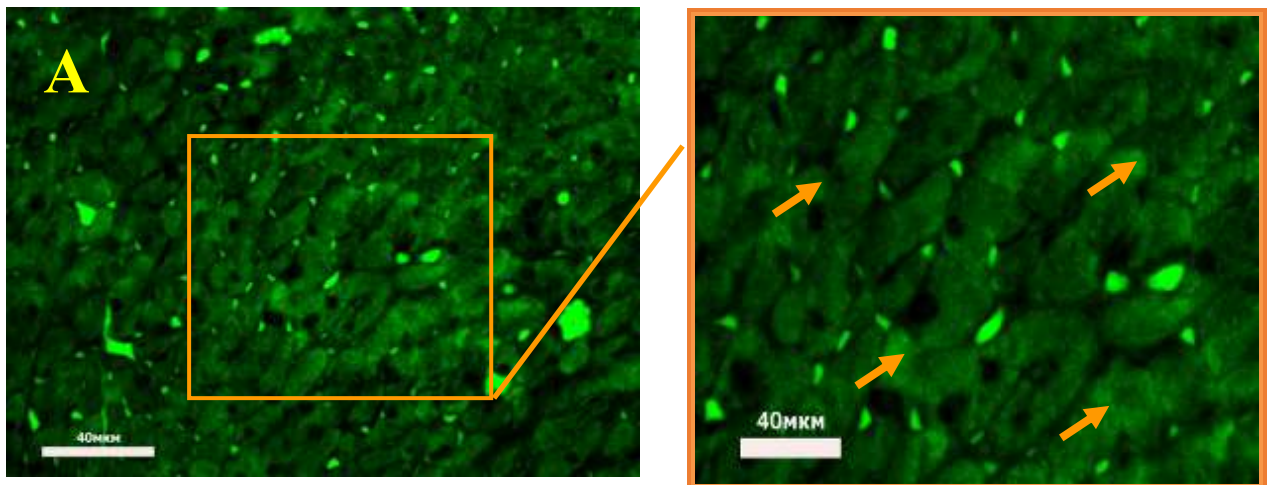
Однією з найважливіших ізоформ для CCC є nNOS. Вона виступає в ролі основного ендогенного джерела міокардіального NO. nNOS забезпечує швидку та ситуативну зміну рівня NO у відповідь на зовнішньоклітинні сигнали медіаторів, гормонів та біологічно активних речовин. Кардіопротективна роль nNOS здійснюється кількома механізмами. Завдяки експресії nNOS у нервових закінченнях локальної провідної системи серця вона чинить контроль за парасимпатичною та симпатичною регуляцією серцевого ритму, впливає на скоротливість та релаксацію кардіоміоцитів. Слід також відмітити, що nNOS локалізується і у гладкій мускулатурі коронарних артерій, за рахунок чого регулює локальний або місцевий кровообіг [204].

Цікавим є той факт, що експресія nNOS збільшується в початковій стадії дії пошкоджуючого фактору на серцевий м'яз, що дозволяє їй не тільки виконувати кардіопротективну роль, а й виступати в ролі біомаркеру асимптоматичних пошкоджень. Так, наприклад, при початкових проявах АГ,

коли збільшений тиск на стінку ЛШ вже запускає механізми ремоделювання, а симптомів АГ у пацієнта ще немає [149]. Доведеним також є вплив цієї ізоформи на АТ та баланс рідини через реалізацію центрального та периферичного механізмів, регулюючи симпатичний відділ нервової системи та модуляції вивільнення реніну в нирках. Ці механізми, в свою чергу, впливають на спрямованість ремоделювання міокарда та реалізують структурні перебудови геометрії шлуночків серця [205].

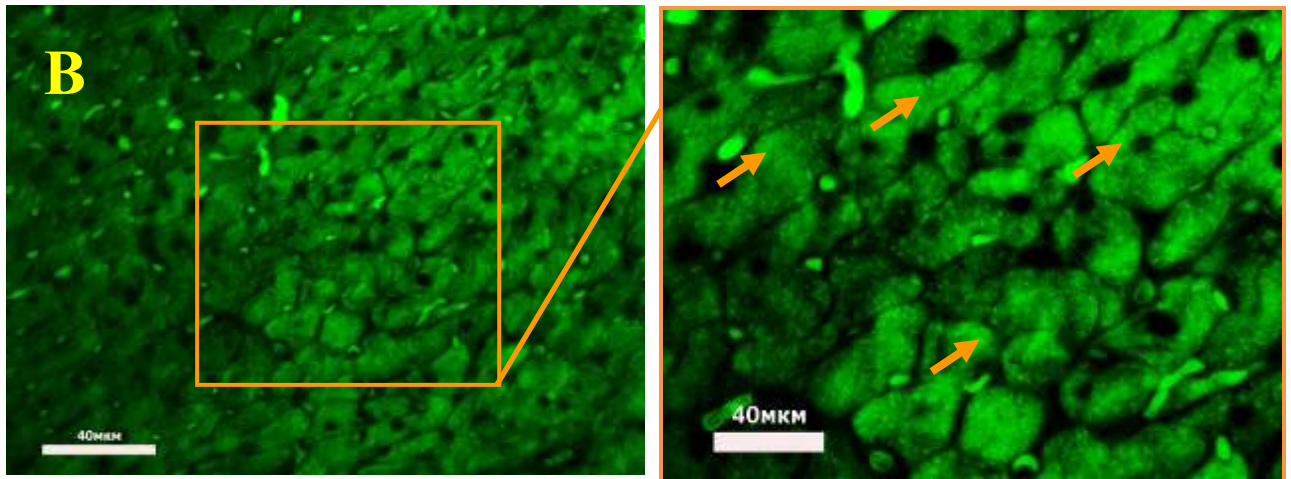
5.1.1.1 Особливості експресії nNOS у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією

Аналіз цифрових значень показників експресії nNOS довів, що в групі щурів із ПГ15 (рис. 5.2-А), порівняно з контролем, у поперечних волокнах відмічався достовірно менший вміст ІРМ до nNOS на 20,6 % без зміни її концентрації, в той час, як у поздовжніх - достовірних змін виявлено не було (табл. 5.1).



Примітка. Стрілками позначені гранули імунореактивного матеріалу.

Рисунок 5.2 – Експресія nNOS у міокарді лівого шлуночка тварин групи ПГ15 (А) та ПГ60 (В). Реакція непрямой імуофлюоресценції, зб. 400х



Примітка. Стрілками позначені гранули імунореактивного матеріалу.

Рисунок 5.2, аркуш 145

Таблиця 5.1 – Експресія nNOS у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією, ($M \pm m$)

| Показники | | Експериментальні групи | | |
|-------------------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|------------------------------|
| | | Контроль | ПГ15 | ПГ60 |
| Вміст, $О_{д_{if}}$ | Поперечні волокна | 1197,97 $\pm 19,74$ | 951,74 $\pm 25,94^1$ | 1501,83 $\pm 33,75^{1,2}$ |
| | Повздовжні волокна | 1235,99 $\pm 29,58$ | 1218,57 $\pm 30,78$ | 1800,81 $\pm 26,37^{1,2}$ |
| Концентрація, $О_{д_{if}}/мкм^2$ | Поперечні волокна | 0,428 $\pm 0,013$ | 0,413 $\pm 0,013$ | 0,624 $\pm 0,024^{1,2}$ |
| | Повздовжні волокна | 0,426 $\pm 0,018$ | 0,464 $\pm 0,021$ | 1,048 $\pm 0,054^{1,2}$ |

Примітка 1. (1) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Примітка 2. (2) – достовірна різниця показників групи ПГ60 ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників групи ПГ15.

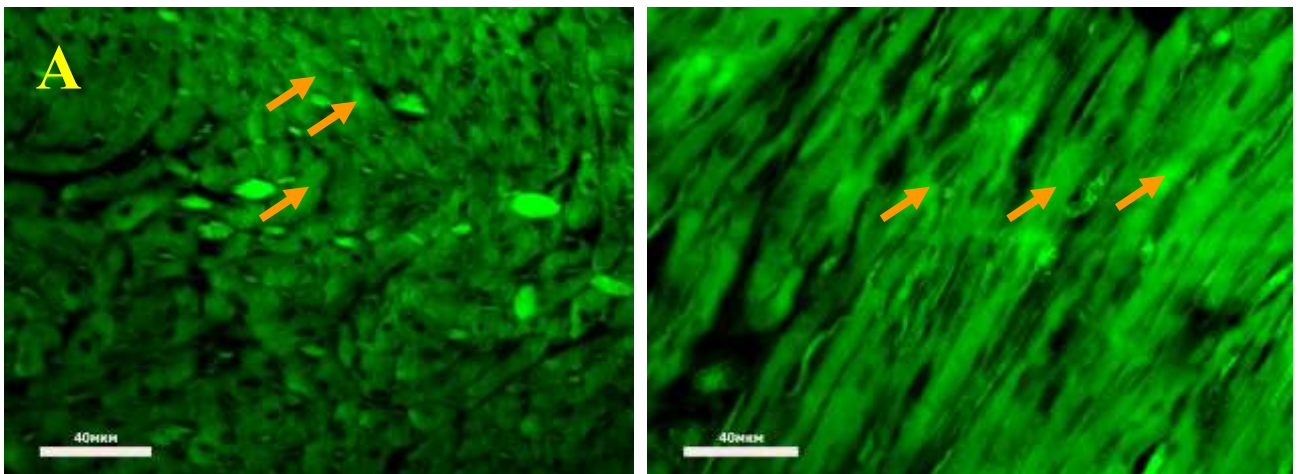
У групі щурів ПГ60, порівняно до контролю, показники експресії ІРМ до nNOS (рис.5.2-В) показали більш значні зміни, ніж у групі із ПГ15. При цьому в поперечних волокнах відмічався достовірно більший вміст ІРМ до nNOS на

25,4 %, концентрації на 45,8 %. У поздовжніх волокнах вміст pNOS був достовірно вище на 45,7 %, а концентрація на 146,2 % (див. табл. 5.1).

Відповідно, інтервальна гіпоксія змінює характер експресії pNOS у міокарді щурів, що залежить від тривалості впливу. Так, при 15-денні тренування призводять до меншого за контроль вмісту та концентрації IPM, тоді як 60-денний вплив, навпаки, значно збільшує показники IPM до pNOS у всіх досліджуваних параметрах міокарда.

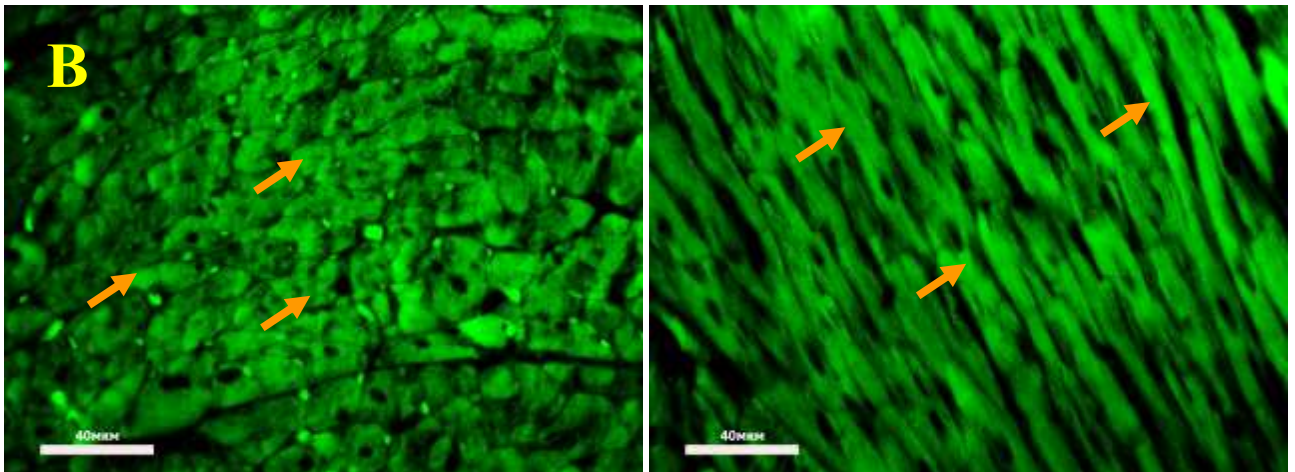
5.1.1.2 Особливості експресії pNOS у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією

Проведене дослідження показало, що в щурів ЕАГ, порівняно до контролю, показник вмісту IPM до pNOS у поперечних волокнах був достовірно більшим на 5,7 %, тоді як концентрація достовірно не змінювалась (рис. 5.3-А). У поздовжніх волокнах вміст pNOS достовірно був вищим на 21,6 %, а концентрація - на 23,1 % (табл. 5.2).



Примітка. Стрілками позначені гранули імунореактивного матеріалу.

Рисунок 5.3 – Експресія pNOS у міокарді лівого шлуночка тварин групи ЕАГ (А) та ЕСАГ (В). Реакція непрямой імунофлюоресценції, зб. 400х



Примітка. Стрілками позначені гранули імунореактивного матеріалу.

Рисунок 5.3, аркуш 147

Таблиця 5.2 – Експресія pNOS у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією, ($M \pm m$)

| Показники | | Експериментальні групи | | |
|------------------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|------------------------------|
| | | Контроль | ЕАГ | ЕСАГ |
| Вміст, OD_{if} | Поперечні волокна | 1197,97 $\pm 19,74$ | 1266,34 $\pm 31,28^1$ | 1369,06 $\pm 21,68^{1,2}$ |
| | Повздовжні волокна | 1235,99 $\pm 29,58$ | 1503,16 $\pm 30,26^1$ | 1338,33 $\pm 22,22^{1,2}$ |
| Концентрація, $OD_{if}/\mu m^2$ | Поперечні волокна | 0,428 $\pm 0,013$ | 0,455 $\pm 0,014$ | 0,575 $\pm 0,018^{1,2}$ |
| | Повздовжні волокна | 0,426 $\pm 0,018$ | 0,524 $\pm 0,014^1$ | 0,527 $\pm 0,016^1$ |

Примітка 1. (1) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Примітка 2. (2) – достовірна різниця показників групи ЕСАГ ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників групи ЕАГ.

Вміст IPM до pNOS у повздовжніх волокнах щурів групи ЕСАГ був достовірно більшим на 14,3 %, а концентрація на 34,4 % (див. рис. 5.3-В). У

поздовжніх волокнах ці показники також достовірно були вищими на 8,3 % та 23,8 %, відповідно (див. табл. 5.2).

Встановлений в дослідженні факт, що сформована АГ, незалежно від її етіопатогенетичних особливостей, супроводжується збільшенням у міокарді вмісту та концентрації ІРМ до nNOS, дає змогу припустити роль цієї ізоформи в розвитку патології та доводить значення nNOS у формуванні адаптаційно-компенсаторних механізмів при надмірних впливах на ССС.

5.1.2 Особливості експресії індукбельної синтази оксиду азоту (iNOS) у міокарді лівого шлуночка щурів експериментальних груп

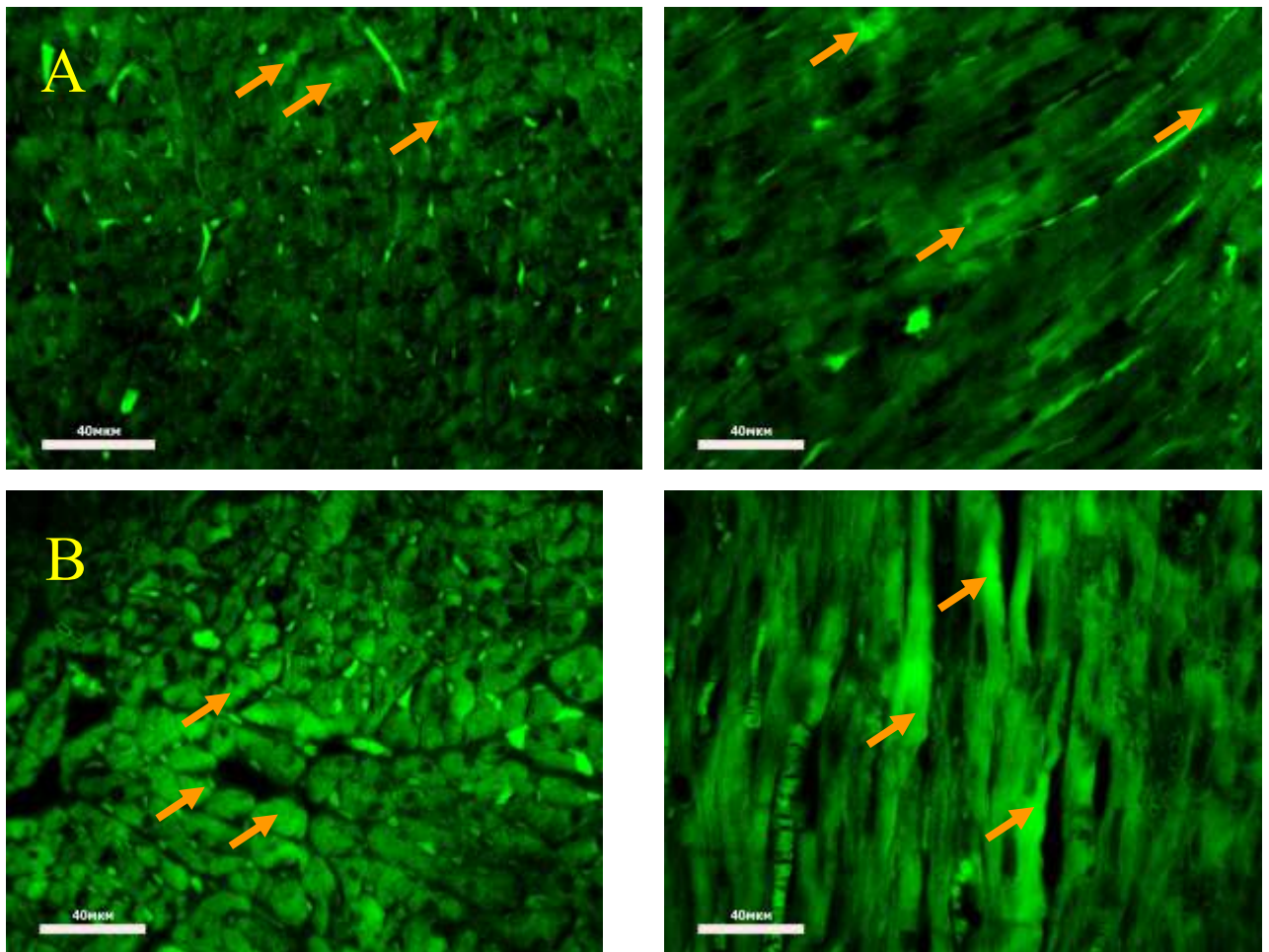
На думку багатьох авторів, індукбельна NOS викликає синтез високих рівнів NO, що чинить цитотоксичний і кардіодепресивний вплив [206].

Дослідниками було доведено, що при патологічних станах ССС реєструється зростання активності iNOS із накопиченням великої кількості NO. Все це призводить до міокардіальної дисфункції, яка посилюється ендотеліальною дисфункцією та нітритативним стресом. Було встановлено, що негативними ефектами iNOS є перевантаження клітин Ca^{2+} , проапоптичні властивості, пригнічення активності антиоксидантних систем, дисбаланс судинного контролю та збільшення проникності судин [207].

Існує припущення про залучення iNOS у фізіологічні механізми функціонування міокарда, що було продемонстровано в експерименті на ізольованих серцях мишей з виключеним геном eNOS: процеси відновлення після ішемії перебігали швидше, при цьому зона інфаркту була меншою, порівняно із групою контролю [208]. Більш сучасним припущенням є здатність iNOS до захисту від «приглушення» міокарда, спричиненого пізнім пре кондиціюванням, індукованим ішемією, паралельно виявляючи антиоксидантний і вазодилататорний ефект [169].

5.1.2.1 Особливості експресії iNOS у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією

Дослідження показників експресії iNOS в міокарді щурів групи ПГ15 (рис. 5.4-А) показало, що, порівняно з контролем, у поперечних волокнах спостерігалися більший вміст та концентрація ІРМ до iNOS на 7,2 % та 28,1 %, відповідно; у поздовжніх переважання вмісту склало 14,7 %, а концентрації – на 31,2 % (табл. 5.3).



Примітка. Стрілками позначені гранули імунореактивного матеріалу до iNOS.

Рисунок 5.4 – Експресія iNOS у міокарді лівого шлуночка тварин групи ПГ15 (А) та ПГ60 (В). Реакція прямої імуофлюоресценції, зб. 400^x

Таблиця 5.3 – Експресія іNOS у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією, ($M \pm m$)

| Показники | | Експериментальні групи | | |
|---|----------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| | | Контроль | ПГ15 | ПГ60 |
| Вміст, Od_{if} | Поперечні волокна | 1102,14 $\pm 16,78$ | 1181,72 $\pm 36,62^1$ | 814,59 $\pm 27,95^{1,2}$ |
| | Повздожні волокна | 1185,21 $\pm 21,95$ | 1359,77 $\pm 32,14^1$ | 790,30 $\pm 22,99^{1,2}$ |
| Концентрація, $Od_{if}/\text{мкм}^2$ | Поперечні волокна | 0,380 $\pm 0,008$ | 0,487 $\pm 0,021^1$ | 0,266 $\pm 0,009^{1,2}$ |
| | Повздожні волокна | 0,402 $\pm 0,015$ | 0,527 $\pm 0,020^1$ | 0,270 $\pm 0,009^{1,2}$ |

Примітка 1. (¹) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

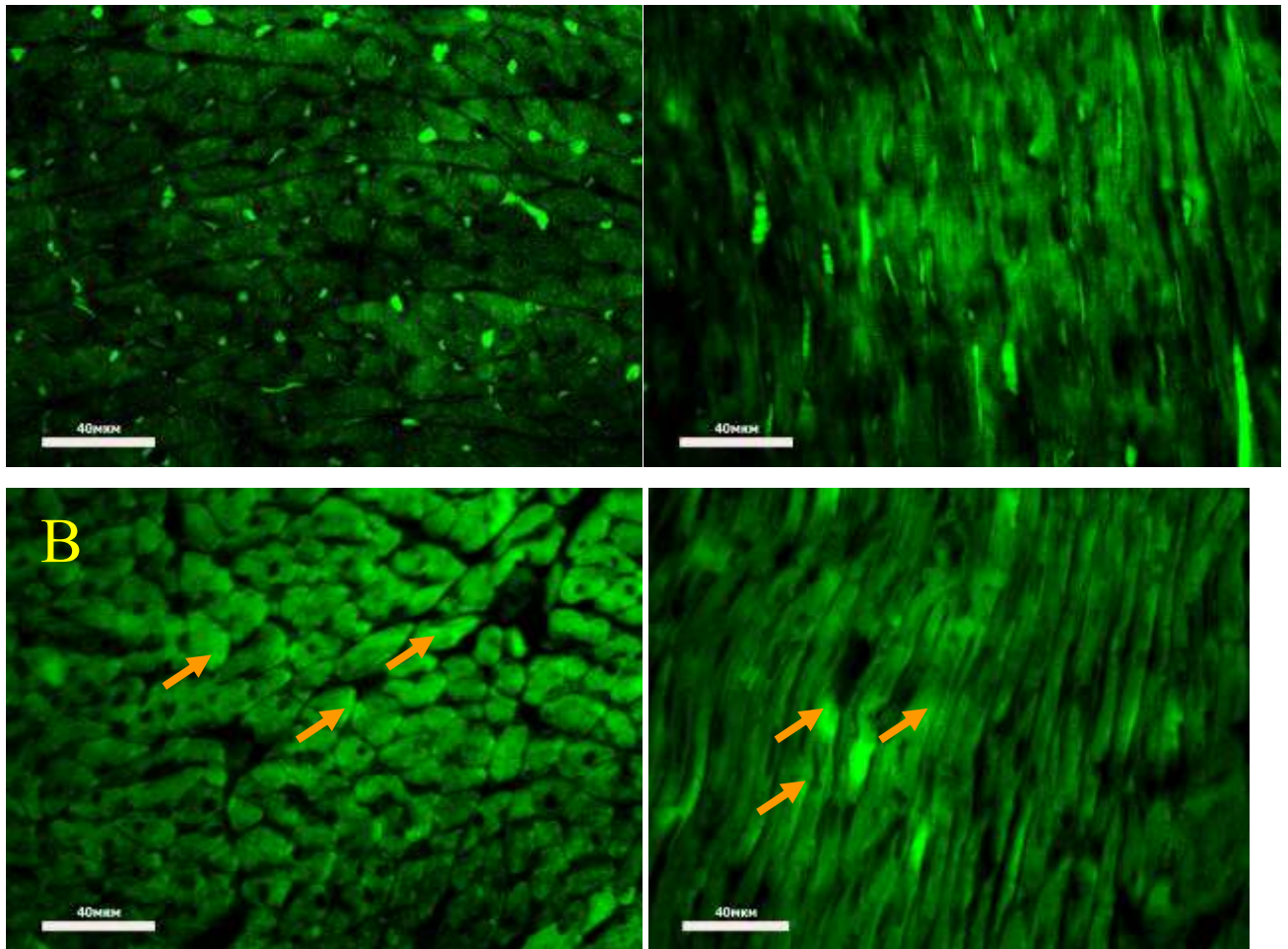
Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників групи ПГ60 ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників групи ПГ15.

У групі щурів ПГ60 (див. рис. 5.4-В) було визначено, що, порівняно до контролю, як у поперечних, так і в повздожних волокнах міокарда, відмічалися достовірно менші значення вмісту та концентрації ІРМ до іNOS. У поперечних волокнах досліджувані показники були меншими на 26,1 % і 30 %, тоді як у повздожних – на 33,3 % і 32,8 % ,відповідно (див. табл. 5.3).

Аналіз результатів проведеного дослідження показав, що в міокарді характер експресії іNOS при гіпоксичних впливах має пряму залежність від тривалості процесу. При 15-денних тренуваннях відбувається збільшення показників імунореактивності, тоді як 60-денний вплив знижує вміст ензиму, що можна розглядати як важливий механізм, спрямований на зменшення активності фактору пошкодження клітин.

5.1.2.2 Особливості експресії iNOS у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією

У щурів з експериментальною АГ вміст та концентрація iNOS була достовірно більшою, порівняно до контролю. Так, вміст і концентрація ІРМ до iNOS у поперечних волокнах щурів ЕАГ перевищували значення контролю на 19,6 % та 22,6 %, відповідно (рис. 5.5-А). Показник вмісту в повздовжніх волокнах був вище на 28,7 %, а концентрації - на 33,1 % (табл. 5.4).



Примітка. Стрілками позначені гранули імунореактивного матеріалу.

Рисунок 5.5 – Експресія iNOS у міокарді лівого шлуночка тварин групи ЕАГ (А) та ЕСАГ (В). Реакція непрямой імунofлюоресценції, зб. 400^x

Таблиця 5.4 – Експресія іNOS у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією, ($M \pm m$)

| Показники | | Експериментальні групи | | |
|----------------------------------|----------------------|------------------------|--------------------------|------------------------------|
| | | Контроль | ЕАГ | ЕСАГ |
| Вміст, Od_{if} | Поперечні волокна | 1102,14 $\pm 16,78$ | 1318,71 $\pm 28,08^1$ | 1305,75 $\pm 13,23^1$ |
| | Повздожні волокна | 1185,21 $\pm 21,95$ | 1525,86 $\pm 30,14^1$ | 1285,56 $\pm 13,96^{1,2}$ |
| Концентрація, Od_{if}/mkm^2 | Поперечні волокна | 0,380 $\pm 0,008$ | 0,466 $\pm 0,012^1$ | 0,460 $\pm 0,009^1$ |
| | Повздожні волокна | 0,402 $\pm 0,015$ | 0,535 $\pm 0,015^1$ | 0,451 $\pm 0,009^{1,2}$ |

Примітка 1. (¹) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників групи ЕСАГ ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників групи ЕАГ.

Аналіз цифрових даних експресії іNOS у щурів ЕСАГ показав, що вміст іNOS у поперечних волокнах міокарда був вищим, порівняно до контролю, на 18,3 %, а концентрація – на 21 % (див. рис. 5.5-В). У повздожних волокнах ці показники перевищували значення контролю на 8,5 % і 12,2 %, відповідно (див. табл. 5.4).

Таким чином, при АГ, незалежно від її етіології та патогенезу, відбувається підвищення експресії іNOS у міокарді, що дає змогу розглядати цю ізоформу як один з важливих факторів пошкодження кардіоміоцитів та підтримання патологічного процесу.

5.1.3 Особливості експресії ендотеліальної синтази оксиду азоту (eNOS) в міокарді лівого шлуночка щурів експериментальних груп

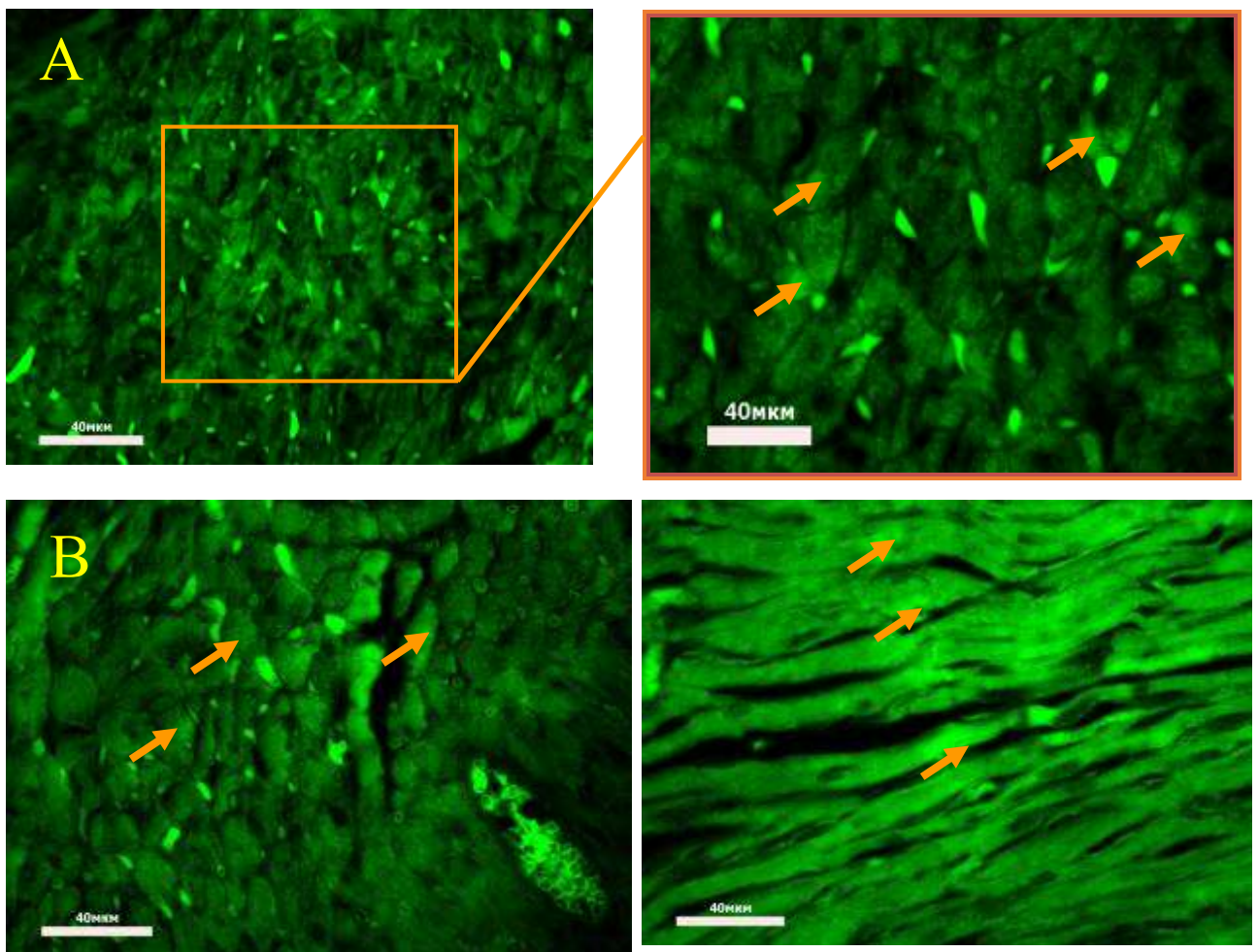
Сьогодні більшість дослідників відводять eNOS головну роль в підтримці базисного рівня NO. Її асоціюють з реалізацією механізмів локальної ендотеліальної цитопротекції та підтримці судинного гомеостазу. Крім вазодилатації, NO, що продукується eNOS, являє собою потужний інгібітор агрегації і адгезії тромбоцитів до судинної стінки, захищає від тромбозу, попереджає вивільнення тромбоцитарних факторів росту, які стимулюють проліферацію гладкої мускулатури судин [209]. eNOS – Ca^{2+} -залежна, конституційна ізоформа ферменту NOS, яка має здатність впливати на функції міокарда, незалежно від коронарного кровообігу. Доведено, що зниження її активності призводить до недостатності NO, що є ключовим у патогенезі ішемічної хвороби серця та цереброваскулярної патології [210].

Значущим встановленим фактом є залежність експресії eNOS від надлишкової кількості H_2O_2 . Пероксид водню – дисмутаційний продукт кисню, збільшує експресію eNOS через транскрипційний та посттранскрипційний механізми, перетворюючи eNOS з NO-продукуючого ферменту в ензим, що генерує O_2 , це призводить до реалізації негативного ефекту NO та розвитку нітрозативного й оксидативного стресів. Цей процес має назву роз'єднування активності NOS [211].

Доведено, що eNOS потенціює постсинаптичний ефект ацетилхоліну, тобто посилює вагусні ефекти в кардіоміоцитах. Також ця ізоформа посилює «акцентований антагонізм», опосередкований ацетилхоліном у катехоламін-стимульованому серці, що було доведено на мишах з гіперекспресією eNOS. Таке потенціювання координує підсилення пресинаптичних ефектів nNOS. Результатом такої співпраці є підтримка оптимального сімпатовагального балансу для регулювання кардіальної функції на пре- та пост-синаптичних рівнях [148].

5.1.3.1 Особливості експресії eNOS у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією

Проведений аналіз показників експресії eNOS у групі щурів із ПГ15 (рис. 5.6-А) показав, що, порівняно з контролем, у поперечних волокнах міокарда відмічається достовірно більший вміст ІРМ до eNOS на 6,6 %, а концентрації на 25,4 %. Тоді як у поздовжніх, достовірних змін, порівняно до контролю, встановлено не було (табл. 5.5).



Примітка. Стрілками позначені гранули імунореактивного матеріалу.

Рисунок 5.6 – Експресія eNOS у міокарді лівого шлуночка тварин групи ПГ15 (А) та ПГ60 (В). Реакція непрямой імунофлюоресценції, зб. 400^x

Таблиця 5.5 – Експресія eNOS у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією, ($M \pm m$)

| Показники | | Експериментальні групи | | |
|---|-----------------------|------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| | | Контроль | ПГ15 | ПГ60 |
| Вміст, Од _{іф} | Поперечні волокна | 1099,64 ±18,54 | 1172,72 ±22,31 ¹ | 1182,02 ±23,40 ¹ |
| | Повздовжні волокна | 1252,65 ±17,68 | 1254,65 ±35,54 | 1103,99 ±21,16 ^{1,2} |
| Концентрація, Од _{іф} /мкм ² | Поперечні волокна | 0,392 ±0,012 | 0,491 ±0,013 ¹ | 0,458 ±0,016 ^{1,2} |
| | Повздовжні волокна | 0,453 ±0,013 | 0,482 ±0,018 | 0,383 ±0,012 ^{1,2} |

Примітка 1. (¹) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

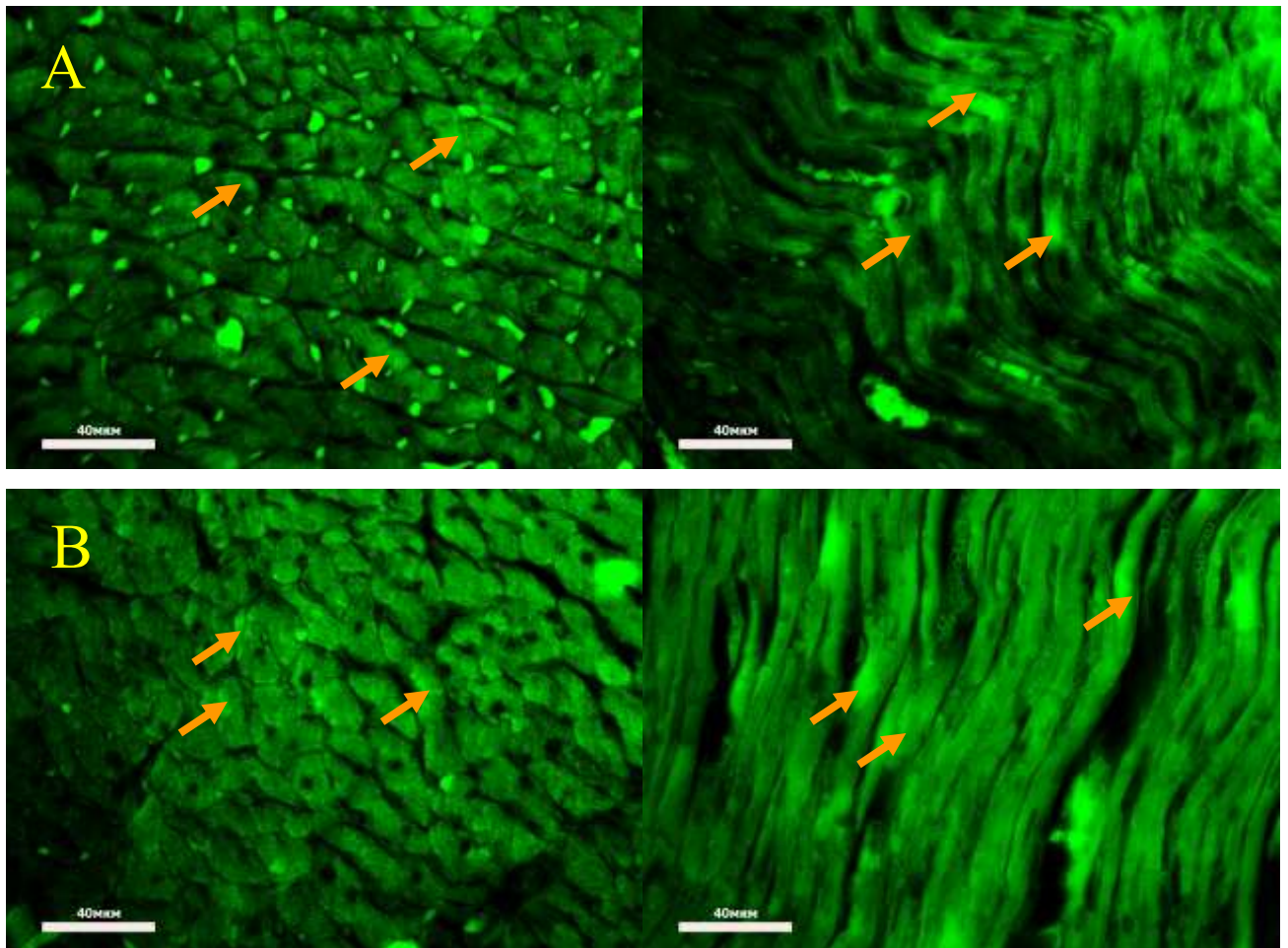
Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників групи ПГ60 ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників групи ПГ15.

У групі щурів ПГ60 (див. рис. 5.6-В), порівняно до контролю, в поперечних волокнах також відмічені достовірно більші значення вмісту ІРМ до eNOS на 7,5 %, а концентрації на 17 %, але спостерігалися менший вміст у поздовжніх волокнах на 11,9 % та концентрація – на 15,4 % (див. табл. 5.5).

Результат дослідження показав, що 15-денна інтервальна гіпоксія помірно збільшує експресію eNOS виключно в поперечних волокнах без змін у повздовжніх, тоді як при 60-денному впливі підвищені вміст і концентрація ІРМ до eNOS зберігаються, а в повздовжніх відбувається зниження, що може бути пов'язане із зміною розташування ензиму від мембрани клітини більш перінуклеарно [161].

5.1.3.2 Особливості експресії eNOS у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією

У щурів з експериментальною АГ параметри експресії eNOS у серцевому м'язі, порівняно до контролю, характеризувались помірними відмінностями показників вмісту та концентрації ІРМ до eNOS. Так, у поперечних волокнах міокарда щурів ЕАГ вміст та концентрація ІРМ до eNOS були достовірно більшими на 6,2 % та 16,5 %, відповідно (рис. 5.7-А). У повздовжніх волокнах більш високі значення були достовірні тільки в показнику вмісту на 5,6 % (табл. 5.6).



Примітка. Стрілками позначені гранули імунореактивного матеріалу.

Рисунок 5.7 – Експресія eNOS у міокарді лівого шлуночка тварин групи ЕАГ (А) та ЕСАГ (В). Реакція непрямой імунофлуоресценції, зб. 400^x

Таблиця 5.6 – Експресія eNOS у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією, ($M \pm m$)

| Показники | | Експериментальні групи | | |
|--|-----------------------|------------------------|--------------------------|------------------------------|
| | | Контроль | ЕАГ | ЕСАГ |
| Вміст, $OD_{i\phi}$ | Поперечні волокна | 1099,64 $\pm 18,54$ | 1167,60 $\pm 36,89^1$ | 1278,14 $\pm 13,72^{1,2}$ |
| | Повздовжні волокна | 1252,65 $\pm 17,68$ | 1322,55 $\pm 30,96^1$ | 1157,61 $\pm 17,36^{1,2}$ |
| Концентрація, $OD_{i\phi}/\mu\text{км}^2$ | Поперечні волокна | 0,392 $\pm 0,012$ | 0,456 $\pm 0,017^1$ | 0,421 $\pm 0,010^1$ |
| | Повздовжні волокна | 0,453 $\pm 0,013$ | 0,461 $\pm 0,015$ | 0,386 $\pm 0,012^{1,2}$ |

Примітка 1. (¹) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

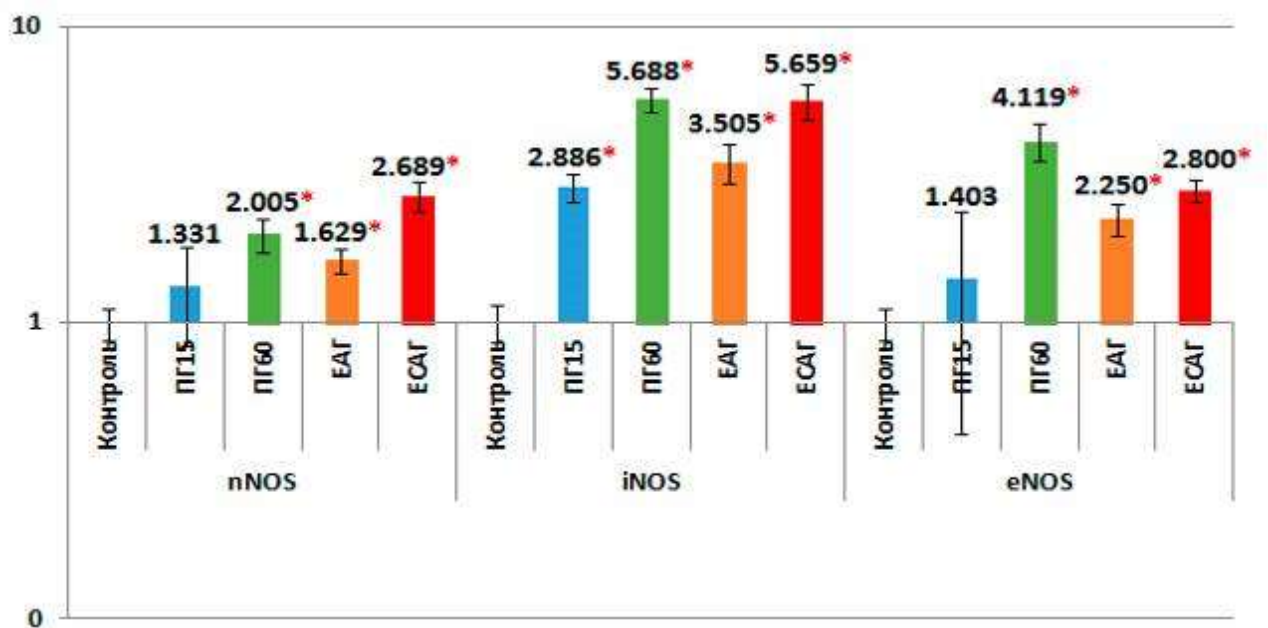
Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників групи ЕСАГ ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників групи ЕАГ.

У групі щурів ЕСАГ відмінності показників вмісту та концентрації були різноспрямованими (див. рис. 5.7-В). Так, у поперечних волокнах, порівняно із контролем, відмічалися достовірно вищі значення вмісту та концентрації ІРМ до eNOS на 16,2 % і 7,5 %, відповідно. Тоді як у повздовжніх волокнах виявилися достовірно менші показники експресії eNOS на 7,6 % вмісту та на 14,6 % концентрації (див. табл. 5.6).

Таким чином, при АГ характер експресії eNOS залежить від етіопатогенетичного механізму формування стійкого підвищення АТ. Так, при ЕАГ помірно збільшуються вміст і концентрація ІРМ до ензиму, тоді як при ЕСАГ на фоні підвищення вмісту ІРМ до eNOS відбувається зниження його концентрації.

5.2 Експресія мРНК до ізоформ синтази оксиду азоту в міокарді лівого шлуночка щурів контрольних груп

Після проведеного дослідження експресії мРНК гена nNOS методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі було встановлено, що у групах щурів із переривчастою гіпоксією тривалістю 15 та 60 діб, порівняно до групи контролю, відбулося збільшення експресії мРНК у 1,3 рази та 2 рази, відповідно (рис.5.8).



Примітка 1. (*) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Примітка 2. Дані у формі ($M \pm m$).

Рисунок 5.8 – Експресія мРНК генів nNOS, iNOS та eNOS у серцевому м'язі щурів експериментальних груп

Формування АГ призводило до достовірного підвищення експресії мРНК nNOS у групі з ЕАГ у 1,6 разів, а в групі щурів з ЕСАГ у 2,7 рази по відношенню до контрольної групи (див. рис. 5.8).

У випадку з мРНК iNOS, у групі ПГ15 встановлено її достовірне збільшення у 2,9 рази, тоді як в групі ПГ60 – у 5,7 рази. При ЕАГ експресія мРНК iNOS достовірно вище у 3,5 разів, а при ЕСАГ – у 5,7 рази (див.

рис. 5.8).

Дослідження кількості мРНК eNOS, порівняно до контролю, показали, що в щурів групи ПГ15 відмічалось переважання в 1,4 рази, в групі ПГ60 - у 4,1 рази. У щурів із сформованою АГ, незалежно від етіології, відмічалось достовірне підвищення експресії мРНК у щурів з ЕАГ у 2,3 разів, а в щурів з ЕСАГ - у 2,8 рази (див. рис. 5.8).

Отже, проведене дослідження показало, що у ССС відповіддю на тривалі впливи фізіологічного (гіпоксія) або патологічного (АГ) характеру стає активація NO-ергічної системи, яка реалізується шляхом активації геному кардіоміоцитів та збільшенням експресії мРНК ізоформ NOS.

5.3 Концентрація стабільних метаболітів оксиду азоту в гомогенатах фрагментів міокарда лівих шлуночків щурів експериментальних груп

Більшість науковців розглядають нітрити як еквівалент утворення NO, що демонструє ферментативну активність NOS та фізіологічну спрямованість ефектів системи NO [212].

Після проведеного біохімічного дослідження з реактивом Грісса визначення рівня нітритів у гомогенатах фрагментів міокарда ЛШ щурів було встановлено, що в групі ПГ15 визначаються достовірно більш високі концентрації нітритів на 21 %, тоді як у групі ПГ60 цей показник був, навпаки, меншим на 21,8 %, порівняно із контролем (табл.5.7).

Таблиця 5.7 – Концентрації стабільних метаболітів оксиду азоту (нітритів) у гомогенатах міокарда щурів експериментальних груп ($M \pm m$)

| Групи | Концентрація, мкмоль/л |
|----------|--------------------------|
| 1 | 2 |
| Контроль | 5,586±0,189 |
| ПГ15 | 6,759±0,222 ¹ |
| ПГ60 | 4,367±0,3 ^{1,2} |

| продовження таблиці 5.7 | |
|-------------------------|----------------------------|
| 1 | 2 |
| ЕАГ | 6,634±0,363 ¹ |
| ЕСАГ | 4,934±0,157 ^{1,3} |

Примітка 1. (¹) – достовірні відмінності параметрів по відношенню до контрольної групи ($p_{st}<0,05$).

Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників групи ПГ60 ($p_{st}<0,05$) відносно відповідних показників групи ПГ15

Примітка 3. (³) – достовірна різниця показників групи ЕСАГ ($p_{st}<0,05$) відносно відповідних показників групи ЕАГ.

Визначення рівня нітритів у щурів груп з АГ показало неоднозначні відмінності. Так, при есенціальній гіпертензії у щурів ЕАГ концентрація була достовірно більшою на 18,8 %, порівняно до контрольної групи, а у щурів ЕСАГ – меншою на 11,7 % (див. табл. 5.7).

Проведений аналіз концентрацій нітритів у щурів експериментальних груп показав суттєві відмінності при різних впливах на ССС, характер яких залежав від тривалості дії та патогенетичних особливостей. Короткотривалий вплив переривчастої гіпоксії (ПГ15) призводить до збільшення утворення нітритів через активацію системи NO для посилення її фізіологічних ефектів, тоді як збільшення тривалості впливу (ПГ60) – зрушує систему до реалізації патологічних властивостей через збільшення утворення нітрозотіолів та посилення оксидативного стресу.

Аналіз впливу АГ на рівень нітритів у міокарді показав залежність ефекту від етіопатогенетичних особливостей сформованої патології. Зокрема, при експериментальній АГ (ЕАГ) рівень нітритів був вище значень контролю, тоді як при вторинній ендокринно-асоційованій АГ (ЕСАГ) - значно меншим значень контролю.

5.4 Концентрація нітротирозину в плазмі щурів експериментальних груп

Нітротирозин, який синтезується з деривату пероксинітриту за умов надмірного утворення активних форм кисню, виступає показником нітрозоксидативного стресу, тому його вважають маркером NO-залежних пошкоджень *in vivo* [213].

В результаті проведеного імуноферментного дослідження було встановлено, що в щурів обох груп з переривчастою гіпоксією відмічалось достовірно вищі концентрації нітротирозину: в групі ПГ15 на 40,8 %, тоді як у групі ПГ60 на 80,6 % ($p < 0,05$) (табл. 5.8).

Таблиця 5.8 – Концентрації нітротирозину в плазми крові щурів експериментальних груп ($M \pm m$)

| Групи | Концентрація, нмоль/л |
|----------|----------------------------|
| Контроль | 20,495±2,076 |
| ПГ15 | 28,853±3,863 ¹ |
| ПГ60 | 37,02±4,78 ¹ |
| ЕАГ | 25,815±2,805 ¹ |
| ЕСАГ | 38,63±3,219 ^{1,2} |

Примітка 1. (¹) – достовірні відмінності параметрів по відношенню до контрольної групи ($p_{st} < 0,05$).

Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників групи ЕСАГ ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників групи ЕАГ.

У випадку зі сформованою гіпертензією, у групі ЕАГ відмічалось, що концентрації нітротирозину перевищували значення контролю на 26 %, у групі ЕСАГ – на 88,5 % (див. табл. 5.8).

Відповідно, надмірні впливи на ССС, незалежно від тривалості та ступеня їхньої виразності, супроводжуються підвищенням концентрації нітротирозину, що необхідно розглядати як наслідок активації оксидативного стресу.

Резюме

Загальний результат проведеного комплексного дослідження, а саме аналіз стану системи NO міокарда ЛШ щурів експериментальних груп, дозволив зробити декілька проміжних висновків.

Проведене імунофлюоресцентне дослідження ізоформного профілю NOS у щурів ПГ15 виявило достовірне зменшення вмісту nNOS на 20,6 % у поперечних волокнах без змін інших показників. Проте необхідно відмітити, що такі зміни супроводжувались достовірним збільшенням мРНК на 33%, порівняно до контролю. Вміст і концентрація iNOS в цій групі в поперечних волокнах були достовірно більшими на 7,2 % і 28,1 %, відповідно, а в повздожніх - на 14,7 % і 31,2 %. Збільшена експресія IPM iNOS формувалась на тлі високих значень відповідної мРНК, яка майже в 2,9 рази була вище показнику контролю. Вміст і концентрація IPM до eNOS у групі ПГ15 у поперечних волокнах були більше на 6,6 % і 25,4 %, відповідно, без достовірних змін у повздожніх волокнах. Експресія мРНК eNOS була вище контрольних значень на 40%.

У групі щурів ПГ60 профіль NOS змінювався різноспрямовано. Так, вміст та концентрація nNOS у поперечних волокнах були достовірно більші на 25,4 % і 45,8 %, відповідно; у повздожніх волокнах – на 45,7 % і 146,2 %, що разом зі збільшенням мРНК, порівняно до контролю, у 2 рази, свідчить про значне привалювання цієї ізоформи в міокарді щурів ПГ60. Вміст і концентрація iNOS у поперечних волокнах були менше на 26,1 % і 30 %, відповідно; у повздожніх волокнах меншими на 33,3 % і 32,8 %, відповідно. Варто зауважити, що такі низькі значення IPM були виявлені на тлі збільшення мРНК iNOS у 5,7 разів, порівняно до контролю. Вміст та концентрація IPM до eNOS у групі ПГ60 змінювалися неоднозначно в поперечних та повздожніх волокнах. У перших вміст та концентрація були достовірно більше за контроль на 7,5 % і 17 %, відповідно. Тоді як у других, ці показники були достовірно менше на 11,9 % і 15,4 %, відповідно. Це

супроводжувалося значним збільшенням мРНК на 312 %, порівняно до контролю.

У щурів з експериментальною АГ зміни ізоформного профілю NO носять різний ступень вираженості, при цьому характер експресії окремих ізоформ має етіологічну залежність. У щурів ЕАГ у поперечних волокнах виявлено достовірно вищі значення вмісту nNOS на 5,7 % у поперечних та на 21,6 % у повздовжніх волокнах, порівняно до контролю. В останніх ще й збільшення концентрації на 23,1 %. Разом з цим, мРНК nNOS була вище у 1,6 разів, порівно до контролю. У випадку з iNOS, вміст і концентрація в поперечних волокна є вищими за контроль на 19,6 % і 22,6 %, відповідно. У повздовжніх волокнах виявлено також достовірне збільшення вмісту на 28,7 % і концентрації на 33,1 %. Вартими уваги є встановлені більш високі значення мРНК iNOS у 3,5 рази, порівняно до контролю. Виявлені зміни вмісту та концентрації eNOS є не такими значними. У поперечних волокнах ці показники були більше на 6,2 % і 16,5 %, а в поперечних волокнах достовірно вищим за контроль був тільки вміст на 5,6 %, тоді як виявили достовірно вище мРНК eNOS на 125 %.

Представляють інтерес виявлені зміни ізоформного профілю в щурів ЕСАГ. У них, порівняно із контролем, вміст та концентрація nNOS у поперечних волокнах більші на 14,3 % і 34,4 %, в той час як у повздовжніх – на 8,3 % і 23,8 %, відповідно. При цьому експресія мРНК вище значень контролю в 2,7 рази. Достовірно вищі значення вмісту та концентрації IPM до iNOS виявлено як у поперечних, так і в повздовжніх волокнах, у перших – на 18,3 % і 21 %, в останніх – на 8,5 % і 12,2 %, відповідно. Разом з цим, встановлено значне переважання вмісту мРНК iNOS, порівняно до контролю, у 5,7 разів. Зміни eNOS у волокнах міокарда щурів мали різний характер. Так, вміст і концентрація в поперечних достовірно вище на 16,2 % і 7,5 %, відповідно, тоді як у повздовжніх виявлено зменшення на 7,6 % та 14,6 %, відповідно. Такі зміни супроводжувалися підвищеною експресією мРНК eNOS у 2,8 разів.

Біохімічним методом з реактивом Грісса виявлені достовірно високі показники концентрації нітритів у щурів ПГ15 та ЕАГ, що перевищували значення контролю на 21 % і 18,8 %, відповідно. Тоді як у групі ПГ60 та ЕСАГ встановлено достовірне зменшення концентрації 21,8 % і 11,7 %, відповідно.

Імуноферментне дослідження концентрації ніротирозину в групах щурів ПГ15 показало більші значення за контроль на 40,8 %, а в щурів ЕАГ - на 26 %, що, ймовірно, свідчить про початкову стадію розвитку нітрузо-оксидативного стресу, але зі збереженою компенсацією цього стану організмом щурів. На відміну, в групах ПГ60 та ЕСАГ відбулося значне та достовірне збільшення концентрації ніротирозину в плазмі крові на 80,6 % і 88,5 %, відповідно, що може характеризувати ступінь інтенсивності утворення ONOO- та дозволяє припустити посилення системного нітрузо-оксидативного стресу.

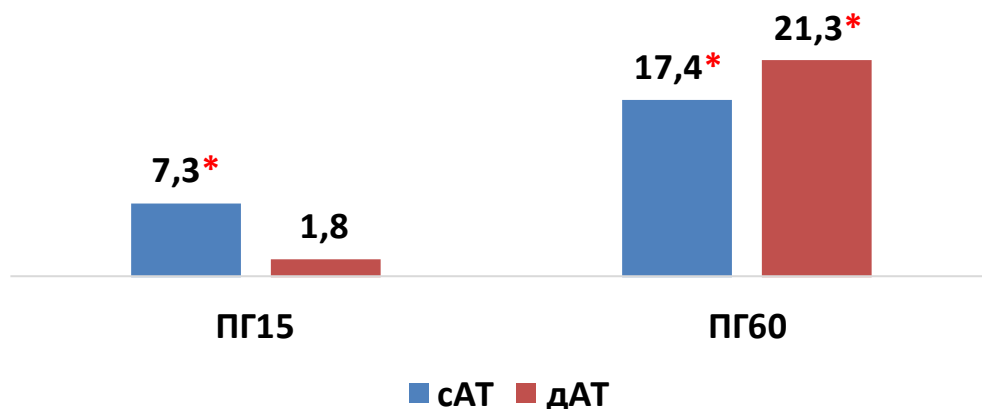
Матеріали розділу відображені в 4 статтях та 6 тезах [189-191, 214-220].

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

На експериментальних моделях, фізіологічних (переривчаста гіпоксія різної тривалості) та патологічних (АГ різного генезу) впливів на ССС визначено характер морфо-структурних змін у міокарді, встановлено ключові ланки їхнього патогенезу та доведена роль регуляторної системи NO.

Особливості ремоделювання при гіпоксії. Аналіз значень АТ у щурів груп з переривчастою гіпоксією показав, що показники систолічного та діастолічного тиску знаходилися в межах нормотензивного діапазону, але в групі щурів із ПГ15 систолічний тиск достовірно перевищував значення контролю на 7,3 % (рис. 6.1).



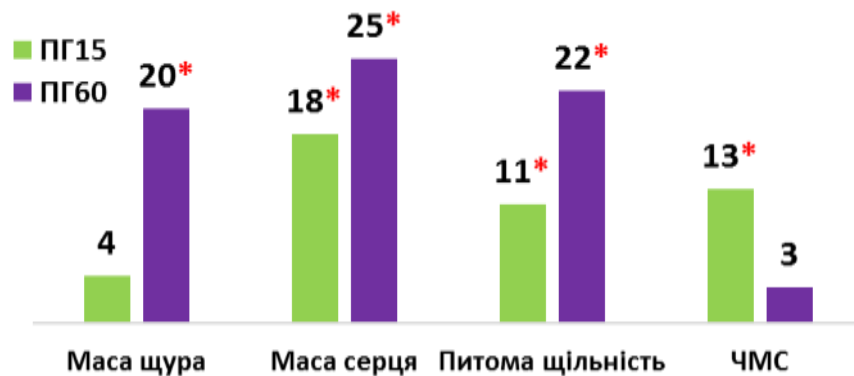
Примітка. (*) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Рисунок 6.1 – Показники артеріального тиску в щурів з експериментальною гіпоксією (різниця у %, порівняно до контролю)

Таке підвищення АТ у межах референтних значень може бути пов'язане з підвищенням ударного об'єму, що, ймовірно, є наслідком сформованої гіпертрофії міокарда, про що свідчило поступове збільшення середньої маси та питомої щільності серця щурів. В нормі, при адаптації до гіпоксичних умов,

спостерігається феномен Ейлера-Лільєстранда, сутність якого в зменшенні тонуусу органних судин великого колу кровообігу, їхньої вазодилатації, що знижує периферичний опір судин та компенсує кисневий запит органів та серця, зокрема. Такі зміни призводять до збільшення судинного резерву, тим самим розширюючи можливості міокарда, покращуючи кровопостачання та скоротливість [16, 221]. Більш того, при ПГ60 спостерігалось достовірне перевищення значень контролю, як систолічного на 17,4 %, так і діастолічного тиску на 21,3 %, та значень ПГ15 на 9,5 % систолічного та 19,2 % діастолічного (див. рис. 6.1). Показники АТ щурів з довготривалим гіпоксичним впливом дають змогу припустити можливе збільшення загального опору судин. Такого ж висновку дійшли Tang, X. J. та ін., отримавши розвиток ремоделювання аорти та судин серця при періодичній гіпоксії від 6 тижнів та більше [222].

Зміни значень АТ відбувалися на тлі збільшення середньої маси серця, його питомої щільності в обох групах щурів із гіпоксією (рис. 6.2).



Примітка. (*) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

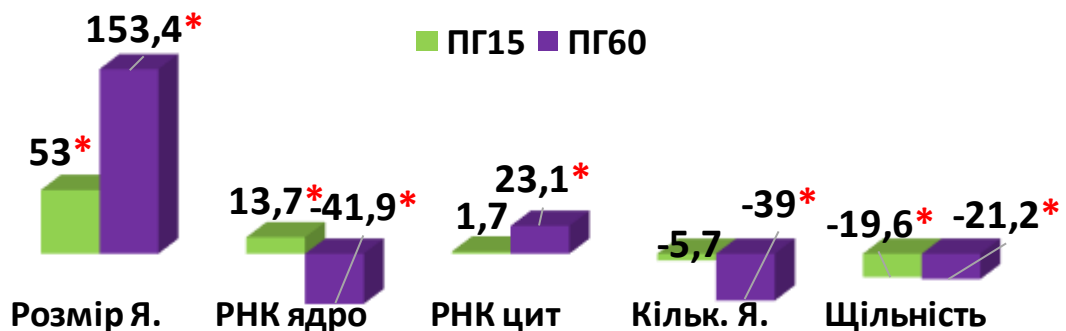
Рисунок 6.2 – Масометричні показники щурів з експериментальною гіпоксією (різниця у %, порівняно до контролю)

Натомість, показник частки маси серця був вище за контроль лише в щурів групи ПГ15 на 13 % (див. рис. 6.2). Достовірні зміни між ПГ15 і ПГ60

було виявлено лише за показником маси тіла щурів (більший за ПГ15 на 15,2 %).

Виявлені закономірності збільшення маси серця і питомої щільності є ознаками розвитку ремоделювання серця саме за рахунок гіпертрофії, а не через дилатацію.

Морфо-денситометрично було доведено, що гіпоксичний вплив, незалежно від його тривалості, супроводжується перебудовами в міокарді. Збільшення розмірів ядер кардіоміоцитів у щурів ПГ60 більші за ПГ15 на 65,7 % (рис 6.3).



Примітка. (*) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Рисунок 6.3 – Морфо-денситометрична характеристика міокарда щурів з гіпоксією (різниця у %, порівняно до контролю)

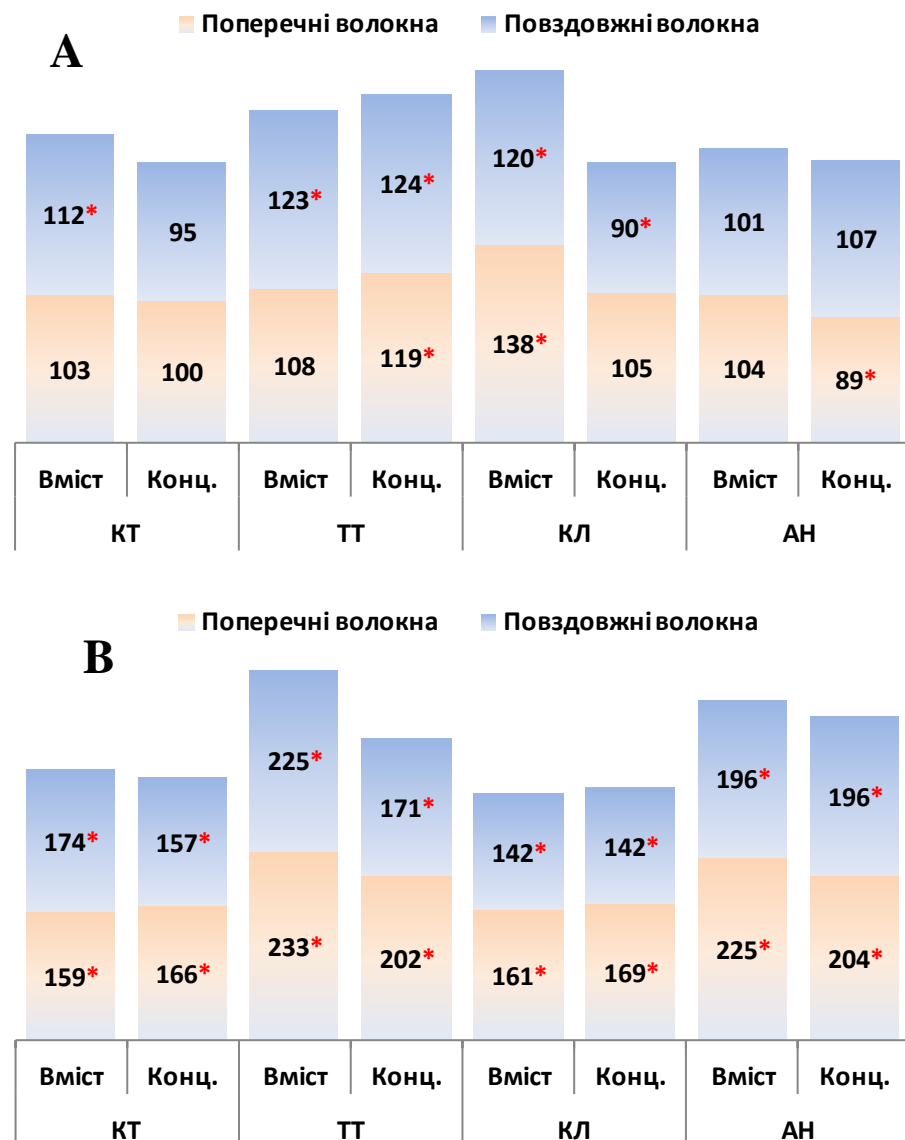
При цьому кількість ядер у щурів ПГ60 стає меншою за ПГ15 на 35,3 %. Через зміни загальної площі ядер і цитоплазми кардіоміоцитів, змінюється у бік зменшення щільність їхніх ядер. Такі морфо-структурні зміни ядер та їхнього співвідношення до цитоплазми характеризують розвиток гіпертрофії. Очікуваним стало визначення більших змін у міокарді щурів із довготривалою гіпоксією – ПГ60 (див. рис. 6.3). Подібні факти були доведені в дослідженні Antonio F. Corno та ін., які підтвердили формування гіпертрофії міокарда у відповідь на хронічну та переривчасту гіпоксію [223].

Встановлений факт нормальної кількості ядер і збільшення в них концентрації РНК у щурів ПГ15 є ознакою нормального функціонального

статусу клітин, тоді як при ПГ60 виявлено меншу за контроль ядерна РНК на 41,9 % і ПГ15 на 48,9 %. Таку знахідку необхідно розглядати, як ядерну дисфункцію. Аналогічні результати отримали і Zhong Z та ін.. [224].

Визначення характеру маркерного профілю дало змогу оцінити тип ремоделювання і його направленість у бік фізіологічного чи патологічного, а також виявити залежність від строку гіпоксичної експозиції.

Так, при гіпоксичних впливах у щурів було відмічене збільшення маркеру гіпертрофії міокарда КТ-1 (рис. 6.4).



Примітка. (*) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Рисунок 6.4 – Вміст та концентрація маркерів у міокарді щурів ПГ15 (А) і ПГ60 (В), % (контроль-100%)

Показники експресії КТ-1 мали кількісну залежність від тривалості впливу і перевищували при 60-денній гіпоксії показник ПГ15 у 2 рази. За думкою Mirtschink P. та ін., таке збільшення ініціює HIF-фактор, що являє собою основний регулятор ключових показників медіаторної реакції транскрипції генів при низькому рівні кисню [225].

На сучасному етапі неможливо характеризувати морфо-структурні перебудови в міокарді та описувати характер фіброзних змін, не враховуючи вміст ТТ та КЛ, підвищення експресії яких було достовірно встановлено в щурів обох експериментальних груп (див.рис.6.4). Однак, важливо зазначити, що в щурів із ПГ15 на тлі помірного збільшення їхнього вмісту, коефіцієнт співвідношення залишався максимально наближеним до контрольних значень (0,95:0,86) за вмістом і (0,83:1,04) за концентрацією (див. розділ 4, рис. 4.10). Ймовірно, 15-денний гіпоксичний вплив сприяє збільшенню пружності матричного каркасу – як елемента адаптації до нових умов функціонування, але недостатній для формування фіброзу. На відміну від наших результатів, Т.П. Сатаєва та І.В. Задніпр'яний при експозиції протягом 15 діб на 3,5 км отримали значні прояви ремоделювання міокарда із превалюванням фіброзу, що розвинувся через активацію фібробластів та зменшення деградації КЛ. Але у своєму дослідженні автори не диференціювали тип КЛ, що не дає змогу бути впевненим у патологічному характері його накопичення [226].

Тривалий 60-денний гіпоксичний вплив сприяв значному збільшенню вмісту ТТ і КЛ із підвищенням коефіцієнту їхнього співвідношення, порівняно до контролю (0,95:1,45) – за вмістом і (0,83:0,99) за концентрацією, що демонструє розвиток фіброзу на тлі компенсаторного підвищення пружно-еластичних властивостей серцевого м'язу. Дослідники припускають, що такі зміни вмісту ТТ пов'язані із окисною модифікацією всіх трьох філаментних систем саркомеру та дисбалансом лізоформ ТТ у бік збільшення більш жорсткої форми N2B. Особливо ці зміни виражені при оксидативному стресі, що розвивається при довготривалій гіпоксії [78].

Визначення вмісту АН – маркеру апоптозу кардіоміоцитів показало, що при 15-денній тривалості гіпоксичного впливу достовірні зміни концентрації ІРМ відсутні на фоні зниження вмісту в поперечних волокнах на 11,5 %. Саме цей факт дав змогу припустити фізіологічну спрямованість ремоделювання серцевого м'язу в щурів цієї групи. У випадку з довготривалою гіпоксією, виявлені більші за контроль вміст і концентрація АН у 2 рази, що є ознакою значних процесів загибелі клітин і, можливо, початком розвитку міогенної дилатації серця [227].

Отримані результати особливостей стану системи NO в міокарді щурів із переривчастою гіпоксією підтверджують численні факти інших дослідників, які стверджують, що короткотривала переривчаста гіпоксія призводить до активації механізмів негайної адаптації, важливим компонентом якої ними розглядається NO та ізоформи NOS [22].

Zhang.Y. (2017) вважає, що базисом, який опосередковує ефекти NO в міокарді під час фізіологічних та патологічних стресів є особливості компартменталізації, транслокації, транскрипції та пострансляційних модифікацій конститутивних ізоформ NOS [156]. Цікавим є те, що їхня експресія взаємопов'язана оборотним зв'язком, якщо підвищується експресія nNOS, зменшується експресія eNOS. Така система терезів спрямована на запобігання гіперпродукції NO за нормальних умов та підтримки його сталого рівня за умов стресу, або у випадку «заблокованості» однієї з них. Тобто, інша ізоформа буде компенсувати нестачу NO завдяки підвищеній її експресії та активності [151].

У нашому випадку, виявлено зменшення ІРМ до nNOS разом зі збільшення вмісту ІРМ до eNOS у щурів ПГ15 на тлі тенденції до збільшення їхньої мРНК, що можна вважати підтвердженням цієї гіпотези та розглядати як один з компонентів негайної адаптації до гіпоксії у міокарді (див. розділ 5). Така активація експресії конститутивних ізоформ, ймовірно, спрямована на покращення скоротливості кардіоміоцитів, модифікації симпатичного та парасимпатичного впливів, контролю серцевого ритму та регулювання

метаболізму клітин шляхом покращення локальної васкуляризації та іннервації.

Ще декілька років тому, встановлене в роботі підвищення показників експресії iNOS в міокарді щурів групи ПГ15 необхідно було пояснювати її пошкоджуючою здатністю, але нещодавні дослідження довели кардіопротективну роль індукцйбельної ізоформи NOS. Так, за думкою Lefter DJ., iNOS є первинним джерелом кардіопротективного NO, який модулює коронарний кровообіг, зменшує агрегацію тромбоцитів, модулює мітохондріальну функцію та клітинне дихання [228]. Вважають, що за умов нестачі кисню та недостатньої ферментативної активності конститутивних ізоформ NOS, активація iNOS стає компонентом адаптивної реакції до дії гіпоксії та забезпечує сталий рівень NO. Але надмірна її активність призводить до вибухоподібного утворення NO, який чинить цитостатичну дію через надмірне утворення вільних радикалів. Примітним встановленим фактом у роботі було підвищення мРНК цієї ізоформи в 2,9 разів при 15 денній гіпоксії, порівняно до контролю. Таке збільшення мРНК, ймовірно, свідчить про значну потребу міокарда в ній із залученням стимулювання транскрипційних механізмів [229].

Встановлене збільшення на 21 % рівня нітритів у гомогенатах міокарда щурів ПГ15, на нашу думку, є важливим індикатором підвищеного синтезу NO через високу активність та експресію NOS. Таку ж закономірність отримала і група дослідників з Аргентини, які довели вплив переривчастої гіпоксії на підвищення рівня кінцевих метаболітів NO [230].

Наступним результатом дослідження стало встановлення підвищеного рівня нітротирозину в гомогенатах міокарда після 15 денних гіпоксичних тренувань. На сьогодні механізм утворення та роль нітротирозину при патологічних станах добре визначено, тому виявлене підвищення його рівня разом з високою експресією eNOS, особливо iNOS, пов'язано із перемиканням її дії з NO-продукуючої на генерацію АФК та розвитком нітрозоксидативного стресу (рис. 6.5).

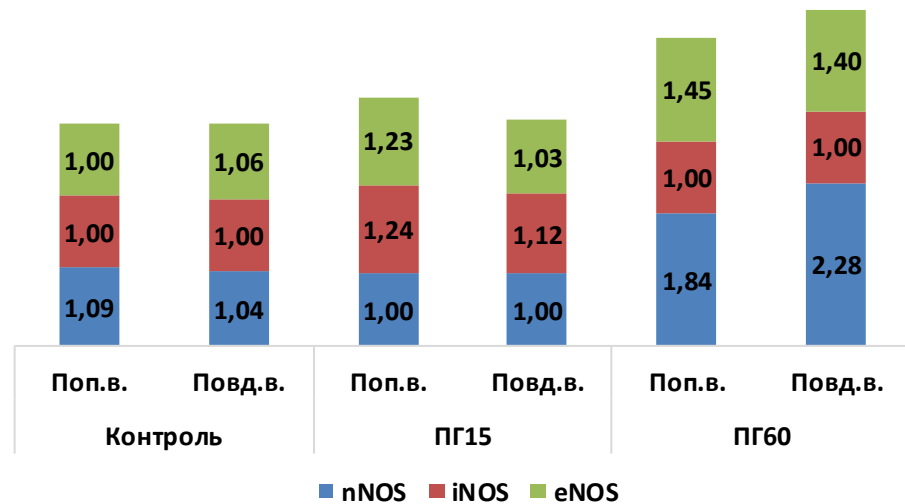


Рисунок 6.5 – Співвідношення ізоформ NOS за вмістом у міокарді щурів з експериментальною гіпоксією

Тобто, 15 денні гіпоксичні тренування сприяють не тільки включенню адаптаційних властивостей організму, як визначено в роботі, вже на цьому етапі відбуваються патологічні зміни, ізоформний дисбаланс у системі NO зі значним переважанням iNOS і помірним збільшенням eNOS, що стає важливим підґрунтям розвитку оксидативного стресу.

Довготривалі 60 денні гіпоксичні тренування також призводили до суттєвих змін у системі NO міокарда, які характеризувалися значним збільшенням конститутивних ізоформ на тлі зменшення iNOS та значним підвищенням концентрацій стабільних метаболітів NO, але ці перебудови мали значні відмінності, порівняно з результатами ПГ15 (див. рис. 6.5). Дослідження ізоформного профілю NOS показало збільшену експресію nNOS як у поперечних, так і в повздожніх волокнах зрізів міокарда із збільшенням її мРНК у 2 рази, порівняно до контролю. Більш того, порівняно до ПГ15, вміст nNOS у поперечних та повздожніх волокнах збільшився понад третину. Така висока експресія nNOS, за думкою інших дослідників, пов'язана з доведеною кардіопротективною роллю. Поряд з синтезом NO, вона утворює в стінці крупних судин H_2O_2 , що покращує васкуляризацію та є компонентом

адаптації до умов гіпоксії. Одночасно з цим, nNOS пригнічує серцеві оксидази, зменшує джерела окисного стресу, тим самим виявляючи антиоксидантні властивості [231].

Експресія другої конститутивної ізоформи NOS, її ендотеліальної форми, у поперечних волокнах зростала, порівняно до контролю. Це відбулося на фоні суттєвого підвищення її мРНК у 4,1 рази, що може свідчити про значну потребу в цій ізоформі [232]. Встановлене підвищення синтезу та вмісту eNOS після довготривалих гіпоксичних тренувань пов'язано з її кардіопротективними властивостями. За результатами багатьох досліджень, цю ізоформу асоціюють з реалізацією вазодилатації, активацією колатерального кровообігу, що стабілізує метаболізм кардіоміоцитів та захищає від вільно-радикального пошкодження. Доведено, що гіпоксія збільшує надходження Ca^{2+} через канали Ca^{2+} типу L, який активує eNOS і стабілізує HIF-1, тим самим підтримуючи контур зворотного зв'язку. Усі ці реакції призводять до стабілізації синтезу NO та розвитку адаптації міокарда [233].

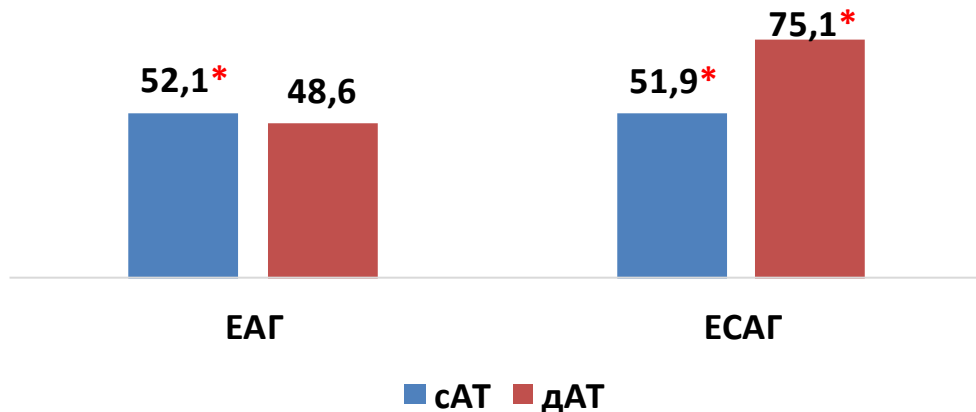
Аналіз показників експресії індукцибельної форми NOS після довготривалих гіпоксичних тренувань протягом 60 діб показав зменшення вмісту та концентрації, порівняно до контролю, замість збільшення її експресії, як при ПГ15. Однак це відбулося на фоні суттєвого збільшення її мРНК у 5,7 разів, порівняно до контролю, та майже у 2 рази, порівняно до ПГ15. Такі неоднозначні результати, на нашу думку, свідчать, по-перше, про значну потребу в цієї ізоформі із активацією геному, наявність транскрипційного блоку експресії iNOS та прискореного руйнування ферменту в міокарді. Як результат цього, за думкою Rus.A. (2011), сформуються негативні наслідки, що пов'язані з нестачею протективного NO в міокарді, через що зменшується активність антиоксидантних ферментів та експресія кодуючих генів, прискорюється перекисне окиснення ліпідів, збільшується утворення АФК [234]. Опосередкованим фактом, що підтвердив це припущення, стало зменшення концентрації нітритів на фоні підвищеного

рівня нітротирозину. Отримані данні свідчать про зменшення утворення оксиду азоту NO-ферментативним шляхом та демонструють спрямування системи NO в нітрузо-оксидативний стрес, який показує системний характер.

Таким чином, за результатами нашого дослідження з'ясувалося, що гіпоксичні впливи, незалежно від їхньої тривалості, активують систему NO в міокарді, кількісно збільшуючи вміст ізоформ NOS та кінцевих метаболітів NO. Окремо слід відмітити, що характер ізоформного профілю NOS та тип кінцевого метаболіту NO залежать від тривалості гіпоксичного впливу. Так, при короткотривалих тренуваннях для компенсації та покращення кровопостачання в міокарді відбувається збільшення ендотеліального вазодилатуючого фактору NO через надлишковий синтез iNOS, активність якої, на відміну від конститутивних ізоформ, залишається високою, незалежно від концентрації кисню та рівня внутрішньоклітинного кальцію. Тоді як при дії довготривалої гіпоксії, механізми адаптації базуються на класичній схемі формування «системного структурного сліду» - для стабілізації метаболічних процесів та відновлення кровопостачання відбувається активація геному, стимуляція експресії мРНК всіх трьох ізоформ NOS. Але велика кількість утвореного NO з надлишком пероксинітриту та нітротирозину на фоні гіпоксичного стану та пошкодження тканинних компонентів міокарда запускають каскад реакцій із розвитком нітрузо-оксидативного стресу. Останній, в свою чергу, чинить пошкоджуючу дію на міокард, спричинює патологічне його ремоделювання, замість фізіологічного.

Особливості ремоделювання при артеріальній гіпертензії. Сьогодні вже добре відомо, що розвиток АГ супроводжується ендотеліальною дисфункцією. Підвищення АТ при АГ починається через гіперадреналінемію, яка призводить до ангіоспазму. Результатом є підвищення загального периферійного опору судин, збільшення ЧСС, ударного об'єму та серцевого викиду [235]. Тобто, отримані данні про достовірне підвищення систолічного

тиску в обох групах, порівняно до контролю, та діастолічного тиску в щурів ЕАГ на 75,1 % було очікуваним результатом (рис. 6.6).



Примітка. (*) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Рисунок 6.6 – Показники артеріального тиску в щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією (різниця у %, порівняно до контролю)

Вартими уваги особливостями були виявлені етіпатогенетично залежні відмінності показника діастолічного АТ, які переважали на 17,8 % у групі з ЕСАГ, порівняно до щурів з ЕАГ, тоді як за показником систолічного АТ відмінностей не було. На відміну від ЕАГ, у щурів з ЕСАГ було індуковано більш тяжку та комбіновану форму ПРМ. У них через багаторазове та тривале використання преднізолону сформувалась АГ, подібна вторинній ендокринно-асоційованій АГ людини. У її патогенезі, з одного боку, через стимулювання мінералокортикоїдних рецепторів нирок відбувається затримка натрію і води із збільшенням ОЦК, з іншого боку – посилення пресорної відповіді з розвитком дисбалансу між вазоконстрикцією та дилатацією [187].

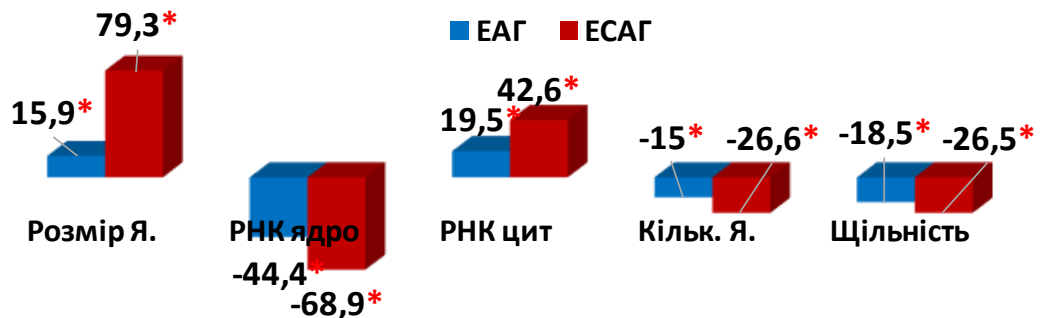
Серед встановлених закономірностей змін масометричних показників необхідно відмітити збільшення маси серця і питомої щільності серця в обох моделях з АГ. Такі масометричні зміни слід розглядати як непряму ознаку розвитку гіпертрофії (рис. 6.7).



Примітка. (*) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Рисунок 6.7 – Масометричні показники щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією (різниця у %, порівняно до контролю)

В той час як більший за контроль показник частки маси серця в щурів ЕСАГ дає уявлення про стрибкоподібне збільшення маси серця у відповідь на моделююче втручання. В обох випадках підвищення АТ супроводжувалося формуванням ПРМ. Морфо-денситометрично це проявлялося збільшенням розмірів ядер кардіоміоцитів в обох групах з АГ (рис. 6.8).

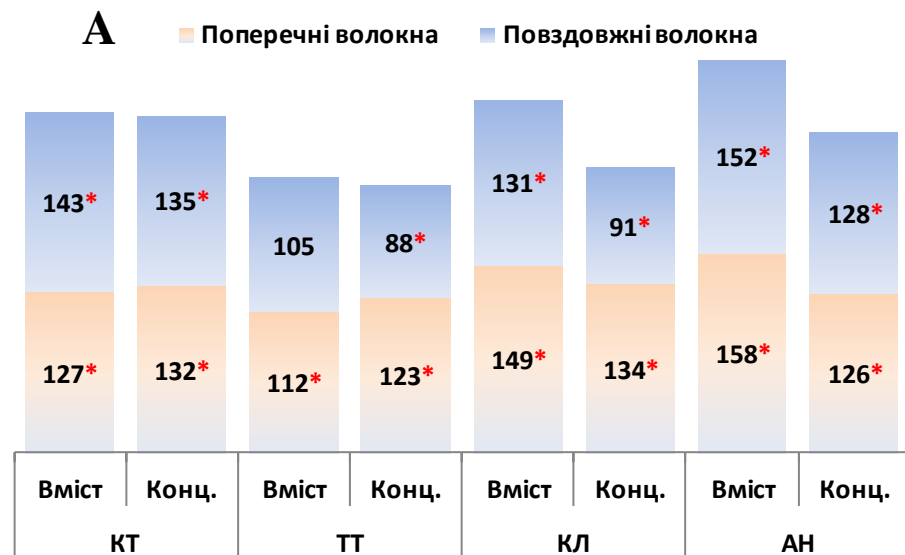


Примітка. (*) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Рисунок 6.8 – Морфо-денситометрична характеристика міокарда щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією (різниця у %, порівняно до контролю)

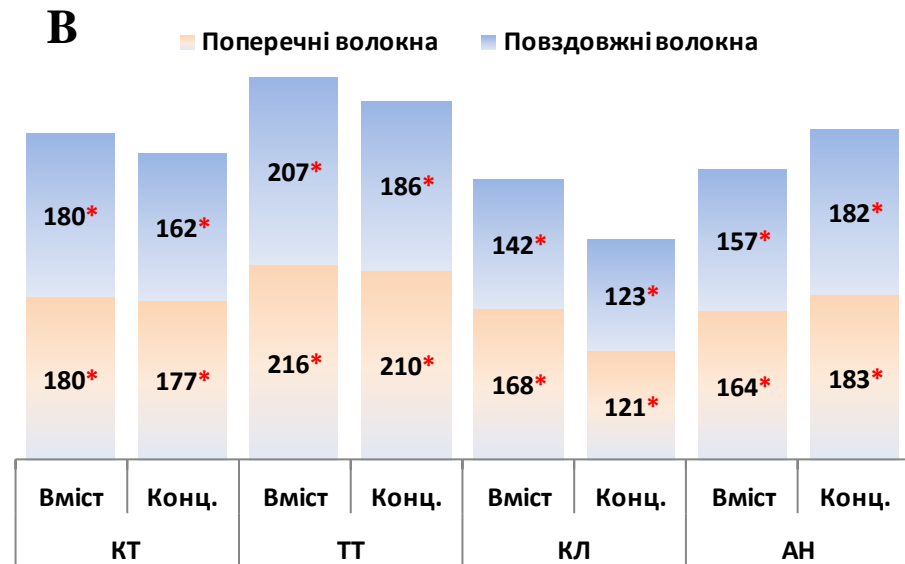
У щурів ЕСАГ розміри ядер кардіоміоцитів перевищували ЕАГ на 54,7 %, що вказує на значний полімофізм, і ядерна дисфункція мала тяжче вираження

(зменшення РНК в ядрі ЕСАГ, на 44 % менше за ЕАГ). Цікавим було виявлене збільшення РНК у цитоплазмі кадміоцитів щурів ЕСАГ на 19,4 %, порівняно до ЕАГ. Зменшення показників кількості та щільності ядер також мали етіопатогенетичну залежність і носили тяжчий характер у щурів ЕСАГ. Як вже було зазначено вище, тяжкість і тип сформованого ПРМ дозволяють оцінити співвідношенням маркерів ремоделювання – кардіотрофіну-1, колагену I типу, тайтину та анексину V. Необхідно відмітити, що обрані моделі АГ є двома патогенетично різними формами гіпертензії, тому зміни маркерного профілю ПРМ, хоча і мають однакові закономірності, а саме, достовірне підвищення всіх чотирьох маркерів ремоделювання, але характеризуються важливими патогенетичними відмінностями. Так, через специфічність патогенетичних ланок у щурів ЕСАГ, а саме, здатністю глюкокортикоїдів вражати міокард, виявлено вищі показники експресії КТ-1, порівняно до ЕАГ (рис. 6.9). Такі самі закономірності виявив Martínez-Martínez E на моделі Dahl сіль-чутливих гіпертензивних щурах, де КТ-1 підвищує рівень галектину-3, який, в свою чергу, опосередковує прозапальні та профібротичні ефекти в міокарді [41].



Примітка. (*) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Рисунок 6.9 – Вміст та концентрація маркерів у міокарді щурів ЕАГ(А) та ЕСАГ(В), % (контроль-100%)



Примітка. (*) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p_{st} < 0,05$) відносно відповідних показників контрольної групи.

Рисунок 6.9, аркуш 178

Ще однією особливістю виявилось поєднання високих показників експресії КТ-1 зі збільшеним вмістом і концентрацією КЛ в щурів обох груп, порівняно до контролю. У щурів ЕСАГ переважання було в середньому в 1,3 рази, порівняно до ЕАГ. Зв'язок між цими маркерами продемонстрував Т. Watanabe та ін. в дослідженнях, вважаючи, що надмірна експресія КТ-1 асоційована з фіброзом міокарда та посиленням експресії КЛ в пацієнтів з АГ і серцевою недостатністю [43]. В той час, як L. Li та ін. вважають, що на ранній стадії переважає колаген III типу, але саме КЛ I типу забезпечує інтенсивнішу та тривалішу регуляцію, тобто саме його підвищення слід розглядати як компенсаторне [73].

Слід зазначити, що робити висновки про компенсаторну спрямованість підвищення КЛ слід, все ж таки, після аналізу підвищення вмісту та концентрації ТТ і зміни їхнього коефіцієнту співвідношення. Нами було виявлене значне збільшення показників експресії ТТ у щурів ЕСАГ, порівняно до ЕАГ, майже у 2 рази. Warren С. М. та ін. пов'язують збільшення його експресії через ізоформний дисбаланс (менше N2ВА та більша кількість N2В), що призводить до більшого пасивного напруження при розтягуванні довжини

саркомеру [236]. Більше того, в щурів ЕАГ виявлене зменшення коефіцієнту тайтин-колагенового співвідношення, тоді як для щурів ЕСАГ характерно його підвищення. Такі зміни слід тлумачити як поступове формування фіброзу з підвищенням жорсткості міокарда в щурів ЕАГ і значні фіброзні прояви у ЕСАГ. На думку Arantxa Gonzalez та ін. збільшення вмісту ТТ носить компенсаторний характер і є результатом зменшення здатності ЛШ до розтягнення, через той самий дисбаланс ізоформ і змін його фосфорилування та окислення [237].

Дослідження АН як ключового маркера апоптозу кардіоміоцитів при ремоделюванні міокарда різної етіології на тлі ССЗ включені в усі патоморфологічні рекомендації [87]. АН за роки практики зарекомендував себе як інформативний на ранніх стадіях розвитку хвороби, що є підґрунтям для використання його для скринінгу пацієнтів, особливо при латентному перебігу ССЗ [86]. Наші дослідження виявили значне підвищення АН у щурів ЕСАГ, більш ніж у 2 рази, порівняно до ЕАГ. Таке підвищення апоптотичної активності пов'язане з високим рівнем споживаної солі і кардіодепресивним впливом стероїдів. Дослідник Наукава У. та ін. пов'язали такі зміни міокарда зі стимуляцією рецепторів до реніну й ангіотензину II, підвищенням тканинного прореніну, реніну, ангіотензиногену, активацією ERK1/2, TGF- β , p38MAPK та HSP27 при підвищеному АТ [238].

Результати проведених досліджень дозволили встановити, що формування стійкого підвищення АТ у щурів обох груп з АГ супроводжувалося не тільки достовірним збільшенням у зрізах міокарда вмісту та концентрації усіх трьох ізоформ, але й збільшенням показників експресії їхньої мРНК (див. розділ 5).

Встановлений у роботі факт більш високих показників експресії nNOS у міокарді при сформованій АГ у щурів ЕАГ був очікуваним результатом. Це пов'язано із тим, що за даними багатьох дослідників, nNOS у серцевому м'язі виступає в ролі основного ендогенного джерела міокардіального NO [149], який забезпечує швидку, ситуативну зміну рівня NO у відповідь на зовнішньо

клітинні сигнали медіаторів, гормонів та біологічно-активних речовин [150], реалізує контроль за парасимпатичною та симпатичною регуляцією серцевого ритму, здійснює вплив на скоротливість та релаксацію міокарда [151]. Тому, логічно припустити, що більш висока концентрація nNOS у щурів EAГ необхідна для включення механізмів як негайної, так і довгострокової адаптації серця до гемодинамічних перевантажень. Особливо важливим таким механізмом компенсації є на початкових етапах підвищення тиску.

Підвищення вмісту та концентрації IPM до eNOS разом з її мРНК у 2,3 рази, порівняно до контролю, в міокарді щурів EAГ слід асоціювати з реалізацією механізмів локальної ендотеліальної цитопротекції та підтримці судинного гомеостазу. Стійке підвищення АТ супроводжується включенням механізмів довгострокової компенсації, а саме, гіпертрофії міокарда ЛШ [203] із посиленням кровопостачання, утворенням нових капілярів та нервів. На нашу думку, значне збільшення експресії мРНК eNOS у щурів EAГ пов'язане з індукцією експресії гена через транскрипційний шлях [239], як одного з компонентів реалізації адаптації. Він активується за умов помірної гіпоксії при АГ, при цьому відбувається збільшення рівня внутрішньоклітинних іонів Ca^{2+} , підвищення активності Ca^{2+} -залежного ферменту eNOS і стимуляція його синтезу, утворення в значній кількості ендотеліального NO та, як результат, покращення кровопостачання. Саме цей механізм виступає одним з важливих компонентів компенсаторного ремоделювання міокарда [240].

Незважаючи на той факт, що дії nNOS та eNOS спрямовані на виконання одних і тих самих функцій, між ними є велика різниця, що полягає, по-перше, в особливостях локалізації. Так, nNOS локалізується в саркоплазматичному ретикулумі, сарколемі, та частково є цитозольним білком, має велику здатність до транслокації, що розширяє зону її впливу, що особливо ефективно через коротку тривалість життя молекули NO [158]. В той же час, eNOS локалізується переважно у кавеолах і є медіатором механічного стресу, стимулюючим вивільнення внутрішньоклітинного кальцію від ранодінових рецепторів, що дозволяє цій ізоформі швидко реагувати на мінімальні зміни

складу міжклітинного середовища та базисного кровообігу [241]. На відміну від інших лізоформ, nNOS також локалізується в інтрамуральних гангліях та волокнах, що дозволяє їй брати участь у симпатичній передачі, посилюючи позитивний люзітропний ефект при ранній гіпертензії [242]. Також відомо, що nNOS контролює активність серцевих оксидаз та NADPH, що моделює рівні внутрішньоклітинних активних форм кисню та пероксинітриту. nNOS-залежна регуляція активності іонних каналів та внутрішньоклітинних Ca^{2+} - залежних білків може бути опосередкована пост-транскрипційною модифікацією, такими є NO-залежне S-нітрозилування та АФК-залежне окислення [156]. Таким чином, вид кінцевого метаболіту NO визначає наступні пост-транскрипційні модифікації. Це пояснює збільшення показників експресії nNOS у щурів ЕСАГ, що направлено на покращення релаксації міоцитів.

Окрім вазодилатуючого ефекту, посилення розслаблення та скорочення міокарда, eNOS приписують участь у регуляції росту кардіоміоцитів, їхньої гіпертрофії та розвитку серцевої недостатності. У цьому випадку, якщо перші ефекти реалізуються завдяки фосфорилювання / дефосфорилювання регуляцією після трансляційної активності eNOS-NO шляху, то останні, завдяки таким чинникам як фосфоінозитид 3-кіназа-серин (PI3K, phosphoinositide 3-kinase-serine) та протеїнкіназа (Akt, protein kinase) [243].

На відміну від конститутивних лізоформ, висока концентрація iNOS, яку більшість науковців розглядають як фактор, що опосередковує нітрозативний і оксидативний стрес, при АГ обтяжує ендотеліальну та міокардіальну дисфункцію через утворення великої кількості пероксинітриту [244]. У нашому дослідженні було встановлене достовірне збільшення показників експресії iNOS, що стає підтвердженням факту її участі у формуванні ПРМ та ефекту цитотоксичності, наявність яких у щурів лінії SHR було встановлено в багатьох дослідженнях [245]. Аналіз результатів ПЛР у групі ЕАГ довів суттєве, у 3,5 рази, збільшення показника експресії мРНК до iNOS. За думкою інших дослідників, такий рівень мРНК у міокарді щурів з ЕАГ пов'язаний не тільки з активуванням транскрипції мРНК у відповідь на стимулювання

патологічними факторами (активні форми кисню, пероксинітрит, H_2O_2 , цитокіни та ін.), але й доведений механізм збільшення її концентрації через сповільнення розпаду [246]. Тим самим створюється хибне коло – чим більший рівень нестабільних метаболітів, тим вищий рівень ферменту iNOS, який буде продукувати ще більший надлишок NO та сприяти розвитку оксидативного та нітрозативного стресу з міокардіальною дисфункцією.

Останнім часом з'явилися дані про залучення у фізіологічні механізми функціонування міокарда, що було продемонстровано на моделі ішемії-реперфузії. Припускають, що насправді, iNOS може проявляти здатність до захисту від «приглушення» міокарда, спричиненого пізнім пре кондиціюванням, індукованим ішемією, паралельно виявляючи антиоксидантний і вазодилатуючий ефект [169].

Але, якщо для nNOS та eNOS збільшення вмісту мРНК у міокарді було майже 1:1 у щурів з ЕАГ, то у випадку iNOS збільшення у 5,7 разів дає змогу припустити, все ж таки, надмірність і агресивність впливу на міокард цієї ізоформи, що супроводжується продукуванням пероксинітриту замість NO. Така надмірність експресії iNOS може бути пов'язана з стимулюванням гену GITR (глюкокортикоїд індукований TNF рецептор), що підвищує рівні фактору некрозу пухлини, який на пряму стимулює ген iNOS [247]. Тобто, така велика кількість iNOS є результатом прямого впливу стероїдів. Більш того, дослідження на ген-нокаутуваних мишах показали цікаву залежність АГ від ізоформ. Так, у дослідженнях Morishita та ін. (2005) з триплетним вимиканням n/i/eNOS-/- ступінь АГ була такою самою, як при ізольованому eNOS-нокаутуванні чи подвійному блокуванні n/eNOS-/-/. У той час, при ізольованій блокаді nNOS-/- (Sällström et al. 2008) та iNOS-/- (Ihrig та ін., 2001) розвиток АГ не спостерігався взагалі [205].

Вартим уваги було виявлене співвідношення ізоформ NOS у щурів з АГ. В обох групах не було відмінностей за eNOS, а nNOS та iNOS однакового переважали в міокарді щурів обох груп (рис. 6.10).

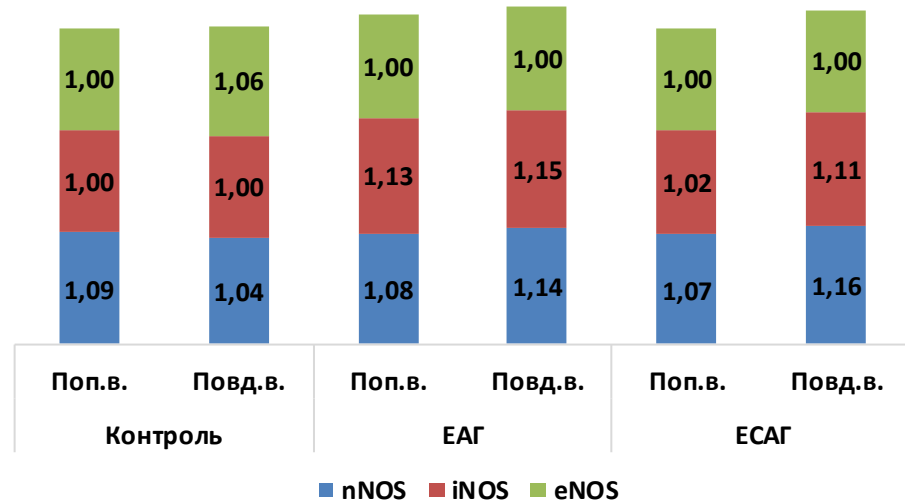


Рисунок 6.10 – Співвідношення ізоформ NOS за вмістом у міокарді щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією

Для оцінки стану системи NO було використано також дослідження рівня його кінцевих метаболітів. Так, нітрити є стабільними метаболітами NO і використовуються дослідниками як еквівалентний маркер його утворення. У групі ЕАГ встановлена більш висока концентрації нітритів на 18,8 %, у порівнянні з показником контрольних тварин. Отриманий результат можна розглядати як вагоме свідчення підвищеної активності системи NO в міокарді щурів із есенціальною гіпертензією. Що стосується концентрації нітротирозину в плазмі крові щурів, NO – залежного маркеру оксидативного стресу, то в групі щурів з есенціальною АГ також було встановлено збільшення показника на 26 %. Саме цей факт дає змогу стверджувати, що оксидативний та нітрозативний стрес відбувається не локально в міокарді, а має системний характер [248].

Отримані нами результати ізоформного профілю NOS у щурів ЕСАГ дають можливість припустити компенсаторну спрямованість зміни його балансу в бік збільшення nNOS та eNOS. Таке підвищення вмісту мРНК та ІРМ до конституційних ізоформ у міокарді свідчить про потребу в них на тлі їхнього активного залучення в лімітування гемодинамічного стресу та пошкоджуючої дії стероїдів.

Порушення регуляції механізмів продукування NO та АФК і пероксинітритів є важливою причиною ССЗ, тому логічним було дослідження рівнів кінцевих метаболітів нітритів – як маркера NO, та нітротирозину – маркера АФК [249]. Отримані в дослідженні зниження концентрації нітритів та значне підвищення рівня нітротирозину, свідчать про розвиток нітрозоксидативного стресу, що, вірогідно, є результатом «перемикання» iNOS з NO-продукуючої ізоформи на джерело вільних радикалів, що, в свою чергу, викликає вільно-радикальне ушкодження міокарда поряд із дією стероїдів, перевантаженням тиском і об'ємом через АГ у щурів ЕСАГ.

Таким чином, загальним результатом дослідження стали виявлені відмінності в типах і видах ремоделювання міокарда у відповідь на різні за тривалістю та інтенсивністю впливи (рис. 6.11).



Рисунок 6.11 – Загальний результат дослідження

Спільними ознаками ФРМ і ПРМ є розвиток гіпертрофії міокарда, що проявляється збільшенням маси серця та його питомої щільності, розмірів ядер кардіоміоцитів із зменшенням їхньої щільності до цитоплазми; змінами

пружно-еластичних властивостей міокарда за рахунок збільшення вмісту ТТ і КЛ.

Відмінними рисами перебудов міокарда при впливі переривчастої гіпоксії різної тривалості стали: гіпертрофічний тип ФРМ у ПГ15 із розвитком помірної гіпертрофії, компенсаторним збільшенням ТТ та КЛ для покращення скоротливої здатності та посилення «каркасної» функції інтерстицію і зменшенням інтенсивності апоптозу.

Поряд із цим, для ПГ60 характерним є фіброзно-апоптотичний тип ПРМ з вираженою гіпертрофією, збільшенням жорсткості міокарда, значним фіброзом і масивним апоптозом, що супроводжується ядерною дисфункцією. У цій групі виявлено достовірне стійке підвищення АТ, яке знаходилось у нормотензивному діапазоні, що є ознакою запуску структурних адаптаційних змін.

ПРМ у щурів із сформованою АГ має пряму залежність від специфічності етіопатогенетичного чинника. Так, середній АТ у щурів ЕАГ був вищий за контроль на 50,2 %, на тлі якого сформувався гіпертрофічно-фіброзний тип ПРМ із помірною гіпертрофією, формуванням фіброзу, підвищенням жорсткості міокарда та помірним апоптозом на тлі ядерної дисфункції.

Але, на відміну від ЕАГ, у щурів ЕСАГ було виявлено більший за контроль показник середнього АТ на 64,5 % і діастолічного АТ, порівняно до ЕАГ, на 17,8 %. Результатом чого стало формування гіпертрофічно-апоптотичного типу ПРМ зі значною гіпертрофією, вираженим фіброзом, значним підвищенням жорсткості міокарда і масивним апоптотичним процесом на фоні ядерної дисфункції. Такий, більш несприятливий тип ПРМ, пов'язаний не тільки з перевантаженням тиском і об'ємом, але й із прямою пошкоджуючою дією преднізолону на міокард.

В системі NO була виявлена загальна закономірність – це підвищення мРНК усіх 3-х ізоформ NOS із підвищенням експресії eNOS на тлі збільшення концентрації нітротирозину ув плазмі щурів.

Більше того, в усіх щурів з ПРМ було виявлено значне переважання nNOS, порівняно до ПГ15. Ізоформний дисбаланс у щурів ПГ60 супроводжувався зменшенням нітритів на тлі збільшення нітротирозину, що дає розуміння про значний нітросо-оксидативний стрес, тобто декомпенсацію. Ізоформний профіль в обох групах з АГ характеризувався збільшенням усіх 3-х ізоформ NOS, але в ЕАГ переважання iNOS, тоді як в ЕСАГ – nNOS, хоча мРНК iNOS була більшою. Такий ізоформний дисбаланс призвів до різного ступеня вираженості оксидативного стресу: у щурів ЕАГ поступовий розвиток, початкова стадія, а в щурів ЕСАГ – значно виражений, системний.

Таким чином, результатом проведеного дослідження стало встановлення спільних ознак характеру ремоделювання, що, незалежно від фізіологічності або патологічності впливу, супроводжувалося гіпертрофією та змінами пружно-еластичних властивостей міокарда. Проте, патоморфологічні характеристики завжди залежать від етіопатогенезу і тривалості впливів. Більш того, мофро-структурні перебудови в серцевому м'язі реалізуються за рахунок функціональних змін у системі NO.

ВИСНОВКИ

Різні стресорні впливи на міокард: гіпоксичні, гемодинамічні, механічні, нейрогуморальні, запальні, навіть при відсутності клінічно явних проявів, сприяють формуванню його ремоделювання – структурно-функціональних змін компонентів серцевого м'язу. Для ефективного діагностування та якісного прогнозу перебігу захворювань серцево-судинної системи необхідне не тільки виявлення ремоделювання міокарду, важливо диференціювати його за напрямом: фізіологічне чи патологічне, визначати характер, ступінь вираженості та спрямованість перебудов «геометрії» серця. Саме тому експериментальне дослідження ефектів фізіологічних (переривчаста гіпоксія) та патологічних впливів (артеріальна гіпертензія) на характер морфоструктурних змін у міокарді, визначення ключових ланок патогенезу та ролі регуляторної системи монооксиду азоту є актуальною проблемою сучасної патологічної фізіології, що надасть не тільки об'єктивні дані для верифікації типу ремоделювання міокарда та важливу прогностичну інформацію щодо тяжкості перебігу процесу в серцевому м'язі, але й чітке розуміння патогенетичних ланок розвитку та прогресування хвороби. Тож, метою дослідження було з'ясувати характер співвідношення маркерів ремоделювання міокарда лівого шлуночка серця і особливості стану системи оксиду азоту при фізіологічних впливах (переривчаста 15-денна та 60-денна гіпоксія) та патологічних станах (спадкова артеріальна гіпертензія – SHR та ендокринно-сольова модель).

1) Короткотривала 15-денна гіпоксія формує *фізіологічне ремоделювання міокарда* (збільшення маси серця, його питомої щільності та ЧМС), що включає *розвиток помірної гіпертрофії кардіоміоцитів із підвищенням пружно-еластичних властивостей та зниженням інтенсивності їхньої загибелі*, показниками чого є підвищення кардіотрофіну-1, тайтину, колагену I типу зі збереженим тайтин-колагеновим співвідношенням, зниження концентрації анексину V; збільшення розмірів ядер кардіоміоцитів

із зниженням їхньої щільності. Структурні перебудови в серцевому м'язі розвиваються на тлі зміни ізоформного профілю NOS, збільшення показників експресії мРНК до всіх 3-х ізоформ NOS, але із зниженням IPM до pNOS, помірного збільшення eNOS та переважання в міокарді iNOS, що супроводжується підвищенням рівнів стабільних метаболітів – нітритів на 21 %, та початком розвитку нітрово-оксидативного стресу (нітротирозин більший за контроль на 40,8 %).

2) Довготривала гіпоксична експозиція протягом 60 діб призводить до *патологічного ремоделювання міокарда* із збільшенням маси серця, його питомої щільності та значним підвищенням експресії усіх досліджуваних маркерів: формує *виражену гіпертрофію* кардіоміоцитів (більші за контроль вміст і концентрація кардіотрофіну-1, значно більший розмір ядер та зменшення їхньої щільності до цитоплазми); *збільшення жорсткості міокарда* зі значним *фіброзом* через підвищений вміст і концентрацію тайтину та колагену I типу, збільшення коефіцієнту їхнього співвідношення; *масивний апоптоз кардіоміоцитів* (майже в 2 рази більші за контроль вміст і концентрація анексину V, значне зменшення кількості ядер і концентрації у них РНК). Ремоделювання серцевого м'язу відбувається через зміни співвідношення ізоформ ферменту NOS, що характеризується збільшеною експресією конститутивних ізоформ та зниженою індукбельною на фоні значного підвищення мРНК усіх 3-х форм, та посилення системного нітрово-оксидативного стресу зі зниженням рівня нітритів на 21,8 % та значного збільшення концентрації нітротирозину в плазмі крові на 80,6 %.

3) Сформована есенціальна артеріальна гіпертензія в щурів лінії SHR характеризується збільшенням експресії усіх 4-х маркерів ремоделювання, що виявило формування *патологічного ремоделювання міокарда* (збільшення маси серця і його питомої щільності) із *помірною гіпертрофією* (більший за контроль кардіотрофіну-1, разом з більшими розмірами ядер і зменшенням їхньої щільності); *формуванням фібротичних змін* із підвищенням *жорсткості міокарда* (збільшення тайтину та вмісту колагену I типу зі

зниженням коефіцієнту тайтин/колагенового співвідношення); *помірною апоптотичною активністю в міокарді* (більший за контроль анексин V зі зменшенням кількості ядер та концентрації РНК у них). Зміни ізоформного профілю ферменту NOS демонструють більш високі показники концентрації IPM до nNOS та eNOS із переважанням у міокарді IPM до iNOS на тлі підвищення мРНК усіх 3-х ізоформ, що супроводжується збільшеним вмістом кінцевих метаболітів NO нітритів на 18,8 % та формуванням початкової стадії системного нітрито-оксидативного стресу з підвищенням концентрації ніротирозину на 26 %.

4) Вторинна ендокринно-асоційована артеріальна гіпертензія в щурів групи з ендокринно-сольовою моделлю призводить до *патологічного ремоделювання міокарда* із більшими за контроль масою серця, його питомою щільністю, ЧМС та вмістом і концентрацією всіх маркерів ремоделювання, що включає: *значну гіпертрофію кардіоміоцитів* (більші показники експресії кардіотрофіну-1 зі збільшеними розмірами ядер та зменшення їхньої щільності); *виражений фіброз із значним підвищенням жорсткості міокарда* (вищі показники експресії тайтину, колагену I типу, суттєвим підвищенням коефіцієнту тайтин-колагенового співвідношення); із значною вираженістю апоптотичного процесу (більший за контроль анексин V та зменшення кількості ядер і РНК у них). Стан системи NO, порівняно із контролем, характеризується збільшенням мРНК до nNOS, eNOS та iNOS у 2,7, 2,8 і 5,7 разів, відповідно, що супроводжується збільшенням IPM до них у міокарді із превалюванням nNOS; зменшенням нітритів на 11,7 % і збільшенням ніротирозину на 88,5 % – системний нітрито-оксидативний стрес.

5) Спільним ознаками фізіологічного і патологічного ремоделювання міокарда як при гіпоксії, так і при артеріальній гіпертензії, є розвиток гіпертрофії міокарда, що проявляється збільшенням маси серця із його щільністю, розмірів ядер кардіоміоцитів із зменшенням їхньої щільності до цитоплазми; змінами пружно-еластичних властивостей міокарда за рахунок збільшення вмісту тайтину та колагену I типу. В системі NO характерною

закономірністю є підвищення мРНК усіх 3-х ізоформ NOS із підвищенням експресії eNOS, на тлі збільшення концентрації нітротирозину в плазмі щурів.

6) Відмінними рисами впливів переривчастої гіпоксії різної тривалості є фізіологічний характер ремоделювання міокарда при 15-денній гіпоксії (через збереженість нормальної кількості ядер кардіоміоцитів із збільшенням концентрації у них РНК та зменшенням інтенсивності апоптозу, компенсаторне збільшення тайтину та колагену I типу для покращення скоротливої здатності та посилення «каркасної» функції інтерстицію, підвищення активності системи NO з превалюванням iNOS та eNOS) і патологічний – при довготривалій гіпоксії протягом 60 діб. АТ у щурів із ПГ60 хоча і знаходився в нормотензивному діапазоні, мав значення верхньої норми, гіпертрофія міокарду має більшу ступінь прояву (більший за ПГ15 показники експресії кардіотрофіну-1, зменшення кількості ядер на 40 % разом із компенсаторним їхнім збільшенням на 182 %), що супроводжується збільшенням фіброзу і масивним апоптозом, а також значне превалювання nNOS. Сформований ізоформний дисбаланс через тривалу гіпоксію супроводжується зменшенням нітритів на тлі збільшення нітротирозину.

7) Характер патологічного ремоделювання міокарда в щурів із сформованою АГ залежить від специфічності етіопатогенезу. Встановленими відмінностями є більший діастолічний артеріальний тиск у щурів з ЕСАГ, порівняно з ЕАГ, кількість ядер кардіоміоцитів і концентрація РНК в них менші. Частка маси серця в ЕСАГ більше за контроль, тоді як при ЕАГ достовірні відмінності відсутні. ПРМ у ЕСАГ має виразніший за ЕАГ фіброз і апоптоз. Ізоформний профіль в обох групах характеризується збільшенням усіх 3-х ізоформ NOS із превалюванням у ЕСАГ iNOS, у ЕСАГ – nNOS, це формує різний ступень вираженості оксидативного стресу: в щурів ЕАГ поступовий розвиток, а у щурів ЕСАГ – значно виражений, системний (зменшення нітритів із збільшенням нітротирозину).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Cohn J. N., Ferrari R., Sharpe, N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000. 35 (3). P. 569–582. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(99\)00630-0](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(99)00630-0).

2. Pfeffer M. A., Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990. 81 (4). P. 1161–1172. <https://doi.org/10.1161/01.cir.81.4.1161>.

3. Frangogiannis N. G. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Comprehensive Physiology*. 2015. 5 (4). P. 1841–1875. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150006>.

4. Molecular Mechanisms of Cardiac Remodeling and Regeneration in Physical Exercise / D. Schüttler, S. Clauss, L. T. Weckbach, S. Brunner. *Cells*. 2019. 8 (10). P. 1128. <https://doi.org/10.3390/cells8101128>.

5. A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling / L. Schirone, M. Forte, S. Palmerio et al. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017. P. 3920195. <https://doi.org/10.1155/2017/3920195>.

6. ERK: A Key Player in the Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy / S. Gallo, A. Vitacolonna, A. Bonzano et al. *International journal of molecular sciences*. 2019. 20 (9). P. 2164. <https://doi.org/10.3390/ijms20092164>.

7. Long Non-Coding RNAs in Cardiac Remodeling / S. Shen, H. Jiang, Y. Be et al. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2017. 41(5). P. 1830–1837. <https://doi.org/10.1159/000471913>.

8. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment / P. S. Azevedo, B. F. Polegato,

M. F. Minicucci et al. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2016. 106 (1). P. 62–69. <https://doi.org/10.5935/abc.20160005>.

9. Імуногістохімічна і морфо-денситометрична діагностика патологічного ремоделювання міокарда при артеріальної гіпертензії та цукровому діабеті : методичні рекомендації / Колесник Ю. М. та ін. Київ, 2015. 25с.

10. Vascular endothelial growth factor regulation of endothelial nitric oxide synthase phosphorylation is involved in isoflurane cardiac preconditioning / Y. Liu, M. Paterson, S. L. Baumgardt et al. *Cardiovascular research*. 2019. 115 (1). P. 168–178. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy157>.

11. Nitric oxide: what's new to NO? / K. Ghimire, H. M. Altmann, A. C. Straub, J. S. Isenberg. *American journal of physiology. Cell physiology*. 2017. 312 (3). P. C254–C262. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00315.2016>.

12. Totzeck M., Hendgen-Cotta U. B., Rassaf T. Nitrite-Nitric Oxide Signaling and Cardioprotection. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017. 982. P. 335–346. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55330-6_18.

13. Bondonno C. P., Croft K. D., Hodgson J. M. Dietary Nitrate, Nitric Oxide, and Cardiovascular Health. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2016. 56 (12). P. 2036–2052. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.811212>.

14. Overexpression of inducible nitric oxide synthase in the diabetic heart compromises ischemic postconditioning / T. T. Wang, M. M. Shi, X. L. Liao et al. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2019. 129. P. 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.02.011>.

15. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? / M. Lind, A. Hayes, M. Caprnda et al. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 2017. 93. P. 370–375. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.036>.

16. Меерсон Ф. З., Пшенникова М. Г. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам. 1988. М.: Медицина, 256с.

17. Физиология адаптационных процессов: руководство по физиологии. М.: Наука, 1986. – 635 с.

18. Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms / G. M. Ellison, C. D. Waring, C. Vicinanza, D. Torella. *Heart (British Cardiac Society)*. 2012. 98 (1). P. 5–10. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2011-300639>.

19. Shimizu I., Minamino T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2016. 97. P. 245–262. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.06.001>.

20. Distinct lipidomic profiles in models of physiological and pathological cardiac remodeling, and potential therapeutic strategies / Y. Tham, K. Huynh, N. Mellett et al. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular And Cell Biology Of Lipids*. 2018. 1863 (3). P. 219-234. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.12.003>.

21. Xia P., Liu Y., Cheng Z. Signaling Pathways in Cardiac Myocyte Apoptosis. *BioMed research international*. 2016. P. 9583268. <https://doi.org/10.1155/2016/9583268>.

22. Cardiac remodeling in normotensive pregnancy and in pregnancy complicated by hypertension: systematic review and meta-analysis / S. De Haas, C. Ghossein-Doha, L. Geerts et al. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2017. 50 (6). P. 683–696. <https://doi.org/10.1002/uog.17410>.

23. Evolution of ventricular hypertrophy and myocardial mechanics in physiological and pathological hypertrophy / F. Yalçın, N. Kucukler, O. Cingolani et al. *Journal Of Applied Physiology*. 2019. 126 (2). P. 354-362. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00199.2016>.

24. Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy / J. R. McMullen, T. Shioi, L. Zhang et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003. 100 (21). P. 12355–12360. <https://doi.org/10.1073/pnas.1934654100>.

25. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies / B. C. Bernardo, K. L. Weeks, L. Pretorius, J. R. McMullen. *Pharmacology & therapeutics*. 2010. 128 (1). P. 191–227. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.04.005>.

26. Nakamura M., Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nature reviews. Cardiology*. 2018. 15 (7). P. 387–407. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0007-y>.

27. Long Noncoding RNAs in Pathological Cardiac Remodeling: A Review of the Update Literature / H. Zhou, B. Wang, Y. X. Yang et al. *BioMed research international*. 2019. P. 7159592. <https://doi.org/10.1155/2019/7159592>.

28. Pathological Remodeling of the Myocardium in Chronic Heart Failure: Role of PGC-1 α / T. G. Kulikova, O. V. Stepanova, A. D. Voronova et al. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2018. 164 (6). P. 794–797. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4082-1>.

29. Gibb A. A., Hill B. G. Metabolic Coordination of Physiological and Pathological Cardiac Remodeling. *Circulation research*. 2018. 123(1). P. 107–128. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312017>.

30. Aerobic exercise training promotes physiological cardiac remodeling involving a set of microRNAs / Fernandes T., Baraúna V. G., Negrão C. E. et al. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2015. 309 (4). P. H543–H552. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00899.2014>.

31. Differential cardiac hypertrophy and signaling pathways in pressure versus volume overload / You J., Wu J., Zhang Q. et al. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2018. 314 (3). P. H552–H562. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00212.2017>.

32. Hypoxia-Induced Mitogenic Factor Promotes Cardiac Hypertrophy via Calcium-Dependent and Hypoxia-Inducible Factor-1 α Mechanisms / S. Kumar, G. Wang, W. Liu et al. *Hypertension*. 2018. 72 (2). P. 331–342. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.10845>.

33. Cardiac Hypertrophy: An Introduction to Molecular and Cellular Basis / M. Samak, J. Fatullayev, A. Sabashnikov et al. *Medical science monitor basic research*. 2016. 22. P. 75–79. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.900437>.
34. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets / Y. K. Tham, B. C. Bernardo, J. Y. Ooi et al. *Archives of toxicology*. 2015. 89 (9). P. 1401–1438. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1477-x>.
35. The Hypertensive Myocardium: From Microscopic Lesions to Clinical Complications and Outcomes / M. U. Moreno, R. Eiros, J. J. Gavira et al. *The Medical clinics of North America*. 2017. 101 (1). P. 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2016.08.002>.
36. Cardiotrophin 1 stimulates beneficial myogenic and vascular remodeling of the heart / M. Abdul-Ghani, C. Suen, B. Jiang et al. *Cell research*. 2017. 27 (10). P. 1195–1215. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.87>.
37. López-Yoldi M., Moreno-Aliaga M. J., Bustos M. Cardiotrophin-1: A multifaceted cytokine. *Cytokine & growth factor reviews*. 2015. 26 (5). P. 523–532. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.009>.
38. In vivo effects of cardiotrophin-1 / H. Jin, R. Yang, G. A. Keller et al. *Cytokine*. 1996. 8 (12). P. 920–926. <https://doi.org/10.1006/cyto.1996.0123>.
39. Cardiotrophin-1 in hypertensive heart disease / A. González, B. López, S. Ravassa et al. *Endocrine*. 2012. 42 (1). P. 9–17. <https://doi.org/10.1007/s12020-012-9649-4>.
40. Cardiotrophin-1 can protect cardiac myocytes from injury when added both prior to simulated ischaemia and at reoxygenation / B. K. Brar, A. Stephanou, Z. Liao et al. *Cardiovascular research*. 2001. 51 (2). P. 265–274. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(01\)00294-2](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(01)00294-2).
41. CT-1 (Cardiotrophin-1)-Gal-3 (Galectin-3) Axis in Cardiac Fibrosis and Inflammation / E. Martínez-Martínez, C. Brugnolaro, J. Ibarrola et al. *Hypertension*. 2019. 73 (3). P. 602–611. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11874>.

42. Emerging evidence for the role of cardiotrophin-1 in cardiac repair in the infarcted heart / D. H. Freed, R. H. Cunnington, A. L. Dangerfield et al. *Cardiovascular research*. 2005. 65 (4). P. 782–792. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.11.026>.
43. Watanabe T., Konii H., Sato K. Emerging Roles of Cardiotrophin-1 in the Pathogenesis and Biomarker of Atherosclerosis. *Multidisciplinary Scientific Journal*. 2018. 1 (1). P. 94-105. <https://doi.org/10.3390/j1010010>.
44. López N., Díez J., Fortuño M. A. Characterization of the protective effects of cardiotrophin-1 against non-ischemic death stimuli in adult cardiomyocytes. *Cytokine*. 2005. 30 (5). P. 282–292. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2005.01.016>.
45. Intracellular signaling of cardiac fibroblasts / P. L. Roche, K. L. Filomeno, R. A. Bagchi, M. P. Czubryt. *Comprehensive Physiology*. 2015. 5 (2). P. 721–760. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140044>.
46. Cardiac Fibrosis / J. Travers, F. Kamal, J. Robbins et al. *Circulation Research*. 2016. 118 (6). P. 1021-1040. <https://doi.org/10.1161/circresaha.115.306565>.
47. Biomarkers Associated with Atrial Fibrosis and Remodeling / Dilaveris P., Antoniou C., Manolakou P. et al. *Current Medicinal Chemistry*. 2019. 26 (5). P. 780-802. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170918122502>.
48. The transcription factor scleraxis is a critical regulator of cardiac fibroblast phenotype / R. A. Bagchi, P. Roche, N. Aroutiounova et al. *BMC biology*. 2016. 14. P. 21. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0243-8>.
49. Al Hattab D., Czubryt M. A primer on current progress in cardiac fibrosis. *Canadian Journal Of Physiology And Pharmacology*. 2017. 95 (10). P. 1091-1099. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0687>.
50. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis / E. M. Zeisberg, O. Tarnavski, M. Zeisberg et al. *Nature medicine*. 2007. 13 (8). P. 952–961. <https://doi.org/10.1038/nm1613>.

51. Epicardial Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Heart Development and Disease / M. Krainock, O. Toubat, S. Danopoulos et al. *Journal of clinical medicine*. 2016. 5 (2). P. 27. <https://doi.org/10.3390/jcm5020027>.
52. Cardiac Fibrosis and Cardiac Fibroblast Lineage-Tracing: Recent Advances / X. Fu, Q. Liu, C. Li et al. *Frontiers in physiology*. 2020. 11. P. 416. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00416>.
53. Role of Circulating Fibrocytes in Cardiac Fibrosis / R. J. Lin, Z. Z. Su, S. M. Liang et al. *Chinese medical journal*. 2016. 129 (3). P. 326–331. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.174503>.
54. Honold L., Nahrendorf M. Resident and Monocyte-Derived Macrophages in Cardiovascular Disease. *Circulation research*. 2018. 122 (1). P. 113–127. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311071>.
55. Frangogiannis N. Cardiac fibrosis: Cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities. *Molecular Aspects Of Medicine*. 2019. 65. P. 70-99. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.07.001>.
56. Pressure overload leads to an increased accumulation and activity of mast cells in the right ventricle / H. Luitel, A. Sydykov, Y. Schymura et al. *Physiological reports*. 2017. 5 (6). P. e13146. <https://doi.org/10.14814/phy2.13146>.
57. Mast cells regulate myofilament calcium sensitization and heart function after myocardial infarction / A. Ngkelo, A. Richart, J. A. Kirk et al. *The Journal of experimental medicine*. 2016. 213 (7). P. 1353–1374. <https://doi.org/10.1084/jem.20160081>.
58. Abdullah C. S., Jin Z. Q. Targeted deletion of T-cell S1P receptor 1 ameliorates cardiac fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2018. 32 (10). P. 5426–5435. <https://doi.org/10.1096/fj.201800231R>.
59. Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype / M. Horckmans, L. Ring, J. Duchene et al. *European heart journal*. 2017. 38 (3). P. 187–197. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw002>.

60. Frangogiannis N. G. Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. *Physiological reviews*. 2012. 92 (2). P. 635–688. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2011>.
61. Bornstein P. Matricellular proteins: an overview. *Journal of cell communication and signaling*. 2009. 3 (3-4). P. 163–165. <https://doi.org/10.1007/s12079-009-0069-z>.
62. Grosche J., Meißner J., Eble J. A. More than a syllable in fib-ROS-is: The role of ROS on the fibrotic extracellular matrix and on cellular contacts. *Molecular aspects of medicine*. 2018. 63. P. 30–46. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.03.005>.
63. Opposing Actions of Fibroblast and Cardiomyocyte Smad3 Signaling in the Infarcted Myocardium / P. Kong, A. V. Shinde, Y. Su et al. *Circulation*. 2018. 137 (7). P. 707–724. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029622>.
64. Frangogiannis N. G. The extracellular matrix in myocardial injury, repair, and remodeling. *The Journal of clinical investigation*. 2017. 127 (5). P. 1600–1612. <https://doi.org/10.1172/JCI87491>.
65. Extracellular matrix structure / A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, N. K. Karamanos. *Advanced drug delivery reviews*. 2016. 97. P. 4–27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>.
66. Fibrillar Type I Collagen Enhances the Differentiation and Proliferation of Myofibroblasts by Lowering $\alpha 2\beta 1$ Integrin Expression in Cardiac Fibrosis / J. Hong, M. Chu, L. Qian et al. *BioMed research international*. 2017. P. 1790808. <https://doi.org/10.1155/2017/1790808>.
67. Type I collagen degradation during tissue repair: comparison of mechanisms following fracture and acute coronary syndromes / R. Stansfield, F. Gossiel, A. Morton et al. *Bone*. 2014. 69. P. 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.08.017>.
68. Changes in collagen metabolism account for ventricular functional recovery following beta-blocker therapy in patients with chronic heart failure / M. Fukui, A. Goda, K. Komamura et al. *Heart and vessels*. 2016. 31 (2). P. 173–182. <https://doi.org/10.1007/s00380-014-0597-1>.

69. The relationship between markers of extracellular cardiac matrix turnover: infarct healing and left ventricular remodelling following primary PCI in patients with first-time STEMI / C. Manhenke, T. Ueland, B. I. Jugdutt et al. *European heart journal*. 2014. 35 (6). P. 395–402. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh482>.

70. Role of Exercise-Induced Cardiac Remodeling in Ovariectomized Female Rats / R. Szabó, Z. Karácsonyi, D. Börzsei et al. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018. P. 6709742. <https://doi.org/10.1155/2018/6709742>.

71. Chronic Pressure Overload Induces Cardiac Hypertrophy and Fibrosis via Increases in SGLT1 and IL-18 Gene Expression in Mice / N. Matsushita, N. Ishida, M. Ibi et al. *International heart journal*. 2018. 59 (5). P. 1123–1133. <https://doi.org/10.1536/ihj.17-565>.

72. Characterization of the inflammatory and fibrotic response in a mouse model of cardiac pressure overload / Y. Xia, K. Lee, N. Li et al. *Histochemistry and cell biology*. 2009. 131 (4). P. 471–481. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0541-5>.

73. Li L., Zhao Q., Kong W. Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2018. 68-69. P. 490–506. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.013>.

74. Effects of nonselective endothelin-1 receptor antagonism on cardiac mast cell-mediated ventricular remodeling in rats / D. B. Murray, J. D. Gardner, G. L. Brower, J. S. Janicki. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2008. 294 (3). P. H1251–H1257. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00622.2007>.

75. Abnormal cardiac wall motion and early matrix metalloproteinase activity / R. A. García, K. L. Brown, R. S. Pavelec et al. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2005. 288 (3). P. H1080–H1087. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00860.2004>.

76. Kellermayer D., Smith J. E., Granzier H. Titin mutations and muscle disease. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2019. 471 (5). P. 673–682. <https://doi.org/10.1007/s00424-019-02272-5>.

77. Linke W. A. Titin Gene and Protein Functions in Passive and Active Muscle. *Annual review of physiology*. 2018. 80. P. 389–411. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317-121234>.

78. Koser F., Loescher C., Linke W. A. Posttranslational modifications of titin from cardiac muscle: how, where, and what for?. *The FEBS journal*. 2019. 286 (12). P. 2240–2260. <https://doi.org/10.1111/febs.14854>.

79. Gigantic variety: expression patterns of titin isoforms in striated muscles and consequences for myofibrillar passive stiffness / C. Neagoe, C. A. Opitz, I. Makarenko, W. A. Linke. *Journal of muscle research and cell motility*. 2003. 24 (2-3). P. 175–189. <https://doi.org/10.1023/a:1026053530766>.

80. Developmental control of titin isoform expression and passive stiffness in fetal and neonatal myocardium / S. Lahmers, Y. Wu, D. R. Call et al. *Circulation research*. 2004. 94 (4). P. 505–513. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000115522.52554.86>.

81. Detyrosinated microtubules buckle and bear load in contracting cardiomyocytes / P. Robison, M. A. Caporizzo, H. Ahmadzadeh et al.. *Science (New York, N.Y.)*. 2016. 352 (6284). P. aaf0659. <https://doi.org/10.1126/science.aaf0659>.

82. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system / M. L. Bang, T. Centner, F. Fornoff et al. *Circulation research*. 2001. 89 (11). P. 1065–1072. <https://doi.org/10.1161/hh2301.100981>.

83. Qi D., Fu M. Cardiomyocyte Apoptosis in Heart Development: Methods and Protocols. *Methods In Molecular Biology*. 2011. P. 191-197. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-523-7_18.

84. Guidelines for evaluating myocardial cell death / P. Mishra, A. Adameova, J. Hill et al. *American Journal Of Physiology-Heart And Circulatory Physiology*. 2019. 317 (5). P. H891-H922. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00259.2019>.

85. Anti-apoptosis in nonmyocytes and pro-autophagy in cardiomyocytes: two strategies against postinfarction heart failure through regulation of cell

death/degeneration / G. Takemura, H. Kanamori, H. Okada et al. *Heart failure reviews*. 2018. 23 (5). P. 759–772. <https://doi.org/10.1007/s10741-018-9708-x>.

86. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 / L. Galluzzi, I. Vitale, S. A. Aaronson et al. *Cell death and differentiation*. 2018. 25 (3). P. 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.

87. Leung K. 99mTc-Hydrazinonicotinamide-annexin V. 2006 Feb 28 [Updated 2008 Apr 6 / In: Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD) [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004-2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK23472/>.

88. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science (New York, N.Y.)*. 1995. 267 (5203). P. 1445–1449. <https://doi.org/10.1126/science.7878463>.

89. van Heerde W. Markers of apoptosis in cardiovascular tissues focus on Annexin V. *Cardiovascular Research*. 2000. 45 (3). P. 549-559. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00396-x](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00396-x).

90. Thiagarajan P., Tait J. F. Binding of annexin V placental anticoagulant protein I to platelets. Evidence for phosphatidylserine exposure in the procoagulant response of activated platelets. *The Journal of biological chemistry*. 1990. 265 (29). P. 17420–17423.

91. Apoptosis: the importance of nuclear medicine / F. G. Blankenberg, J. Tait, K. Ohtsuki, H. W. Strauss. *Nuclear medicine communications*. 2000. 21 (3). P. 241–250. <https://doi.org/10.1097/00006231-200003000-00008>.

92. Annexin A5: an imaging biomarker of cardiovascular risk / E. Laufer, C. Reutelingsperger, J. Narula, L. Hofstra. *Basic Research In Cardiology*. 2008. 103 (2). P. 95-104. <https://doi.org/10.1007/s00395-008-0701-8>.

93. ANXA5 annexin A5 Homo sapiens (human) : Электронный ресурс. *NCBI:Gene*. 2018. Режим доступа к ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/308>.

94. Review: Annexin-A5 and cell membrane repair / A. Bouter, R. Carmeille, C. Gounou et al. *Placenta*. 2015. 36. Suppl 1. P. S43–S49. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.01.193>.

95. Annexin A7 deficiency potentiates cardiac NFAT activity promoting hypertrophic signaling / J. Voelkl, I. Alesutan, T. Pakladok et al. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014. 445(1). P. 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.186>.

96. Protection of the membrane permeability barrier by annexins / C. E. Creutz, J. K. Hira, V. E. Gee, J. M. Eaton. *Biochemistry*. 2012. 51 (50). P. 9966–9983. <https://doi.org/10.1021/bi3013559>.

97. Annexins family: insights into their functions and potential role in pathogenesis of sarcoidosis. *Journal of translational medicine*. 2016. 14. P. 89. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0843-7>. Mirsaedi, M., Gidfar, S., Vu, A., Schraufnagel, D.

98. ANXA6 annexin A6 Homo sapiens (human) : Электроний ресурс. *NCBI:Gene*. 2018. Режим доступа до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/309>.

99. ANXA7 annexin A7 Homo sapiens (human) : Электроний ресурс. *NCBI:Gene*. 2018. Режим доступа до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/310>.

100. Dysregulation of the calcium handling protein, CCDC47, is associated with diabetic cardiomyopathy / K. Thapa, K. C. Wu, A. Sarma et al. *Cell & bioscience*. 2018. 8. P. 45. <https://doi.org/10.1186/s13578-018-0244-0>.

101. Visualization of cell death in vivo with the annexin A5 imaging protocol / C. Reutelingsperger, E. Dumont, P. Thimister et al. *Journal Of Immunological Methods*. 2002. 265 (1-2). P. 123-132. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(02\)00075-3](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(02)00075-3).

102. Molecular Imaging of Apoptosis in Ischemia Reperfusion Injury With Radiolabeled Duramycin Targeting Phosphatidylethanolamine / H. Kawai,

F. Chaudhry, A. Shekharet al. *JACC: Cardiovascular Imaging*. 2018. 11 (12). P. 1823-1833. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2017.11.037>.

103. Voss A., Strasser A. The essentials of developmental apoptosis. *F1000research*. 2020. 9. P. 148. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21571.1>.

104. The association between annexin A5 (ANXA5) gene polymorphism and left ventricular hypertrophy (LVH) in Chinese endogenous hypertension patients / B. Zhang, X. Zeng, Y. Xu et al. *Medicine*. 2017. 96 (44). P. e8305. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000008305>.

105. An SRF/miR-1 axis regulates NCX1 and annexin A5 protein levels in the normal and failing heart / E. Tritsch, Y. Mallat, F. Lefebvre et al. *Cardiovascular research*. 2013. 98 (3). P. 372–380. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt042>.

106. Annexin A5 in treated hypertensive patients and its association with target organ damage / A. Maloberti, P. Meani, P. Vallerio et al. *Journal of hypertension*. 2017. 35 (1). P. 154–161. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001143>.

107. Intravascular cells and circulating microparticles induce procoagulant activity via phosphatidylserine exposure in heart failure / Y. Kou, L. Zou, R. Liu et al. *Journal of thrombosis and thrombolysis*. 2019. 48 (2). P. 187–194. <https://doi.org/10.1007/s11239-019-01889-8>.

108. Fundamental Mechanisms of Regulated Cell Death and Implications for Heart Disease / D. P. Del Re, D. Amgalan, A. Linkermann et al. *Physiological reviews*. 2019. 99 (4). P. 1765–1817. <https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2018>.

109. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury / M. Y. Wu, G. T. Yiang, W. T. Liao et al. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2018. 46 (4). P. 1650–1667. <https://doi.org/10.1159/000489241>.

110. Hajime A., Hiroaki S., Norihiko T. The Roles of Hypoxia Signaling in the Pathogenesis of Cardiovascular Diseases. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2017. 24. P. 884-894 <http://doi.org/10.5551/jat.RV17009>.

111. Haque Z., Wang D. How cardiomyocytes sense pathophysiological stresses for cardiac remodeling. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016. 74 (6). P. 983-1000. <http://doi.org/10.1007/s00018-016-2373-0>.
112. Pullamsetti SS, Savai R. Macrophage regulation during vascular remodeling: Implications for pulmonary hypertension therapy. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2017. 56. P. 556-558. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0033ED>.
113. Induction of in vitro human macrophage anti-mycobacterium tuberculosis activity: Requirement for ifn-gamma and primed lymphocytes / M. G. Bonecini-Almeida, S. Chitale, I. Boutsikakis et al. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.1998; 160: 4490-4499.
114. Fujiu K., Wang J., Nagai R. Cardioprotective function of cardiac macrophages. *Cardiovascular research*. 2014. 102 (2). P. 232–239. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu059>.
115. Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity / M. Locati, G. Curtale, A. Mantovani et al. *Annual review of pathology*. 2020. 15. P. 123–147. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718>.
116. Contribution of Macrophage Polarization to Metabolic Diseases / Y. Komohara, Y. Fujiwara, K. Ohnishi et al. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2016. 23 (1). P. 10–17. <https://doi.org/10.5551/jat.32359>.
117. Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens / K. C. El Kasmi, J. E. Qualls, J. T. Pesce et al. *Nature immunology*. 2008. 9 (12). P. 1399–1406. <https://doi.org/10.1038/ni.1671>.
118. Differential activation and antagonistic function of HIF- α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis / N. Takeda, E. L. O'Dea, A. Doedens et al. *Genes & development*. 2010. 24 (5). P. 491–501. <https://doi.org/10.1101/gad.1881410>.
119. Characterization of heart macrophages in rhesus macaques as a model to study cardiovascular disease in humans / D. I. Petkov, D. X. Liu, C. Allers et al.

Journal of leukocyte biology. 2019. 106 (6). P. 1241–1255.
<https://doi.org/10.1002/JLB.1A0119-017R>.

120. Prabhu S. D., Frangogiannis N. G. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circulation research.* 2016. 119 (1). P. 91–112.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303577>.

121. Zhang Y., Wen W., Liu H. The Role of Immune Cells in Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction. *Journal of cardiovascular pharmacology.* 2020. 76 (4). P. 407–413. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000876>.

122. Animal models for the study of primary and secondary hypertension in humans / H. Y. Lin, Y. T. Lee, Y. W. Chan, G. Tse. *Biomedical reports.* 2016. 5 (6). P. 653–659. <https://doi.org/10.3892/br.2016.784>.

123. Metabolic Changes in Spontaneously Hypertensive Rat Hearts Precede Cardiac Dysfunction and Left Ventricular Hypertrophy / J. Li, B. A. Kemp, N. L. Howell et al. *Journal of the American Heart Association.* 2019. 8 (4). P. e010926. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.010926>.

124. Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association / L. Lerman, T. Kurtz, R. Touyz et al. *Hypertension.* 2019. 73 (6). <https://doi.org/10.1161/hyp.0000000000000090>.

125. Charles L., Triscott J., Dobbs B. Secondary Hypertension: Discovering the Underlying Cause. *American family physician.* 2017. 96 (7). P. 453–461.

126. Funder J. W. Aldosterone and Mineralocorticoid Receptors-Physiology and Pathophysiology. *International journal of molecular sciences.* 2017. 18 (5). P. 1032. <https://doi.org/10.3390/ijms18051032>.

127. Fjeld C. C., Birdsong W. T., Goodman R. H. Differential binding of NAD⁺ and NADH allows the transcriptional corepressor carboxyl-terminal binding protein to serve as a metabolic sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003. 100 (16). P. 9202–9207.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1633591100>.

128. Chai W., Garrelds I. M., Arulmani U. Genomic and nongenomic effects of aldosterone in the rat heart: why is spironolactone cardioprotective?. *British journal of pharmacology*. 2005. 145 (5). P. 664–671. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706220>.

129. Danukalo M. V., Hancheva O. V. Isoform profile of NOS enzyme in structure of rats' solitary-vagal complex in arterial hypertension of various origin. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2020. Т. 13. №1 (32). С. 78-83. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2020.1.198141>.

130. Hypertension with primary aldosteronism is associated with increased carotid intima-media thickness and endothelial dysfunction / A. Demirkiran, H. Everaars, A. Elitok et al. *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn.)*. 2019. 21 (7). P. 932–941. <https://doi.org/10.1111/jch.13585>.

131. van Gelder T., Hesselink D. A. Mycophenolate revisited. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2015. 28 (5). P. 508–515. <https://doi.org/10.1111/tri.12554>.

132. Arginine and Endothelial Function / J. Gambardella, W. Khondkar, M. B. Morelli et al. *Biomedicines*. 2020. 8 (8). P. 277. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8080277>.

133. Cruz-Topete D., Oakley R. H., Cidlowski J. A. Glucocorticoid Signaling and the Aging Heart. *Frontiers in endocrinology*. 2020. 11. P. 347. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00347>.

134. Basting T., Lazartigues E. DOCA-Salt Hypertension: an Update. *Current hypertension reports*. 2017. 19 (4). P. 32. <https://doi.org/10.1007/s11906-017-0731-4>.

135. Lundberg J. O., Gladwin, M. T., Weitzberg, E. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. *Nature reviews. Drug discovery*. 2015. 14 (9). P. 623–641. <https://doi.org/10.1038/nrd4623>.

136. Manukhina, E. B., Downey, H. F., Mallet, R. T. Role of Nitric Oxide in Cardiovascular Adaptation to Intermittent Hypoxia. *Experimental Biology and Medicine*. 2006. 231 (4). P. 343–365. <https://doi.org/10.1177/153537020623100401>.

137. Treuer A. V., Gonzalez D. R. Nitric oxide synthases, S-nitrosylation and cardiovascular health: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities (review). *Molecular medicine reports*. 2015. 11 (3). P. 1555–1565. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2968>.

138. Депо оксида азота (NO) и его адаптивная роль в сердечно-сосудистой системе / Е.Б. Манухина, Г.Ф. Дауни, Р.Т. Маллет и др. *Патогенез*. 2012. 10 (2). P. 19-27

139. Proteolytic degradation of nitric oxide synthase: effect of inhibitors and role of hsp90-based chaperones / Y. Osawa, E. R. Lowe, A. C. Everett et al. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2003. 304 (2). P. 493–497. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.035055>.

140. Abe H., Semba H., Takeda N. The Roles of Hypoxia Signaling in the Pathogenesis of Cardiovascular Diseases. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2017. 24 (9). P. 884-894. <https://doi.org/10.5551/jat.RV17009>.

141. Nihon yakurigaku zasshi / M. Tsutsui, H. Shimokawa, Y. Otsuji, N. Yanagihara. *Folia pharmacologica Japonica*. 2014. 143 (5). P. 226–231. <https://doi.org/10.1254/fpj.143.226>.

142. Poulos T. L., Li H. Nitric oxide synthase and structure-based inhibitor design. *Nitric oxide : biology and chemistry*. 2017. 63. P. 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.11.004>.

143. Lundberg J. O., Weitzberg E., Gladwin M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery*. 2008. 7 (2). P. 156–167. <https://doi.org/10.1038/nrd2466>.

144. The Role of Oxidative Stress in Cardiac Disease: From Physiological Response to Injury Factor / R. D'Oria, R. Schipani, A. Leonardini et al. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2020. P. 5732956. <https://doi.org/10.1155/2020/5732956>.

145. Nitrite and nitrate chemical biology and signalling / A. W. DeMartino, D. B. Kim-Shapiro, R. P. Patel, M. T. Gladwin. *British journal of pharmacology*. 2019. 176 (2). P. 228–245. <https://doi.org/10.1111/bph.14484>.

146. Mark Nicholls. Nitric oxide discovery Nobel Prize winners: Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro, and Ferid Murad shared the Noble Prize in 1998 for their discoveries concerning nitric oxide as a signalling molecule in the cardiovascular system. *European Heart Journal*. 40 (22). P. 1747–1749. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz361>.

147. Role of Nitric Oxide in the Cardiovascular and Renal Systems / A. Ahmad, S. K. Dempsey, Z. Daneva et al. *International journal of molecular sciences*. 2018. 19 (9). P. 2605. <https://doi.org/10.3390/ijms19092605>.

148. Nitric oxide and the heart: update on new paradigms / C. Belge, P. B. Massion, M. Pelat, J. L. Balligand. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005. 1047. P. 173–182. <https://doi.org/10.1196/annals.1341.016>.

149. Blood Pressure in Healthy Humans Is Regulated by Neuronal NO Synthase / H. Shabeeh, S. Khan, B. Jiang et al. *Hypertension*. 2017. 69 (5). P. 970–976. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08792>.

150. ROS and endothelial nitric oxide synthase (eNOS)-dependent trafficking of angiotensin II type 2 receptor begets neuronal NOS in cardiac myocytes / J. H. Jang, J. N. Chun, S. Godo et al. *Basic research in cardiology*. 2015. 110 (3). P. 21. <https://doi.org/10.1007/s00395-015-0477-6>.

151. The Subcellular Localisation of Neuronal Nitric Oxide Synthase Determines the Downstream Effects of NO on Myocardial Function / R. Carnicer, S. Suffredini, X. Liu et al. *Cardiovascular research*. 2017. 113(3), 321–331. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx002>.

152. nNOS gene deletion exacerbates pathological left ventricular remodeling and functional deterioration after myocardial infarction / D. Dawson, C. A. Lygate, M. H. Zhang et al. *Circulation*. 2005. 112 (24). P. 3729–3737. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.539437>.

153. Inhibition of nitric oxide synthases, but not inducible nitric oxide synthase, selectively worsens left ventricular function after successful resuscitation from cardiac arrest in swine / B. B. Dokken, M. A. Gaballa, R. W. Hilwig et al. *Academic emergency medicine : official journal of the Society for Academic*

Emergency Medicine. 2015. 22 (2). P. 197–203.
<https://doi.org/10.1111/acem.12575>.

154. Zhang Y. H. Neuronal nitric oxide synthase in hypertension - an update. *Clinical hypertension*. 2016. 22. P. 20. <https://doi.org/10.1186/s40885-016-0055-8>.

155. Neuronal Nitric Oxide Synthase in Vascular Physiology and Diseases / E. D. Costa, B. A. Rezende, S. F. Cortes, V. S. Lemos. *Frontiers in physiology*. 2016. 7. P. 206. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00206>.

156. Zhang Y. H. Nitric oxide signalling and neuronal nitric oxide synthase in the heart under stress. *F1000Research*. 2017. 6. P. 742.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.10128.1>.

157. Enhanced XOR activity in eNOS-deficient mice: Effects on the nitrate-nitrite-NO pathway and ROS homeostasis / M. Peleli, C. Zollbrecht, M. F. Montenegro et al. *Free radical biology & medicine*. 2016. 99. P. 472–484.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.004>.

158. Farah C., Michel L., Balligand J. L. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. *Nature reviews. Cardiology*. 2018. 15 (5). P. 292–316. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.224>.

159. Superoxide induces endothelial nitric-oxide synthase protein thiyl radical formation, a novel mechanism regulating eNOS function and coupling / C. A. Chen, C. H. Lin, L. J. Druhan et al. *The Journal of biological chemistry*. 2011. 286 (33). P. 29098–29107. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.240127>.

160. nNOS gene deletion exacerbates pathological left ventricular remodeling and functional deterioration after myocardial infarction / D. Dawson, C. A. Lygate, M. H. Zhang et al. *Circulation*. 2005. 112 (24). P. 3729–3737.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.539437>.

161. Ischemic postconditioning protects the heart against ischemia-reperfusion injury via neuronal nitric oxide synthase in the sarcoplasmic reticulum and mitochondria / L. Hu, J. Wang, H. Zhu et al. *Cell death & disease*. 2016. 7 (5). P. e2222. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.108>.

162. Obligatory role of neuronal nitric oxide synthase in the heart's antioxidant adaptation with exercise / S. R. Roof, H. T. Ho, S. C. Little et al. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 81. P. 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.01.003>.

163. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition / M. A. Cinelli, H. T. Do, G. P. Miley, R. B. Silverman. *Medicinal research review*. 2020. 40 (1). P. 158–189. <https://doi.org/10.1002/med.21599>.

164. Гарматина О. Ю., Ткаченко М. Н., Мойбенко А. А. Индуцибельная синтаза оксида азота при патологии сердца : обзор литературы и собственных исследований. *Журнал АМН України*. 2005. 11 (4). С. 645–665.

165. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes / D. A. Geller, C. J. Lowenstein, R. A. Shapiro et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993 90 (8). 3491–3495. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3491>.

166. Drexler H. Nitric oxide synthases in the failing human heart: a doubled–edged sword? *Circulation*. 1999. № 99 (23). P. 2972–2975.

167. NOS2 nitric oxide synthase 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - *NCBI*. (2020). from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4843>.

168. Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death / I. N. Mungrue, R. Gros, X. You et al. *The Journal of clinical investigation*. 2002. 109 (6). P. 735–743. <https://doi.org/10.1172/JCI13265>.

169. The Dual Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: Friend or Foe? / Yu X., Ge L., Niu L. et al. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018. P. 8364848. <https://doi.org/10.1155/2018/8364848>.

170. Endothelial nitric oxide synthase: a potential therapeutic target for cerebrovascular diseases / J. Zhu, W. Song, L. Li, X. Fan. *Molecular brain*. 2016. 9. P. 30. <https://doi.org/10.1186/s13041-016-0211-9>.

171. Endothelial S1pr1 regulates pressure overload-induced cardiac remodelling through AKT-eNOS pathway / X. Liu, J. Wu, C. Zhu et al. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2020. 24(2). P. 2013–2026. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14900>.

172. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells / O. Feron, L. Belhassen, L. Kobzik et al. *The Journal of biological chemistry*. 1996. 271 (37). P. 22810–22814. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.37.22810>.

173. NOS3 nitric oxide synthase 3 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. 2020. Retrieved 25 October 2020, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4846>.

174. eNOS uncoupling in cardiovascular diseases-the role of oxidative stress and inflammation / S. Karbach, P. Wenzel, A. Waisman et al. *Current pharmaceutical design*. 2014. 20 (22). P. 3579–3594. <https://doi.org/10.2174/13816128113196660748>.

175. Improvement in left ventricular remodeling by the endothelial nitric oxide synthase enhancer AVE9488 after experimental myocardial infarction / D. Fraccarollo, J. D. Widder, P. Galuppo et al. *Circulation*. 2008. 118 (8). P. 818–827. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.717702>.

176. Council Directive 2010 / 63EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

177. Закон України № 3447-IV «Про захист тварин від жорсткого поводження». *Відомості Верховної Ради України*. 2006. № 27. С. 230.

178. Пат. 112290 Україна, МПК G09B 23/28 (2006/01). Спосіб моделювання фізіологічного ремоделювання міокарда у дрібних гризунів / Колесник Ю. М., Ганчева О. В., Абрамов А. В., Іваненко Т. В., Федотова М. І., Данукало М. В., заявник та власник Запорізький державний медичний університет. - № 2016 06154; заявл. 06.06.16; опубл. 12.12.16, Бюл. № 23.

179. Doris P. A. Genetics of hypertension: an assessment of progress in the spontaneously hypertensive rat. *Physiological genomics*. 2017 49 (11). P. 601–617. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00065.2017>.

180. How Hypertension Affects Heart Metabolism / A. Polak-Iwaniuk, E. Narasim-Symbol, K. Gołaszewska, A. Chabowski. *Frontiers in physiology*. 2019. 10. P. 435. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00435>.

181. Колесник Ю. М., Колесник М. Ю., Абрамов А. В. Маркери ремоделювання міокарда щурів при артеріальній гіпертензії та експериментальному цукровому діабеті: роль мітохондріальної дисфункції. *Фізіологічний журнал*. 2014. 60 (3). P. 18-26.

182. Пат. 102234 Україна, МПК G09В 23/28. Спосіб моделювання симптоматичної артеріальної гіпертензії у дрібних гризунів / Колесник Ю. М., Ганчева О. В., Абрамов А. В., Іваненко Т. В.; Тіщенко С.В., Кузьо Н. В. заявник та патентовласник ЗДМУ. – № u 2015 03152; заявл. 06.04.15 ; опубл. 26.10.15, Бюл. № 20.

183. Зайцев В. М., Маринкин В. И. (2006). Прикладная медицинская статистика.

184. Абрашова Т.В., Гуцин Я.А., Ковалева М.А., Рыбакова А.В., Селезнева А.И., Соколова А.П., Ходько С.В. СПРАВОЧНИК. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. СПб.: Изд-во «ЛЕМА», 2013. 116с.

185. Comparison of invasive blood pressure measurements from the caudal ventral artery and the femoral artery in male adult SD and Wistar rats / Y. Wang, Y. Cong, J. Li et al. *PloS one*. 2013. 8 (4). P. e60625. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060625>.

186. International Society of Hypertension global hypertension practice guidelines / T. Unger, C. Borghi, F. Charchar et al. *Hypertension*. 2020. 75 (6). P. 1334-1357. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15026>.

187. Глюкокортикоиды и артериальная гипертензия у реципиентов внутренних органов / Е.Д. Космачева, С.М. Мартиросян, Н.А. Зубарева, А.Э. Бабич *Инновационная медицина Кубани*. 2017. 8 (4). С. 60-64.

188. Соколов Е. И., Зыкова А. А., Средняков А. В. Морфологическая характеристика миокарда при метаболическом синдроме. 2006. *Российский Кардиологический журнал*. 2006. 3. Р. 87-89.

189. Characteristics of the nitric oxide system indicators in the left ventricle myocardium in SHR / Yu. M. Kolesnyk, M. I. Isachenko, O. V. Melnikova et al. *Патологія*. 2018. Т. 15, № 3(44). С. 278–283. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2018.3.151670>.

190. Kolesnyk Yu. M., Isachenko M. I., Melnikova O. V. The features of the nitric oxide system in the left ventricle myocardium in the rats with experimental intermittent hypoxia of different duration. *Pathologia*. 2019. Vol. 16, No 3(47). P. 308–314. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2019.3.188783>.

191. Isachenko M. I., Melnikova O. V. Pathogenetic features of the nitric oxide system state in the left ventricular myocardium of the rats with experimental arterial hypertension. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020. Vol. 10, No 8. P. 476–489. eISSN 2391-8306. <https://doi.org/10.12775/JEHS.2020.10.08.058>.

192. Колесник Ю. М., Исаченко М. І. Маркерний профіль ремоделювання міокарда при різних етіопатогенетичних формах артеріальної гіпертензії в експерименті. *Патологія*. 2020. Т. 17, № 2(49). С. 136–141. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2020.2.212721>.

193 Kolesnyk Yu. M., Isachenko M. I. Pathogenetic features of morphodensitometric characteristics of cardiomyocytes and marker profile of the left ventricular remodeling in rats with experimental intermittent hypoxia of different duration. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020. Vol. 10, No 9. P. 752–762. eISSN 2391-8306. <https://doi.org/10.12775/JEHS.2020.10.09.09>.

194. Dr. Ananya Mandal, M. Cardiovascular Disease Diagnosis. 2019. from <https://www.news-medical.net/health/Cardiovascular-Disease-Diagnosis.aspx>.

195. Plasma cardiotrophin-1 levels are associated with hypertensive heart disease: a meta-analysis / K. Song, S.Wang, B. Huang et al. *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn.)*. 2014. 16 (9). P. 686–692. <https://doi.org/10.1111/jch.12376>.

196. Morphological and Functional Characteristics of Animal Models of Myocardial Fibrosis Induced by Pressure Overload / Y. Ding, Y. Wang, Q. Jia et al. *International journal of hypertension*. 2020. P. 3014693. <https://doi.org/10.1155/2020/3014693/>

197. Jougasaki M. Cardiotrophin-1 in cardiovascular regulation. *Advances in clinical chemistry*. 2010. 52. P. 41–76. [https://doi.org/10.1016/s0065-2423\(10\)52002-x](https://doi.org/10.1016/s0065-2423(10)52002-x).

198. Нелинейные вязкоупругие свойства биологических тканей / Кобелев А. В., Смолюк Л. Т., Кобелева Р. М., Проценко Ю. Л. 2012. *Екатеринбург: УрО РАН*. 244с.

199. The ACE2-Ang (1-7)-Mas receptor axis attenuates cardiac remodeling and fibrosis in post-myocardial infarction / Wang J., He W., Guo L. et al. *Molecular medicine reports*. 2017. 16 (2). P. 1973–1981. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6848>.

200. Densification of Type I Collagen Matrices as a Model for Cardiac Fibrosis / L. J. Worke, J. E. Barthold, B. Seelbinder et al. *Advanced healthcare materials*. 2017. 6 (22). P. 10.1002/adhm.201700114. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700114>.

201. Essential role of developmentally activated hypoxia-inducible factor 1alpha for cardiac morphogenesis and function / J. Krishnan, P. Ahuja, S. Bodenmann et al. *Circulation research*. 2008. 103 (10). P. 1139–1146. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000338613.89841.c1>.

202. Anderson B. R., Granzier H. L. Titin-based tension in the cardiac sarcomere: molecular origin and physiological adaptations. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2012. 110 (2-3). P. 204–217. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2012.08.003>.

203. Yuyun M. F., Ng L. L., Ng G. A. Endothelial dysfunction, endothelial nitric oxide bioavailability, tetrahydrobiopterin, and 5-methyltetrahydrofolate in cardiovascular disease. Where are we with therapy?. *Microvascular research*. 2018. 119. P. 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2018.03.012>.

204. Molecular mechanisms of neuronal nitric oxide synthase in cardiac function and pathophysiology / Y. Zhang, C. Jin, J. Jang, Y. Wang. *The Journal Of Physiology*. 2014. 592 (15). P. 3189–3200. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.270306>.

205. Puzserova A., Bernatova I. Blood pressure regulation in stress: focus on nitric oxide-dependent mechanisms. *Physiological research*. 2016. 65 (3). P. S309–S342. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933442>.

206. iNOS in cardiac myocytes plays a critical role in death in a murine model of hypertrophy induced by calcineurin / J. R. Somers, P. L. Beck, J. P. Lees-Miller et al. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2008. 295 (3). P. H1122–H1131. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00386.2008>.

207. Minocycline reverses IL-17A/TRAF3IP2-mediated p38 MAPK/NF- κ B/iNOS/NO-dependent cardiomyocyte contractile depression and death / T. Yoshida, N. A. Das, A. J. Carpenter et al. *Cellular signalling*. 2020. 73. P. 109690. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109690>.

208. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase / S. Kanno, P. C. Lee, Y. Zhang et al. *Circulation*. 2000. 101 (23). P. 2742–2748. <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.23.2742>.

209. Sustained hypertension despite endothelial-specific eNOS rescue in eNOS-deficient mice / T. Suvorava, J. Stegbauer, M. Thieme et al. *Biochemical and biophysical research communications*. 458 (3). P. 576–583. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.152>.

210. Effect of eNOS on Ischemic Postconditioning-Induced Autophagy against Ischemia/Reperfusion Injury in Mice / J. Shao, C. Miao, Z. Geng et al. *BioMed research international*. 2019. P. 5201014. <https://doi.org/10.1155/2019/5201014>.

211. New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Function/Dysfunction in Cardiovascular Disease / A. Daiber, N. Xia, S. Steven et al. *International journal of molecular sciences*. 2019. 20 (1). P. 187. <https://doi.org/10.3390/ijms20010187>.

212. Protective effects of quercetin from oxidative / nitrosative stress under intermittent hypobaric hypoxia exposure in the rat's heart / I.C. Chiş D. Baltaru, A. Dumitrovici et al. *Physiology International*. 2018. 105 (3). P. 233-246. <https://doi.org/10.1556/2060.105.2018.3.23>.

213. Detection and Measurement for the Modification and Inactivation of Caspase by Nitrosative Stress In Vitro and In Vivo / H. Na, H. Chung, K. Ha et al. *Methods In Enzymology*. 2008. P. 317-327. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(08\)01217-2](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(08)01217-2).

214. Особливості експресії ізоформ синтази оксиду азоту у міокарді лівого шлуночка щурів при артеріальній гіпертензії різного генезу / М. І. Федотова, М. М. Ковальов, В. О. Жулінський та ін. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*. 2017. Т. 17, № 4 (60), ч. 2. С. 91–95.

215. Колесник Ю. М., Федотова М. І. Баланс ізоформ синтази оксиду азоту у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією. *Актуальні питання сучасної медицини і фармації* : тези всеукр. наук.-практ. конф. до 50-річчя заснування ЗДМУ (м. Запоріжжя, 30 трав. 2018 р.). м. Запоріжжя, 2018. С. 15.

216. Fedotova M., Kolesnyk Y. P89Comparative analysis of the status of the nitric oxide system in the left ventricle of heart in rats with experimental hypertension of different origin. *Frontiers in CardioVascular Biology* 2018. (Vienna, 20-22 Apr. 2018). *Cardiovascular Research*. 2018. 114 (suppl_1). S23–S24.

217. Дорохов О. М., Ісаченко М. І. Роль синтази оксиду азоту у фізіологічному ремоделюванні міокарда. *Студенти-науковці ЗДМУ в сучасній медицині і фармації – 2019* : тези доповідей наук.-практ. конф. студентів в

рамках I туру «Всеукраїнського конкурсу студентських наукових робіт з галузей звань і спеціальностей у 2018 – 2019 н.р.». (м. Запоріжжя, 6 – 7 лют. 2019). м. Запоріжжя, 2019. С. 3–4.

218. Ісаченко М. І., Дорохов О. М. Роль синтази оксиду азоту у фізіологічному ремоделюванні міокарда. *Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації* : матеріали I наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених з міжнарод. участю. (м. Харків 15 трав. 2019 р.). м. Харків, 2019. С. 88–89.

219. Колесник Ю. М., Ісаченко М. І., Мельнікова О. В. Переривчаста гіпоксія – як фактор змін ізoформного профілю NOS в міокарді щурів. XX з'їзд Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г.Костюка. (м. Київ, 27-30 трав. 2019 р.). *Фізіологічний журнал*. 2019. Т. 65, № 3 (Додаток). С. 80–81.

220. Колесник Ю. М., Данукало М. В., Ісаченко М. І. Системні зміни ізoформного профілю синтази оксиду азоту при артеріальній гіпертензії в експерименті. *Проблеми ендокринної патології*. Щоквартальний науково-практичний журнал спеціальний випуск : тези доповідей IX з'їзду ендокринологів України, що присвячений 100-річному ювілею ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України» (м. Харків, 19-22 лист. 2019 р.). м. Харків, 2019. С. 40.

221. Rossier B., Bochud M., Devuyst O. The Hypertension Pandemic: An Evolutionary Perspective. *Physiology*. 2017. 32 (2). P. 112-125. <https://doi.org/10.1152/physiol.00026.2016>.

222. Zhonghua er bi yan hou tou jing wai ke za zhi / X. J. Tang, B. Wang, P. Y. Huang et al. *Chinese journal of otorhinolaryngology head and neck surgery*. 2019. 54. 8. P. 601–605. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1673-0860.2019.08.008>.

223. Hypoxia: Unique myocardial morphology? / A. F. Corno, G. Milano, S. Morel et al. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2004. 127 (5). P. 1301-8.

224. Anti-apoptotic effects of myocardin-related transcription factor-A on rat cardiomyocytes following hypoxia-induced injury / Z. Zhong, J. Hu, X. Wu et al. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2016. 94 (4). 379–387. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2014-0461>.

225. Mirtschink P., Krek W. Hypoxia-driven glycolytic and fructolytic metabolic programs: Pivotal to hypertrophic heart disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2016. 1863 (7PB). P. 1822–1828. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.02.011>.

226. Sataeva T. P., Zadnipyany I. V. Issledovanie markerov remodelirovaniia miokarda pri éksperimental'noï gipobaricheskoi gipoksii na fone korrektsii preparatom tsitoflavin [Investigation of markers for myocardial remodeling during experimental hypobaric hypoxia in the correction with cytoflavin]. *Arkhiv patologii*. 2018. 80 (6). P. 35–42. <https://doi.org/10.17116/patol20188006135>.

227. Annexin A5 reduces infarct size and improves cardiac function after myocardial ischemia-reperfusion injury by suppression of the cardiac inflammatory response / R. de Jong, N. J. Pluijmert, M. R. de Vries et al. *Scientific reports*. 2018. 8 (1). P. 6753. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25143-y>.

228. Lefer D. Induction of HIF-1 α and iNOS with siRNA. *Circulation Research*. 2006. 98 (1). P. 10-11. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000200398.52220.cc>.

229. Inducible nitric oxide synthase contributes to intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury / H. L. Ding, H. F. Zhu, J. W. Dong et al. *Acta pharmacologica Sinica*. 2005. 26 (3). P. 315–322. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00046.x>.

230. Cardioprotection after acute exposure to simulated high altitude in rats. Role of nitric oxide / P. La Padula, M. Etchegoyen, A. Czerniczyniec et al. *Nitric Oxide*. 2018. 73. P 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.12.007>.

231. Capettini L., Cortes S., Lemos V. Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. *European Journal*

of *Pharmacology*. 2010. 643 (2-3). P. 260-266.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.06.066>.

232. Förstermann U. Münzel T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease. *Circulation*. 2006. 113 (13). P. 1708-1714.
<https://doi.org/10.1161/circulationaha.105.602532>.

233. Macdonald W. A., Hool L. C. The effect of acute hypoxia on excitability in the heart and the L-type calcium channel as a therapeutic target. *Current drug discovery technologies*. 2008. 5 (4). P. 302–311.
<https://doi.org/10.2174/157016308786733546>.

234. Does inducible NOS have a protective role against hypoxia / reoxygenation injury in rat heart? / A. Rus, M. del Moral, F. Molina, M. Peinado. *Cardiovascular Pathology*. 2011. 20 (1). P. e17-e25.
<https://doi.org/10.1016/j.carpath.2010.01.002>.

235. Ushakov A. V., Ivanchenko V. S., Gagarina A. A. Psychological Stress in Pathogenesis of Essential Hypertension. *Current hypertension reviews*. 2016. 12 (3). P. 203–214. <https://doi.org/10.2174/1573402112666161230121622>.

236. Titin isoform expression in normal and hypertensive myocardium / C. M. Warren, M. C. Jordan, K. P. Roos et al. *Cardiovascular research*. 2003. 59 (1). P. 86–94. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(03\)00328-6](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(03)00328-6).

237. Myocardial Remodeling in Hypertension / A. González, S. Ravassa, B. López et al. *Hypertension*. 2018. 72 (3). P. 549–558.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11125>.

238. High salt intake damages the heart through activation of cardiac (pro) renin receptors even at an early stage of hypertension / Y. Hayakawa, T. Aoyama, C. Yokoyama et al. *PloS one*. 2015. 10 (3). P. e0120453.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120453>.

239. Viaro F., Nobre F., Evora P. R. Expression of nitric oxide synthases in the pathophysiology of cardiovascular diseases. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2000. 74 (4). P. 380–393. <https://doi.org/10.1590/s0066-782x2000000400009>.

240. Кравченко Н.А., Ярмыш Н.В. Регуляция экспрессии эндотелиальной NO-синтазы и дисфункция сосудистого эндотелия при сердечно-сосудистой патологии. *Цитология и генетика*. 2008. №4. С. 69–79.

241. Shenfu Injection Promotes Vasodilation by Enhancing eNOS Activity Through the PI3K / Akt Signaling Pathway In Vitro / J. Zhu, W. Song, S. Xu et al. *Frontiers in pharmacology*. 2020. 11. P. 121. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00121>.

242. Paton J. F., Kasparov S., Paterson D. J. Nitric oxide and autonomic control of heart rate: a question of specificity. *Trends in neurosciences*. 2002. 25 (12). P. 626–631. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(02\)02261-0](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(02)02261-0).

243. The regulatory mechanisms of Yulangsan MHBFC reversing cardiac remodeling in rats based on eNOS-NO signaling pathway / F. Ye, J. He, X. Wu et al. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2019. 117. P. 109141. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109141>.

244. Modulation of in vivo cardiac function by myocyte-specific nitric oxide synthase-3 / H. C. Champion, D. Georgakopoulos, E. Takimoto et al. *Circulation research*. 2004. 94 (5). P. 657–663. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000119323.79644.20>.

245. Inducible nitric oxide synthase in the myocardium / I. B. Buchwalow, W. Schulze, P. Karczewski et al. *Molecular and cellular biochemistry*. 2001. 217 (1-2). P. 73–82. <https://doi.org/10.1023/a:1007286602865>.

246. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide / G. R. Drummond, H. Cai, M. E. Davis et al. *Circulation research*. 2000. 86 (3). P. 347–354. <https://doi.org/10.1161/01.res.86.3.347>.

247. Role of glucocorticoid-induced TNF receptor family gene (GITR) in collagen-induced arthritis / S. Cuzzocrea, E. Ayroldi, R. Di Paola et al. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005. 19 (10). P. 1253–1265. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3556com>.

248. Is cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats the cause or the consequence of oxidative stress? / M. C. Alvarez, C. Caldiz, J. C. Fantinelli et al. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2008. 31 (7). P. 1465–1476. <https://doi.org/10.1291/hypres.31.1465>.

249. Tejero J., Shiva S., Gladwin M. T. Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation. *Physiological reviews*. 2019. 99 (1). P. 311–379. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2017>.

ДОДАТОК А1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Проректор з науково-педагогічної роботи
ДЗ «ДМА»
доцент Захаров С.В.
« 02 » 10 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції:** патогенетичні особливості системи оксиду азоту у ремоделюванні міокарда лівого шлуночку серця у щурів при артеріальній гіпертензії.
2. **Установа-розробник, автор:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної фізіології (69074, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26), проф. Колесник Ю.М., аспірант Ісаченко М.І., доц. Мельнікова О.В., доц. Грекова Т.А.
3. **Джерела інформації:** Kolesnyk Yu.M., Isachenko M.I., Melnikova O.V., Hrekova T.A. Characteristics of the nitric oxide system indicators in the left ventricle myocardium in SHR. *Патологія*. 2018. Т. 15, № 3(44). С. 278–283.
4. **Де і коли впроваджено:** кафедра патологічної фізіології Дніпропетровської медичної академії МОЗ України, січень-вересень 2020 року.
5. **Результати застосування методу:** матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри патологічної фізіології на практичних заняттях та лекціях з тем: «Патофізіологія серцево-судинної системи», «Патофізіологія судин» (обговорено на засіданні кафедри 30.09.2020 р., протокол № 3).
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3):** використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо патогенетичної ролі системи оксиду азоту у ремоделюванні міокарда лівого шлуночку серця при артеріальній гіпертензії.
7. **Зауваження та пропозиції:** Не вносилися.

Відповідальний за впровадження:
Завідуючий кафедрою патологічної фізіології
Дніпропетровської медичної академії
МОЗ України,
доцент, к. мед. н.

Худяков О.С.

ДОДАТОК А2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Харківського національного
медичного університету МОЗ України
д. мед. н., професор В. К. Марковський

« 29 » _____ 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Найменування пропозиції:** патогенетичні особливості системи оксиду азоту у ремоделюванні міокарда лівого шлуночка серця у щурів при артеріальній гіпертензії.
- 2. Установа-розробник, автор:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної фізіології (69074, м. Запоріжжя, пр.. Маяковського, 26), проф. Колесник Ю.М., аспірант Ісаченко М.І., доц. Мельнікова О.В., доц. Грекова Т.А.
- 3. Джерела інформації:**
Kolesnyk Yu.M., Isachenko M.I., Melnikova O.V., Hrekova T.A. Characteristics of the nitric oxide system indicators in the left ventricle myocardium in SHR. *Патологія*. 2018. Т. 15, № 3(44). С. 278–283.
- 4. Де і коли введено:** кафедра патологічної фізіології ім. Д.О. Альперна Харківського національного медичного університету МОЗ України, січень-червень 2020 року.
- 5. Результати застосування методу:** матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри патологічної фізіології на практичних заняттях та лекціях з тем: «Патофізіологія серцево-судинної системи», «Патофізіологія судин» (обговорено на засіданні кафедри 26.05.2020 р., протокол № 15).
- 6. Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3):** використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо патогенетичної ролі системи оксиду азоту у ремоделюванні міокарда лівого шлуночка серця при артеріальній гіпертензії.
- 7. Зауваження та пропозиції:** Не вносилися.

Завідувачка кафедри патологічної фізіології
ім. Д.О. Альперна
Харківського національного медичного
університету МОЗ України,
професорка



Ніколаєва О.В.

ДОДАТОК АЗ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Запорізького державного медичного
університету МОЗ України
професор Візір В. А.



2020 р.

Візір
08 доц. проф.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції:** патогенетичні особливості системи оксиду азоту у ремоделюванні міокарда лівого шлуночку серця при експериментальній переривчастій гіпоксії різної тривалості.
2. **Установа-розробник, автор:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної фізіології (69074, м. Запоріжжя, пр.. Маяковського, 26), проф. Колесник Ю.М., аспірант Ісаченко М.І., доц. Мельнікова О.В.
3. **Джерела інформації:**
Kolesnyk Yu. M., Isachenko M. I., Melnikova O. V. The features of the nitric oxide system in the left ventricle myocardium in the rats with experimental intermittent hypoxia of different duration. *Pathologia* 2019. 16 (3). P. 308–314.
4. **Де і коли введено:** кафедра патологічної фізіології Запорізького державного медичного університету МОЗ України, січень-червень 2020 року.
5. **Результати застосування методу:** матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри патологічної фізіології на практичних заняттях та лекціях з тем: «Патофізіологія серцево-судинної системи», «Гіпоксії: визначення поняття, етіологія, патогенез, класифікація. Захисно-приспосувальні і компенсаторні реакції при гіпоксії. Адаптація до гіпоксії» (обговорено на засіданні кафедри 26.08.2020 р., протокол № 1).
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3):** використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо патогенетичної ролі системи оксиду азоту у ремоделюванні міокарда лівого шлуночку серця при експериментальній переривчастій гіпоксії різної тривалості.
7. **Зауваження та пропозиції:** Не вносилися.

Завідуюча кафедрою патологічної фізіології
Запорізького державного медичного
університету МОЗ України,
професор

О.В. Ганчева

ДОДАТОК А4

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Проректор з науково-педагогічної роботи
Тернопільського державного медичного
університету МОЗ України
професор Шульгай А. Г.

«21» Ос 2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції:** Особливості експресії ізоформ синтази оксиду азоту у міокарді лівого шлуночка щурів при артеріальній гіпертензії різного генезу.
2. **Установа-розробник, автор:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної фізіології (69074, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26), доц. Ковальов М.М., доц. Жулінський В.О., ст.викл. Каджарян Є.В., аспірант Федотова М.І.
3. **Джерела інформації:**
Федотова М.І., Ковальов М.М., Жулінський В.О., Каджарян Є.В. Особливості експресії ізоформ синтази оксиду азоту у міокарді лівого шлуночка щурів при артеріальній гіпертензії різного генезу. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*. 2017. Т. 17, № 4 (60), ч. 2. С. 91–95.
4. **Де і коли введено:** кафедра патологічної фізіології Тернопільського державного медичного університету МОЗ України, вересень-грудень 2018 року.
5. **Результати застосування методу:** матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри патологічної фізіології на практичних заняттях та лекціях з тем: «Атеросклероз, артеріальні гіпер- та гіпотензії», «Патологія серцево-судинної системи» (обговорено на засіданні кафедри 18.02.2019 р., протокл № 2).
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3):** використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо патогенетичної особливості експресії синтази оксиду азоту у міокарді при артеріальній гіпертензії різного генезу.
7. **Зауваження та пропозиції:** Не вносилися.

Відповідальний за впровадження: професор кафедри патофізіології, д.мед.н.
Хара Марія Романівна.

Завідувач кафедри патологічної фізіології
Тернопільського державного медичного
університету МОЗ України, д.мед.наук,
професор

О.В. Денефіль

ДОДАТОК А5

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 В.о. ректора Одеського
 національного медичного
 університету, д.мед.н., професор
 Васьнянов Р.С.
 09 _____ 2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції:** патогенетичні особливості системи оксиду азоту у ремоделюванні міокарда лівого шлуночку серця при експериментальній переривчастій гіпоксії різної тривалості.
2. **Установа-розробник, автор:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної фізіології (69074, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26), проф. Колесник Ю.М., аспірант Ісаченко М.І., доц. Мельнікова О.В.
3. **Джерела інформації:**
 Kolesnyk Yu. M., Isachenko M. I., Melnikova O. V. The features of the nitric oxide system in the left ventricle myocardium in the rats with experimental intermittent hypoxia of different duration. *Pathologia* 2019. 16 (3). P. 308–314.
4. **Де і коли введено:** кафедра загальної та клінічної патологічної фізіології Одеського національного медичного університету МОЗ України, січень-червень 2020 року.
5. **Результати застосування методу:** матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри патологічної фізіології на практичних заняттях та лекціях з тем: «Патофізіологія серцево-судинної системи», «Гіпоксії: визначення поняття, етіологія, патогенез, класифікація. Захисно-приспосувальні і компенсаторні реакції при гіпоксії. Адаптація до гіпоксії» (обговорено на засіданні кафедри 28 серпня 2020 р., протокол № 1).
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3):** використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо патогенетичної ролі системи оксиду азоту у ремоделюванні міокарда лівого шлуночку серця при експериментальній переривчастій гіпоксії різної тривалості.
7. **Зауваження та пропозиції:** Не вносилися.

Відповідальний за впровадження:

Доцент кафедри загальної та клінічної
 патологічної фізіології ім. В.В. Підвисоцького
 Одеського національного медичного університету,
 доцент



Поспелов О.М.

ДОДАТОК А6



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи Запорізького
державного медичного університету
МОЗ України
професор Туманський В.О.

« 28 » 09 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції:** патогенетичні особливості системи оксиду азоту у ремоделюванні міокарда лівого шлуночку серця при експериментальній переривчастій гіпоксії різної тривалості.
2. **Установа-розробник, автор:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної фізіології (69074, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26), проф. Колесник Ю.М., аспірант Ісаченко М.І., доц. Мельнікова О.В.
3. **Джерела інформації:** Kolesnyk Yu. M., Isachenko M. I., Melnikova O. V. The features of the nitric oxide system in the left ventricle myocardium in the rats with experimental intermittent hypoxia of different duration. *Pathologia* 2019. 16 (3). P. 308–314.
4. **Де і коли введено:** навчальний медико-лабораторний центр Запорізького державного медичного університету МОЗ України, січень-червень 2020 року.
5. **Результати застосування методу:** матеріали дослідження введено у роботу навчального медико-лабораторного центру Запорізького державного медичного університету.
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3):** використання результатів досліджень у науковому процесі дозволяє розширити імуногістохімічну діагностичну панель методів для оцінки стану системи оксиду азоту у міокарді лівого шлуночка серця щурів при експериментальній патології.
7. **Зауваження та пропозиції:** Не вносилися.

Керівник навчального
медико-лабораторного центру
Запорізького державного медичного
університету МОЗ України,
професор

А.В. Абрамов

ДОДАТОК А7

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор з науково-педагогічної
роботи Української медичної
стоматологічної академії
професор Дворник В.М.

« 22 » _____ 2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції:** Особливості експресії ізоформ синтази оксиду азоту у міокарді лівого шлуночка щурів при артеріальній гіпертензії різного генезу.
2. **Установа-розробник, автор:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної фізіології (69074, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26), доц. Ковальов М.М., доц. Жулінський В.О., ст.викл. Каджарян Є.В., аспірант Федотова М.І.
3. **Джерела інформації:**
Федотова М.І., Ковальов М.М., Жулінський В.О., Каджарян Є.В. Особливості експресії ізоформ синтази оксиду азоту у міокарді лівого шлуночка щурів при артеріальній гіпертензії різного генезу. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*. 2017. Т. 17, № 4 (60), ч. 2. С. 91–95.
4. **Де і коли введено:** кафедра патофізіології Української медичної стоматологічної академії МОЗ України, квітень-жовтень 2018 року.
5. **Результати застосування методу:** матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри патофізіології на практичних заняттях та лекціях з тем: «Атеросклероз, артеріальні гіпер- та гіпотензії», «Патологія серцево-судинної системи» (обговорено на засіданні кафедри 21.03.2019 р., протокол №8).
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3):** використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо патогенетичної особливості експресії синтази оксиду азоту у міокарді при артеріальній гіпертензії різного генезу.
7. **Зауваження та пропозиції:** Не вносилися.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри патофізіології
Української медичної стоматологічної академії
МОЗ України, професор



В. О. Костенко

ДОДАТОК Б
СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ НА ТЕМУ
ДИСЕРТАЦІЇ

1. Особливості експресії ізоформ синтази оксиду азоту у міокарді лівого шлуночка щурів при артеріальній гіпертензії різного генезу. Федотова М. І., Ковальов М. М., Жулінський В. О. та ін. / *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*. 2017. Т. 17, № 4 (60), ч. 2. С. 91–95. (Дисертант виконала набір матеріалу, імуногістохімічне дослідження та статистичну обробку результатів).

2. Characteristics of the nitric oxide system indicators in the left ventricle myocardium in SHR. Kolesnyk Yu. M., Isachenko M. I., Melnikova O. V. et al. / *Патологія*. 2018. Т. 15, № 3(44). С. 278–283. DOI: 10.14739/2310-1237.2018.3.151670 (Дисертант виконала набір матеріалу, імуногістохімічне дослідження та статистичну обробку результатів).

3. Kolesnyk Yu. M., Isachenko M. I., Melnikova O. V. The features of the nitric oxide system in the left ventricle myocardium in the rats with experimental intermittent hypoxia of different duration. *Pathologia*. 2019. Vol. 16, No 3(47). P. 308–314. DOI:10.14739/2310-1237.2019.3.188783 (Дисертант виконала набір матеріалу, імуногістохімічне дослідження та статистичну обробку результатів).

4. Isachenko M. I., Melnikova O. V. Pathogenetic features of the nitric oxide system state in the left ventricular myocardium of the rats with experimental arterial hypertension. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020. Vol. 10, No 8. P. 476–489. eISSN 2391-8306. DOI: 10.12775/JEHS.2020.10.08.058 (Дисертант виконала набір матеріалу, імуногістохімічне дослідження та статистичну обробку результатів).

5. Колесник Ю. М., Ісаченко М. І. Маркерний профіль ремоделювання міокарда при різних етіопатогенетичних формах артеріальної гіпертензії в експерименті. *Патологія*. 2020. Т. 17, № 2(49). С. 136–141. DOI:

10.14739/2310-1237.2020.2.212721 (*Дисертант виконала набір матеріалу, імуногістохімічне та морфоденситометричне дослідження та статистичну обробку результатів*).

6. Kolesnyk Yu. M., Isachenko M. I. Pathogenetic features of morphodensitometric characteristics of cardiomyocytes and marker profile of the left ventricular remodeling in rats with experimental intermittent hypoxia of different duration. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020. Vol. 10, No 9. P. 752–762. eISSN 2391-8306. DOI: 10.12775/JEHS.2020.10.09.091 (*Дисертант виконала набір матеріалу, імуногістохімічне та морфоденситометричне дослідження та статистичну обробку результатів*).

7. Fedotova M. I., Melnikova O. V., Ganchev C. S. Independent predictors of the blood pressure elevation among indexes of heart rate variability in rats with hypertension and disturbance of carbohydrate metabolism. *Integrative Biology & Medicine*. 2017. P. 25. (*Дисертант виконала набір матеріалу та статистичну обробку результатів*).

8. Колесник Ю. М., Федотова М. І. Баланс ізоформ синтази оксиду азоту у міокарді лівого шлуночка щурів з експериментальною гіпоксією. *Актуальні питання сучасної медицини і фармації* : тези всеукр. наук.-практ. конф. до 50-річчя заснування ЗДМУ (м. Запоріжжя, 30 трав. 2018 р.). м. Запоріжжя, 2018. С. 15. (*Дисертант виконала набір матеріалу, імуногістохімічне дослідження та статистичну обробку результатів*).

9. Fedotova M., Kolesnyk Y. P89Comparative analysis of the status of the nitric oxide system in the left ventricle of heart in rats with experimental hypertension of different origin. *Frontiers in CardioVascular Biology 2018*. (Vienna, 20-22 Apr. 2018). *Cardiovascular Research*. 2018. 114 (suppl_1). S23–S24. (*Дисертант виконала набір матеріалу, імуногістохімічне дослідження та статистичну обробку результатів*).

10. Дорохов О. М., Ісаченко М. І. Роль синтази оксиду азоту у фізіологічному ремоделюванні міокарда. *Студенти-науковці ЗДМУ в сучасній медицині і фармації – 2019* : тези доповідей наук.-практ. конф. студентів в

рамках I туру «Всеукраїнського конкурсу студентських наукових робіт з галузей звань і спеціальностей у 2018 – 2019 н.р.». (м. Запоріжжя, 6 – 7 лют. 2019). м. Запоріжжя, 2019. С. 3–4. *(Дисертант виконала набір матеріалу, імуногістохімічне дослідження та статистичну обробку результатів)*.

11. Ісаченко М. І., Дорохов О. М. Роль синтази оксиду азоту у фізіологічному ремоделюванні міокарда. *Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації* : матеріали I наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених з міжнарод. участю. (м. Харків 15 трав. 2019 р.). м. Харків, 2019. С. 88–89. *(Дисертант виконала набір матеріалу, імуногістохімічне дослідження та статистичну обробку результатів)*.

12. Колесник Ю. М., Ісаченко М. І., Мельнікова О. В. Переривчаста гіпоксія – як фактор змін ізоформного профілю NOS в міокарді щурів. XX з'їзд Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г.Костюка. (м. Київ, 27-30 трав. 2019 р.). *Фізіологічний журнал*. 2019. Т. 65, № 3 (Додаток). С. 80–81. *(Дисертант виконала набір матеріалу, імуногістохімічне дослідження та статистичну обробку результатів)*.

13. Колесник Ю. М., Данукало М. В., Ісаченко М. І. Системні зміни ізоформного профілю синтази оксиду азоту при артеріальній гіпертензії в експерименті. *Проблеми ендокринної патології*. Щоквартальний науково-практичний журнал спеціальний випуск : тези доповідей IX з'їзду ендокринологів України, що присвячений 100-річному ювілею ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України» (м. Харків, 19-22 лист. 2019 р.). м. Харків, 2019. С. 40. *(Дисертант виконала набір матеріалу, імуногістохімічне дослідження та статистичну обробку результатів)*.

ДОДАТОК В

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Integrative Biology & Medicine» (м.Київ, 2017 р.) – постерна доповідь з публікацією тез.
2. Всеукраїнській науково-практичній конференції до 50-річчя заснування ЗДМУ «Актуальні питання сучасної медицини і фармації» (м.Запоріжжя, 2018р.) – пленарна доповідь з публікацією тез.
3. Конгрес Європейського Товариства Кардіології «Frontiers in CardioVascular Biology» (м. Відень, 2018) – постерна доповідь з публікацією тез.
4. Науково-практична конференція студентів в рамках I туру Всеукраїнського конкурсу студентських наукових робіт з галузей знань і спеціальностей, 2018 – 2019 н. р. «Студенти-науковці ЗДМУ в сучасній медицині і фармації – 2019» (м.Запоріжжя, 2019 р.) – усна доповідь з публікацією тез.
5. I Науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» (м.Харків, 2019 р.) – усна доповідь з публікацією тез.
6. «XX з'їзд Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г.Костюка» (м. Київ, 27-30 трав. 2019 р.) – постерна доповідь з публікацією тез.
7. Конгрес Європейського Товариства Кардіології «Frontiers in CardioVascular Biomedicine» (м. Будапешт, 2020-2021 рр.) постерна доповідь.