

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

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ТІЩЕНКО СЕРГІЙ ВІКТОРОВИЧ

УДК : 616.831.4 – 018.3 -092.18. – 06:616.12 – 008.331.1

ДИСЕРТАЦІЯ

**ПАТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНОГО
СТАНУ НЕЙРОНІВ АРКУАТНОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСУ ПРИ
АРТЕРІАЛЬНІЙ ГІПЕРТЕНЗІЇ РІЗНОГО ГЕНЕЗУ**

222 Медицина
(14.03.04 – патологічна фізіологія)

Подається на здобуття ступеня доктора філософії.
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ С.В. Тіщенко

Науковий керівник – **Ганчева Ольга Вікторівна**, доктор медичних наук,
професор

Запоріжжя – 2019

АНОТАЦІЯ

Тищенко С.В. Патогенетичні особливості морфо-функціонального стану нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу при артеріальній гіпертензії різного генезу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина» (14.03.04 – патологічна фізіологія). – Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2019.

Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2019.

Загальний результат проведеного комплексного дослідження патогенетичних особливостей морфо-функціонального стану нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу при артеріальній гіпертензії в залежності від етіології та патогенезу її розвитку показав, що формування стійкого підвищення артеріального тиску, незалежно від етіологічного чиннику та механізмів розвитку, призводить до однотипних змін вмісту нейропептидів, експресії мРНК ізоформ NOS, її ізоформного профілю та концентрації кінцевих метаболітів NO, але показує етіозалежні особливості морфо-денситометричних параметрів ядер нейронів та їх структурно-популяційних взаємин у вентромедіальному, вентролатеральному та дорсомедіальному суб'ядрах аркуатного ядра гіпоталамуса.

В роботі були використані сучасні патофізіологічні, інструментальні, молекулярно-генетичні, імуногістохімічні, біохімічні, морфо-денситометричні дослідження нейронів гіпоталамусу за умов експериментальної артеріальної гіпертензії; результати дослідження статистично проаналізовано.

Проведене дослідження стану локальної системи монооксиду азоту дозволило встановити, що у медіобазальному гіпоталамусі відбувається стимуляція відповідних генів конститутивних ізоформ NOS. При цьому

трансляція їхніх білків-ферментів у структурі аркуатного ядра при змодельованих ендокринно-сольовій та есенціальній артеріальних гіпертензіях знижується, незважаючи на підвищений рівень експресії мРНК nNOS, але знижений eNOS. Підвищений вміст імунореактивного матеріалу до nNOS в обох групах більш ніж на третину значень контролю може бути обумовлено підвищеною експресією мРНК даної ізоформи у інших структурах медіобазального гіпоталамусу. Експресія iNOS у структурі аркуатного ядра гіпоталамусу при артеріальній гіпертензії характеризується суттєвим підвищенням як концентрації імунореактивного матеріалу, так і його вмісту в обох моделях. При цьому, якщо у щурів із есенціальною артеріальною гіпертензією встановлене підвищення пояснюється збільшеним синтезом через підвищену нормовану кількість мРНК ферменту на 50 %, то при ендокринно-сольовій артеріальній гіпертензії вона була нижчою на 30 %. Встановлене в групах щурів із артеріальною гіпертензією зниження вмісту нітритів як у гомогенатах медіобазального гіпоталамусу, так і у плазмі крові, на тлі підвищення концентрації нітротирозину характеризує зсув вектору метаболізму системи монооксиду азоту з фізіологічного у бік формування активних форм кисню – пероксинітриту із прогресуванням оксидативного стресу.

За результатами паралельних імуногістохімічних досліджень експресії пресорних та депресорних нейропептидів у структурі аркуатного ядра гіпоталамусу при різних за етіологією артеріальних гіпертензіях встановлені суттєві відмінності від показників щурів із нормальним артеріальним тиском. Виявлено підвищення вмісту та концентрації пресорного гормону нейротензину; при цьому ступінь виразності змін мала залежність (залежала) від типу моделі артеріальної гіпертензії. Так, в моделі есенціальної первинної артеріальної гіпертензії, яка розвивалась у щурів лінії SHR (модель есенціальної артеріальної гіпертензії) зазначені показники виявлялися найвищими та перевищували показники контролю більш ніж на 50 %, а в групі тварин з артеріальною гіпертензією, вторинно асоційованою з

ендокринною патологією (модель ендокринно-сольової артеріальної гіпертензії), перевищення контрольних значень вмісту та концентрації імунореактивного матеріалу до нейротензину становило не більше 11 %.

Визначено, що експресія другого досліджуваного пресорного нейрогормону ангіотензину II в аркуатному ядрі гіпоталамусу у щурів із експериментальними артеріальними гіпертензіями, навпаки, знижується; при цьому його вміст і концентрація у тварин із моделлю есенціальної артеріальної гіпертензії (щери лінії SHR) нижче контролю на 72 % та 70 %, у тварин з ендокринно-сольовою моделлю артеріальної гіпертензії – на 53 % та 59 %, відповідно.

Вперше встановлено, що артеріальна гіпертензія призводить до зниження експресії обох досліджуваних депресорних нейропептидів в аркуатному ядрі гіпоталамусу. При цьому у щурів із моделлю есенціальної артеріальної гіпертензії вміст, концентрація та питома площа імунореактивного матеріалу до мозкового натрійуретичного пептиду стають вірогідно менше показників контролю на 19 %, 16 % та 11 %, відповідно; тимчасом як імунореактивний матеріал до β -ендорфіну показує зниження вмісту на 39 %, концентрації на 17 %, питомої площі на 22 %. Окремо необхідно зазначити, що більш суттєві відмінності як підвищення рівня нейротензину, так і зниження ангіотензину II, мозкового натрійуретичного пептиду та β -ендорфіну відмічаються у щурів із моделлю есенціальної артеріальної гіпертензії.

Важливою особливістю було визначення відмінностей морфоденситометричних характеристик ядер нейронів в окремих суб'ядрах аркуатного ядра гіпоталамусу у щурів експериментальних груп з артеріальною гіпертензією. При цьому морфометричні та денситометричні характеристики ядер нейронів окремих суб'ядер аркуатного ядра гіпоталамусу при артеріальній гіпертензії характеризувалися протилежними показниками при різних моделях. У щурів із моделлю ендокринно-сольової артеріальної гіпертензії відмічено менші значення площі ядер та вмісту

гетерогенної РНК на 8 % та 24 %, відповідно, при моделі есенціальної артеріальної гіпертензії – обидва показника перевищують значення контролю на 5 %. У вентромедіальному суб'ядрі аркуатного ядра гіпоталамуса в групі щурів із моделлю есенціальної артеріальної гіпертензії всі досліджувані показники нижче значень контролю, тимчасом як при моделі ендокринно-сольової артеріальної гіпертензії тільки вміст гетерогенної РНК переважає значення контролю на 5 %. Морфо-денситометричні характеристики ядер нейронів вентролатерального суб'ядра аркуатного ядра гіпоталамусу у щурів із ендокринно-сольовою артеріальною гіпертензією перевищують значення контролю: площу ядер нейронів на 19 % та на 10 % вміст у них гетерогенної РНК, тимчасом як у щурів із есенціальною артеріальною гіпертензією встановлена зворотна картина – площа ядер нейронів менше показника контролю на 15 %, вміст у них гетерогенної РНК – на 27 %. У дорсомедіальному суб'ядрі аркуатного ядра гіпоталамуса при есенціальній артеріальній гіпертензії площа ядер нейронів та вміст у них гетерогенної РНК перевищували значення групи контролю в середньому на 5 %, тимчасом як при ендокринно-сольовій моделі спостерігалася зворотна динаміка – площа ядер нейронів зменшилась на 8 %, а вміст у них гетерогенної РНК на 24 %.

Міжмодельний порівняльний аналіз морфо-денситометричних характеристик нейронів суб'ядер аркуатного ядра гіпоталамуса показав, що у дорсомедіальному суб'ядрі аркуатного ядра гіпоталамуса при есенціальній артеріальній гіпертензії площа ядер нейронів та вміст у них гетерогенної РНК перевищують значення групи з ендокринно-сольовою артеріальною гіпертензією на 12 % та 37 %, проте, у вентромедіальному та вентролатеральному суб'ядрах аркуатного ядра гіпоталамусу в групі з есенціальною артеріальною гіпертензією, навпаки, площа ядер нейронів та вміст у них гетерогенної РНК були нижче показників групи з моделлю ендокринно-сольової артеріальної гіпертензії.

Проведений у контрольній групі щурів каріометричний аналіз популяції нейронів суб'ядер аркуатного ядра гіпоталамусу за площею їхніх ядер показав в усіх суб'ядрах переважання клітин із ядрами площею 51-70 мкм² (74-78 %), але довів наявність і специфічних відмінностей, що залежали від функціональних особливостей суб'ядер. Каріометричний аналіз продемонстрував, що артеріальна гіпертензія сприяє структурно-популяційній перебудові у суб'ядрах аркуатного ядра гіпоталамусу щурів експериментальних груп. За результатами було визначено загальні особливості, що притаманні обом експериментальним моделям артеріальної гіпертензії, та доведені патогенетичні відмінності, які залежали від етіології формування патології. Визначені загальні особливості перебудови популяції нейронів при сформованій артеріальній гіпертензії показали, що як у щурів із ендокринно-сольовою, так і з есенціальною моделями, вони характеризуються зменшенням чисельності класично представлених за площею ядер нейронів, появою в окремих суб'ядрах нейронів із дуже дрібними або дуже великими ядрами, через це – розширенням каріометричного діапазону популяції нейронів за площею їх ядер. Етіопатогенетичні особливості показали різноспрямованість змін каріометричного показника у популяції нейронів суб'ядер аркуатного ядра гіпоталамусу. У дорсомедіальному суб'ядрі аркуатного ядра щурів з ендокринно-сольовою моделлю артеріальної гіпертензії характерним є розширення каріометричного діапазону за рахунок появи клітин із великими та дуже великими ядрами нейронів, а в групі з моделлю есенціальної артеріальної гіпертензії – за рахунок клітин із дрібними ядрами. Вентромедіальне суб'ядро аркуатного ядра гіпоталамусу в групі щурів із ендокринно-сольовою моделлю артеріальної гіпертензії показало зростання відсотку нейронів із дрібними ядрами, а у щурів із есенціальною артеріальною гіпертензією, навпаки, характерним було збільшення клітин із великими ядрами. У вентролатеральному суб'ядрі аркуатного ядра гіпоталамусу у щурів із ендокринно-сольовою моделлю артеріальної

гіпертензії каріометричний діапазон зсувається в бік нейронів із дрібними та дуже дрібними ядрами, тимчасом як у групі щурів з есенціальною артеріальною гіпертензією спостерігалися зворотні особливості – суттєво збільшена популяція нейронів із великими та дуже великими ядрами – 70 %.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше на двох експериментальних моделях артеріальної гіпертензії, що є прототипами клінічних нозологічних форм гіпертонічної хвороби, а саме есенціальної (первинної) та вторинної, ендокринно-асоційованої, надана комплексна характеристика стану системи монооксиду азоту, пресорно-депресорного балансу нейропептидів та морфо-деситометричних параметрів ядер нейронів суб'ядер (вентромедіального, вентролатерального та дорсомедіального) аркуатного ядра гіпоталамусу та визначені ключові етіопатогенетичні особливості.

Вперше встановлено, що формування артеріальної гіпертензії змінює стан системи монооксиду азоту у структурі аркуатного ядра гіпоталамусу. Доведено, що при артеріальній гіпертензії, незалежно від етіологічного чиннику та механізмів її формування, відбувається стимуляція відповідних генів конститутивних ізоформ NOS у медіобазальному гіпоталамусі, яка характеризується підвищеним рівнем експресії мРНК nNOS та eNOS, але зниженням мРНК iNOS. Визначено, що трансляція білків-ферментів nNOS та eNOS при ендокринно-сольовій та есенціальній моделях артеріальної гіпертензії знижується, що проявляється зниженням у них концентрації імунореактивного матеріалу до відповідних ізоформ на 7-10 %. При артеріальній гіпертензії доведена зворотна картина експресії iNOS, на яку вказує збільшений її вміст на 13-15 % та концентрації на 5-10 % в обох моделях. Встановлене зниження вмісту нітритів як у гомогенатах медіобазального гіпоталамусу, так і у плазмі крові тварин з артеріальною гіпертензією на фоні підвищення концентрації нітротирозину у плазмі крові, що свідчить про зсув вектору метаболізму системи монооксиду азоту з

фізіологічного в бік формування активних форм кисню – пероксинітриду з прогресуванням оксидативного стресу.

Вперше визначено, що у щурів зі сформованою артеріальною гіпертензією, незалежно від етіології та патогенезу її формування, спостерігаються однотипні зміни вмісту пресорних та депресорних нейропептидів в аркуатному ядрі гіпоталамусу, які характеризуються зменшенням рівнів мозкового натрійуретичного пептиду, β -ендорфіну та ангіотензину II із достовірним збільшення нейротензину. Доведено, що особливості їх вмісту та балансу мають залежність від етіопатогенетичних механізмів сформованої патології. Так, порівняно з контролем, при ендокринно-сольовій артеріальній гіпертензії спостерігається значне переважання вмісту депресорних нейропептидів над пресорними у 4,3 рази, тимчасом як при моделі есенціальної артеріальної гіпертензії – практично в три рази.

Встановлено, що відмінними рисами морфо-денситометричних показників ядер нейронів суб'ядер аркуатного ядра гіпоталамусу у щурів із ендокринно-сольовою моделлю артеріальної гіпертензії, порівняно із есенціальною, є протилежні до контрольних значень характеристики, які при міжгруповому порівнянні мають зворотну залежність. Так, при ендокринно-сольовій моделі артеріальної гіпертензії ядрам нейронів суб'ядер аркуатного ядра більшістю притаманна великоядерність, тимчасом як при есенціальній ядра нейронів переважно дрібні. Доведено, що артеріальна гіпертензія сприяє структурно-популяційній перебудові у суб'ядрах аркуатного ядра гіпоталамусу щурів із сформованою артеріальною гіпертензією, яка має загальні особливості та притаманна обом моделям. Визначено, що незалежно від етіології артеріальної гіпертензії клітинна популяція аркуатного ядра гіпоталамусу стає неоднорідною, з'являються нейрони із дуже дрібними (20-50 μm^2) та дуже великими (71-100 μm^2) ядрами.

Практичне значення отриманих результатів. Робота є фундаментальним дослідженням. Її результати розширюють наукові уявлення про патогенетичні особливості морфо-функціонального стану нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу при різних за етіологією та патогенезом артеріальних гіпертензіях есенціальної та ендокринно-сольової моделей, що є прототипами клінічних нозологічних форм гіпертонічної хвороби – первинної та вторинної, ендокринно-асоційованої. Отримані результати характеризують стан локальної системи монооксиду азоту, особливості пресорно-деперсорного балансу нейропептидів у структурі аркуатного ядра гіпоталамусу та морфо-денситометричні відмінності популяцій нейронів вентромедіального, вентролатерального та дорсомедіального його суб'ядер на фоні стійкого підвищення артеріального тиску.

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 Запорізького державного медичного університету 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.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 19 наукових праць: 6 статей у наукових фахових виданнях України, серед яких 3 статті у журналах, які індексуються міжнародними наукометричними базами (з них 1 стаття без співавторів); 1 стаття у зарубіжному журналі (без співавторів), 12 тез в матеріалах міжнародних і Всеукраїнських з'їздів та науково-практичних конференцій.

Ключові слова: експериментальна артеріальна гіпертензія, аркуатне ядро гіпоталамусу, нейропептиди, система монооксиду азоту, морфоденситометричні характеристики нейронів, щури.

ANNOTATION

Tishchenko S. Pathogenetic features of the morpho-functional state of neurons of the arcuate nucleus of the hypothalamus in arterial hypertension of different origin. – Qualifying scientific work as a manuscript copyright.

Thesis for a doctor of philosophy degree in specialty 222 “Medicine” (14.03.04 – Pathological Physiology). – Zaporizhzhia State Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Zaporizhzhia, 2019.

Zaporizhzhia State Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Zaporizhzhia, 2019.

The general result of the complex research into pathogenetic peculiarities of the morpho-functional state of neurons of the hypothalamic arcuate nucleus in arterial hypertension depending on its etiology and pathogenesis development has shown that the formation of steady hypertension, regardless of the etiological factor and developmental mechanisms, leads to homotypic changes in neuropeptide content, NOS isoform mRNA expression, its isoform profile and NO terminal metabolite concentration, but reveals etiology dependant features of the morpho-densitometric parameters of neuron nuclei as well as their structural and populational relationships in the ventromedial, ventrolateral, and dorsomedial subnuclei of the hypothalamic arcuate nucleus.

The work has incorporated modern pathophysiological, instrumental, molecular and genetic, immunohistochemical, biochemical, morpho-densitometric studies of hypothalamic neurons in experimental arterial hypertension. The statistical analysis of the results has been done.

The nitrogen monoxide local system research conducted has made it possible to conclude that in the mediobasal hypothalamus there is stimulation of the corresponding genes of constitutive NOS isoforms. Simultaneously, the translation of their enzyme proteins in the structure of the arcuate nucleus in simulated endocrine-salt and essential types of arterial hypertension is likely to decrease notwithstanding the increased mRNA expression to nNOS, which is, though, reduced to eNOS. The increased content of the immunoreactive material to nNOS in both groups by more than a third in comparison to the control values may be due to the increased mRNA expression of this isoform in other structures of the mediobasal hypothalamus. The iNOS expression in the structure of the hypothalamic arcuate nucleus in arterial hypertension is characterized by a significant rise both in the concentration of the immunoreactive material and its content in both models. However, whereas in rats with essential hypertension the increase revealed can be explained by the increased synthesis caused by a 50% rise of the normal mRNA enzyme amount, in rats with endocrine-salt arterial hypertension the enzyme amount was 30 % lower. Discovered in the groups of rats with hypertension, the reduction in nitrite content both in the homogenates of the mediobasal hypothalamus and in the blood plasma along with the nitrotyrosine concentration increase characterizes the shift of the vector of the nitrogen monoxide system metabolism from the physiological one to the formation of reactive oxygen species – peroxynitrite with the progression of oxidative stress.

The results of simultaneous immunohistochemical studies of pressor and depressor neuropeptides expression in the structure of the hypothalamic arcuate nucleus under conditions of arterial hypertension of different etiology have shown significant differences from the findings observed in rats with normal blood pressure. It has been found that the neurotensin pressor hormone content and concentration is increased, but the severity of the changes is dependent on the hypertension model type. Thus, in the model of essential primary arterial hypertension, which developed in the SHR line (the essential arterial hypertension model in rats), these indicators are the highest and exceed the control indicators by

more than 50 %, whereas in the group of secondary endocrine hypertension (the model of endocrine-salt arterial hypertension) the control values of the immunoreactive material content and concentration as related to neurotensin are not more than 11 % higher.

It has been revealed, however, that the expression of the pressor neurohormone angiotensin II in the hypothalamic arcuate nucleus in rats with experimental arterial hypertension decreases, with its content and concentration in animals of the essential arterial hypertension model (SHR line) being 70 % and 72 % lower than the control values whereas in animals of the endocrine-salt hypertension model the findings being 53 % and 59 % lower, respectively.

It has been newly found that arterial hypertension leads to a decrease in the expression of both depressor neuropeptides under study in the arcuate nucleus of the hypothalamus. In rats of the essential arterial hypertension model, the content, concentration, and specific area of the immunoreactive material as related to the brain natriuretic peptide become significantly lower than the control values by 19 %, 16 %, and 11 %, respectively; whereas immunoreactive material as related to β -endorphin shows a 39 % reduction in content, a 17 % decrease in concentration, and a 22 % lowering in specific area. It should be noted that more significant differences in both the increase in neurotensin level and the decrease in angiotensin II, brain natriuretic peptide and β -endorphin are more pronounced in rats of the essential arterial hypertension model.

An important feature of the work was to determine the differences in the morpho-densitometric characteristics of neuronal nuclei in the individual subunits of the hypothalamic arcuate nucleus in rats of the experimental groups with hypertension. In this case, the morphometric and densitometric characteristics of the nuclei of the neurons of certain subnuclei of the hypothalamic arcuate nucleus in arterial hypertension were characterized by opposite indices in different models. The values of the nucleus area and heterogeneous RNA content in rats of the endocrine-salt arterial hypertension model were smaller – by 8 % and 24 %, respectively, whereas in the essential arterial hypertension model both indicators

exceeded the control values by 5 %. In the ventromedial subunit of the hypothalamic arcuate nucleus in the rat group of the essential arterial hypertension model, all the parameters studied were below the control values, whereas in the endocrine-salt arterial hypertension model only the content of heterogeneous RNA exceeded the control value by 5 %. The morpho-densitometric characteristics of the nuclei of the ventrolateral subnucleus of the hypothalamic arcuate nucleus in rats with endocrine-salt hypertension exceeded the control values: the area of the neuron nuclei was 19 % larger and the heterogeneous RNA content in them was 10 % higher, whereas the rats with essential arterial hypertension revealed opposite results – the area of neuron nuclei was 15 % less than the control indicator and the heterogeneous RNA content was 27 % lower.

In the dorsomedial subnucleus of the hypothalamic arcuate nucleus, in essential arterial hypertension, the area of the neuron nuclei and their heterogeneous RNA content exceeded the values of the control group by an average of 5 %, whereas in the endocrine-salt model, the opposite dynamics was observed – the area of the neuron nuclei was 15 % smaller and their heterogeneous RNA content was 27 % lower.

The comparative analysis of the groups in respect to morpho-densitometric characteristics of neurons of the subnucleus of the hypothalamic arcuate nucleus has showed that in the dorsomedial subnucleus of the hypothalamic arcuate nucleus, in essential arterial hypertension, the area of neuron nuclei and their heterogeneous RNA content exceed the values of the endocrine-salt arterial hypertension group by 12 % and 37 %. However, in the ventromedial and ventrolateral subnuclei of the hypothalamic arcuate nucleus in the essential arterial hypertension group the area of the neuron nuclei and their heterogeneous RNA content is, on the contrary, lower than in the group of the endocrine-salt hypertension model.

The rats of the control group were subjected to the karyometric analysis of the population of neurons of the subnuclei of the hypothalamic arcuate nucleus as for the area of their nuclei which showed that in all the subnuclei the cells with the

nuclei of 51-70 μm^2 (74-78 %) dominated. The analysis also revealed specific features which depended on the functional peculiarities of the subnuclei. The karyometric analysis showed that hypertension promotes structural and populational remodeling in the subnuclei of the hypothalamic arcuate nucleus of the rats in the experimental groups. The results identified the general features inherent in both models and proved pathogenetic differences that depended on the etiology of pathology development. The peculiarities of the neuron population remodeling with the developed arterial hypertension have shown that both in rats with endocrine-salt hypertension and with essential one, the remodeling is characterized by a decrease in the number of neurons of the typical area as well as presence of neurons with very small or very big nuclei in some subnuclei, which results in expanding the karyometric range of neurons by the area of their nuclei. The ethiopathogenetic features have shown the multidirectionality of changes in the karyometric index in the neuron population of the subnuclei of the hypothalamic arcuate nucleus. In the dorsomedial subnucleus of the arcuate nucleus in rats with the endocrine-salt arterial hypertension, the karyometric range expands due to the appearance of cells with large and very large nuclei of neurons while in the group with the essential arterial hypertension it happens owing to the cells with small nuclei. The ventromedial subnucleus of the hypothalamic arcuate nucleus in the group of rats with the endocrine-salt arterial hypertension is characterized by an increase in the percentage of neurons with small nuclei, whereas the rats with essential arterial hypertension can, on the contrary, be noted for a greater number of cells with large nuclei. In the ventrolateral subnucleus of the hypothalamic arcuate nucleus in the rats with the endocrine-saline arterial hypertension the karyometric range shifts toward neurons with small and very small nuclei, whereas the group of rats with essential arterial hypertension has shown opposite results, i.e. a significant rise in the population of neurons with large and very large nuclei – 70 %.

Scientific novelty of the results obtained. For the first time, the two experimental models of hypertension, which are prototypes of clinical nosological

forms of hypertension, namely essential (primary) and endocrine (secondary) ones, have been used to give a complex analysis of pressor-depressor relationships and morpho-desitometric parameters of the nuclei of neurons of subnuclei (ventromedial, ventrolateral, and dorsomedial) of the hypothalamic arcuate nucleus and identify key etiopathogenetic features.

It has been newly found that the development of arterial hypertension alters the state of the nitrogen monoxide system in the structure of AH hypothalamus. It has been proved that in arterial hypertension, regardless of the etiological factor and mechanisms of its formation, there occurs stimulation of the corresponding genes of constitutive NOS isoforms in the mediobasal hypothalamus, which is characterized by an increased level of nNOS and eNOS mRNA expression, but a decreased number of mRNA. It has been determined that the translation of nNOS and eNOS protein enzymes into the endocrine-salt and essential models of arterial hypertension is reduced, which results in lowering immunoreactive material concentration in them to the corresponding isoforms by 7-10 %. In both models the arterial hypertension has demonstrated a reverse pattern of iNOS expression which is characterized by a 13-15 % increase in content and a 5-10 % rise in concentration. The reduction found in nitrite content both in homogenates of the mediobasal hypothalamus and in the blood plasma of animals with arterial hypertension along with the increased concentration of nitrotyrosine in blood plasma indicates a shift of the vector of the nitrogen monoxide system metabolism from the physiological one towards the development of active oxygen forms – peroxidation with the progression of oxidative stress.

It has been first discovered that in rats with the developed hypertension, regardless of its etiology and formation pathogenesis, there are similar changes in the content of pressor and depressor neuropeptides in the hypothalamic arcuate nucleus. These changes are characterized by a decrease in the level of brain natriuretic peptide, β -endorphine, and angiotensin II with a positive increase in neurotensin. It has been proved that the peculiarities of their content and balance depend on the etiopathogenetic mechanisms of the pathology developed. Thus, in

comparison with the control values, in endocrine-salt hypertension the depressor neuropeptide content significantly dominates over the pressor one by 4.3 times, whereas in the essential arterial hypertension model – by only 2.83 times.

It has been determined that the distinguishing features of the morpho-densitometric indices of the neurons of the subnuclei of the hypothalamic arcuate nucleus in rats with arterial hypertension of the endocrine-salt model in comparison with the essential one are characteristics opposite to the control values, however, the comparison of the groups has shown that they have inverse relationships. Thus, in the arterial hypertension of the endocrine-salt model, the nuclei of the arcuate nucleus are in most cases characterized by a large nucleus, whereas in most neurons they have small nuclei. Arterial hypertension has been found to promote structural and populational remodeling in the subnuclei of the hypothalamic arcuate nucleus in rats with arterial hypertension, which have common features and are inherent in both models. It has been discovered that irrespective of the arterial hypertension etiology, the cell population of the hypothalamic arcuate nucleus becomes heterogeneous, and neurons with very small (μm^2) and very large (μm^2) nuclei appear.

Practical significance of the results obtained. The work is a fundamental research. Its results deepens the scientific understanding of the pathogenetic features of the morpho-functional state of neurons of the hypothalamic arcuate nucleus in essential and endocrine-salt models of arterial hypertension, which are prototypes of clinical nosperidinic forms of hypertension – primary and secondary (endocrine). The results obtained characterize the state of the nitrogen monoxide local system, peculiarities of pressor-depressor relations in the structure of the hypothalamic arcuate nucleus, and morpho-densitometric differences in the population of ventromedial, ventrolateral, and dorsomedial subnuclei set against a steady increase in arterial tension.

The new theoretical provisions of the thesis are used in the educational process at the Department of General Pathophysiology of the Higher Educational Institution “I. Horbachevsky Ternopil National Medical University”, Department

of Pathophysiology of the Ukrainian Medical Stomatological Academy of the Ministry of Health of Ukraine, Department of Pathological Physiology of the Zaporizhzhia State Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Department of Pathological Physiology of the Dnepropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine, Department of Pathology and Physiology n.a. D. O. Alpern of the Kharkiv National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Department of General and Clinical Pathophysiology n. a. V. V. Podvysotsky of the Odessa National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine.

Keywords: *experimental hypertension, hypothalamic arcuate nucleus, neuropeptides, nitrogen monoxide system, morpho-densitometric characteristics of neurons, rats.*

**СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ НА ТЕМУ
ДИСЕРТАЦІЇ:**

1. Кузьо Н.В., Тищенко С.В., Самойленко Н.Ю., Нифонтова В.В. Анализ патофизиологических моделей артериальной гипертензии у мелких лабораторных животных. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*. 2014. Т. 14, №3 (47). С.210–214. (Дисертант виконав літературний пошук).
2. Kolesnyk Yu.M., Gancheva O.V., Tishchenko S.V. The pattern of the NOS isoforms expression in arcuate nucleus of hypothalamus in experimental hypertension. *Патологія*. 2017. Т. 14, №1(39). С. 38–42. (Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів).
3. Тищенко С.В., Ганчева О.В., Грекова Т.А. Порівняльний аналіз вмісту мозкового натрійуретичного пептиду та β-ендорфіну в аркуатному ядрі гіпоталамусу при артеріальній гіпертензії різного генезу. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*. 2017. Т. 17, №4(60), Ч.2. С. 87-91. (Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів).
4. Hancheva O.V., Tishchenko S.V., Ivanenko T.V. Quantitative characteristics of the neurotensin content in the hypothalamic arcuate nucleus in arterial hypertension of different etiologies. *Патологія*. 2018. Т. 15, № 2(43). С. 176–179. (Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів).
5. Тищенко С.В. Особливості експресії ангіотензину II в аркуатному ядрі гіпоталамусу експериментальних щурів при різних за етіологією артеріальних гіпертензіях. *Патологія*. 2018. Т. 15, № 3(44). С. 367–371. (Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів).

6. Ганчева О.В., Тищенко С.В. Артеріальна гіпертензія – як важливий фактор морфоденсітометричних змін нейронів аркуатного ядра гіпоталамуса. залежність перебудов від етіології артеріальної гіпертензії. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2019. Т. 18, №1(67). С. 33–38. (Дисертант виконав набір матеріалу, морфоденсітометричне дослідження та статистичну обробку результатів).

7. Tishchenko S.V. The balance of pressor and depressor substances in the neurons of arcuate nucleus of hypothalamus in etiologically different arterial hypertension. *Journal of Education, Health and Sport*. 2019. Vol.9, №4. P. 492-502.

8. Колесник Ю.М., Абрамова Т.В., Самойленко Н.Ю., Тищенко С.В.. Спадкова залежність формування метаболічних порушень у щурів лінії SHR на фоні артеріальної гіпертензії. *Науково-практичний журнал: Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2013. №2 (19). С. 251-252. (Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів).

9. Самойленко Н.Ю., Тищенко С.В. Крысы линии SHR как адекватная модель генетически детерминированной гипертензии у человека. *Патологія*. 2014. №1(30). С. 34. (Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів).

10. Ганчева О.В., Тищенко С.В., Богатирчук Н.С. Сравнительный анализ паттерна распределения nNOS в сосудистом и тканевом компартментах аркуатного ядра гипоталамуса. *Сучасні аспекти медицини і фармації – 2015*: зб. тез Всеукраїнської наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнародною участю. Запоріжжя: ЗДМУ, 14-15 травня, 2015. С. 40-41. (Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів).

11. Ганчева О.В., Тищенко С.В., Богатирчук Н.С. Анализ распределения эндотелиальной синтазы оксида азота в аркуатном ядре гипоталамуса у крыс со спонтанной артериальной гипертензией.

Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених та студентів. *Здобутки теоретичної медицини в практику охорони здоров'я* : зб. тез Всеукраїнської наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів. Запоріжжя: ЗДМУ, 24-25 березня, 2016. С. 45-46. (*Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів*).

12. Тищенко С.В. Анализ распределения нейрональной синтазы оксид азота в аркуатном ядре гипоталамуса у крыс со спонтанной артериальной гипертензией. *Іновації в медицині* : зб. тез 85-ої наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених із міжнар. участю. Івано-Франківськ : 24-25 березня 2016. С. 258-259.

13. Тищенко С.В., Ганчева О.В. Экспрессия мозгового натрийуретического пептида и β -эндорфина при этиологически разных моделях артериальной гипертензии. *Сучасні аспекти медицини і фармації – 2017*: зб. тез Всеукраїнської наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнародною участю. Запоріжжя: ЗДМУ, 11-12 травня, 2017. С. 115. (*Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів*).

14. Ганчева О.В., Тищенко С.В., Мороз Д.В. Сравнительный анализ распределения нейротензина в аркуатном ядре гипоталамуса. *Сучасні аспекти медицини і фармації – 2018*: зб. тез всеукраїнської наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнародною участю. Запоріжжя: ЗДМУ, 18-25 квітня, 2018. С. 9. (*Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів*).

15. Ганчева О.В., Федотова М.І., Тищенко С.В., Данукало М.В. Вплив артеріальної гіпертензії на стан системи оксиду азоту в експерименті. *Інтегративні механізми пат. процесів: від експеримент. досліджень до клінічної практики*: матеріали VII Пленуму Всеукр. наук. товариства патофізіологів та наук.-практ. конф., присв. 110-річчю з дня народження чл.-кор. АМН СРСР, проф. М.Н. Зайка. Полтава, 11-12 жовтня, 2018. С. 17.

(Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів).

16. Tishchenko S.V. Features of the BNP and beta-endorphin expression in hypertension in different models. *Cardiovascular Research*. V.114. Suppl 1 Vienna, 2018. S 24.

17. Ганчева О.В., Данукало М.В., Тіщенко С.В. Аналіз показників експресії ангіотензину II в аркуатному ядрі гіпоталамуса та дорсальному моторному ядрі N. vagus у гіпертензивних щурів. *Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології: зб. тез міжнарод. наук.-практ. конф. Харків, 2019. С. 30-32. (Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів).*

18. Тіщенко С.В., Михайличенко В.В. Вплив есенціальної артеріальної гіпертензії на морфо-денситометричні показники нейронів аркуатного ядра гіпоталамуса. *«Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» зб. тез міжнарод. наук.-практ. конф. Харків, 15 травня, 2019. С. 173. (Дисертант виконав набір матеріалу, гістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів).*

19. Ганчева О.В., Данукало М.В., Тіщенко С.В., Каджарян Є.В. Етіологічна залежність вмісту ангіотензину 2 в аркуатному ядрі гіпоталамусу та блакитній плямі стовбуру мозку при артеріальній гіпертензії : матеріали 20-го з'їзду Укр. фізіологічного тов.-ва з між нар. участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г.Костюка (м. Київ, 27-30 трав. 2019 р.). *Фізіологічний журнал*. 2019. Т. 65, № 3. С. 50. *(Дисертант виконав набір матеріалу та імуногістхімічне дослідження).*

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів	27
Вступ.....	29
Розділ 1 Сучасні уявлення про особливості морфо-функціонального стану нейронів аркуатного ядра та пептидергічної системи гіпоталамусу в патогенезі артеріальної гіпертензії (огляд літератури).....	36
1.1 Аналіз поширеності та захворюваності на артеріальну гіпертензію.....	36
1.2 Розповсюдженість артеріальної гіпертензії у світі...	37
1.3 Захворюваність на артеріальну гіпертензію в Україні, статистичні та популяційні дослідження, особливості перебігу	38
1.4 Сучасні теорії формування та прогресування артеріальної гіпертензії	39
1.5 Особливості виникнення та перебігу артеріальної гіпертензії залежно від патогенетичних механізмів формування та розвитку	42
1.5.1 Нейрогенна артеріальна гіпертензія, сучасні теорії формування та патогенетичні механізми розвитку	43
1.5.2 Вторинна, ендокринно-асоційована артеріальна гіпертензія, сучасні теорії формування та патогенетичні механізми розвитку	44
1.6 Сучасні експериментальні дослідження патогенетичних механізмів формування артеріальної гіпертензії	47
1.6.1 Щури лінії SHR, які є моделлю есенціальної артеріальної гіпертензії у людини	47
1.6.2 Модель ниркової артеріальної гіпертензії	48
1.6.3 ДОКА-модель артеріальної гіпертензії	50
1.6.4 Модель артеріальної гіпертензії, зумовлена психоемоційними перенавантаженнями	50
1.7 Сучасні уявлення про механізми регуляції артеріального тиску та їх порушення	52

1.7.1 Роль центральних механізмів регуляції артеріального тиску у формуванні артеріальної гіпертензії. Пресорні та депресорні системи регуляції артеріального тиску, їхній вплив на гіпоталамічні регуляторні центри	53
1.8 Аркуатне ядро гіпоталамусу, функціональні та анатомічні особливості при експериментальній патології	57
1.8.1 Пептидергічна система аркуатного ядра гіпоталамусу	60
1.8.2 Роль порушення морфо-функціонального стану та особливості пептидергічної системи АрЯ гіпоталамусу при артеріальній гіпертензії	62
Розділ 2 Матеріал та методи дослідження	65
2.1 Матеріал дослідження	65
2.2 Моделювання артеріальних гіпертензій	68
2.2.1 Модель первинної есенціальної артеріальної гіпертензії	69
2.2.2 Модель вторинної, ендокринно-сольової, артеріальної гіпертензії	70
2.3 Методи дослідження	71
2.3.1 Методика вимірювання артеріального тиску в щурів	72
2.3.2 Комплексний метод дослідження стану системи монооксида азоту АрЯ гіпоталамусу щурів експериментальних груп	73
2.3.2.1 Метод визначення ізоформного профілю NOS	73
2.3.2.2 Метод дослідження концентрації нітритів у гомогенатах мозку та плазмі крові	77
2.3.2.3 Метод дослідження концентрації нітротирозину в плазмі щурів	79
2.3.2.4 Метод дослідження експресії мРНК nNOS, iNOS та eNOS	79
2.3.3 Метод детекції нейропептидів ангіотензину II, нейротензину, мозкового натрійуретичного пептиду та β -ендорфіну в структурі АрЯ гіпоталамусу	84

2.3.3.1	Метод розрахунку співвідношення показників експресії нейропептидів та депресорно-пресорних взаємовідносин в аркуатному ядрі гіпоталамуса у щурів експериментальних груп	87
2.3.4	Методика морфо-денситометричного дослідження параметрів ядер нейронів АрЯ гіпоталамуса.....	88
2.3.4.1	Аналіз морфометричного показника площі ядер нейронів вентромедіального, доромедіального та вентролатерального суб'ядер АрЯ гіпоталамуса у щурів експериментальних груп	91
2.3.5	Методи статистичного аналізу	92
Розділ 3 Особливості стану системи монооксиду азоту у експериментальних щурів з артеріальною гіпертензією.....		93
3.1	Ізоформний профіль ферменту NOS в аркуатному ядрі гіпоталамуса щурів експериментальних груп.....	94
3.1.1	Особливості показників експресії нейрональної NOS в аркуатному ядрі гіпоталамуса щурів експериментальних груп	95
3.1.2	Особливості показників експресії індукцибельної NOS в аркуатному ядрі гіпоталамуса щурів експериментальних груп	100
3.1.3	Особливості показників експресії ендотеліальної NOS в аркуатному ядрі гіпоталамуса щурів експериментальних груп	104
3.2	Показники експресії mRNA nNOS, iNOS та eNOS в медіобазальному гіпоталамусі щурів експериментальних груп	109
3.3	Рівень кінцевих метаболітів NO у експериментальних щурів	111
3.3.1	Рівень нітритів в гомогенатах мозку та плазмі крові у щурів експериментальних груп	112
3.3.2	Рівень нітротирозину у плазмі крові щурів експериментальних груп	113
Розділ 4 Особливості вмісту нейропептидів в аркуатному ядрі гіпоталамуса в щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією		116

4.1 Особливості вмісту та розподілу нейротензину в аркуатному ядрі гіпоталамуса щурів експериментальних груп	117
4.2 Особливості вмісту та розподілу ангіотензину II в аркуатному ядрі гіпоталамуса щурів експериментальних груп	122
4.3 Особливості вмісту та розподілу мозкового натрійуретичного пептиду в аркуатному ядрі гіпоталамуса щурів експериментальних груп	126
4.4 Особливості вмісту та розподілу β -ендорфіну в аркуатному ядрі гіпоталамуса щурів експериментальних груп	131
4.5 Характеристика депресорно-пресорних взаємовідносин в аркуатному ядрі гіпоталамуса щурів експериментальних груп	135
Розділ 5 Морфо-денситометричні характеристики нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу у експериментальних щурів з артеріальною гіпертензією	139
5.1 Морфо-денситометричні показники ядер нейронів дорсомедіального суб'ядра АрЯ гіпоталамуса щурів експериментальних груп	141
5.2 Морфо-денситометричні показники ядер нейронів вентромедіального суб'ядра АрЯ гіпоталамуса щурів експериментальних груп	144
5.3 Морфо-денситометричні показники ядер нейронів ветролатерального суб'ядра АрЯ гіпоталамуса щурів експериментальних груп	146
5.4 Каріометричний аналіз ядер нейронів, суб'ядер АрЯ гіпоталамуса за їхньою площею у щурів експериментальних груп	148
Розділ 6 Аналіз та узагальнення результатів дослідження	157
Висновки	182
Список використаних джерел	186
Додатки	

Додаток А Акти впровадження.....	211
Додаток Б Наукові праці, опубліковані за темою дисертації.....	215
Додаток В Відомості про апробацію результатів дисертації.....	220

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

АГ — артеріальна гіпертензія

АГ II — ангіотензин II

АКТГ — адренокортикотропний гормон

АрЯ — аркуатне ядро гіпоталамуса

вм-АрЯ — вентромедіальне суб'ядро аркуатного ядра гіпоталамуса

вл-АрЯ — вентролатеральне суб'ядро аркуатного ядра гіпоталамуса

ГАМК— γ -аміномасляна кислота

ДАТ — діастолічний артеріальний тиск

дм-АрЯ — дорсомедіальне суб'ядро аркуатного ядра гіпоталамуса

ДМЯ — дорсомедіальне ядро гіпоталамуса

ЕАГ — есенціальна артеріальна гіпертензія

ЕСАГ — ендокринно-сольова артеріальна гіпертензія

ЗПОС — загальний периферичний опір судин

ІРМ — імунореактивний матеріал

ІМЛ — інтермедіолатеральний стовп спинного мозку

КВЛМ— каудальна вентролатеральна область

мРНК — матрична рибонуклеїнова кислота

НТ — нейротензин

O₁ — умовні одиниці інтенсивності флуоресценції

O₀ — умовні одиниці оптичної густини

ОЦК — об'єм циркулюючої крові

ПГА — первинний гіперальдостеронізм

ПВЯ — паравентрикулярне ядро гіпоталамуса

РААС — ренін-ангіотензин-альдостеронова система

РВЛМ — ростральна вентролатеральна область

СНС — симпатична нервова система

САТ — систолічний артеріальний тиск

СОЯ — супраоптичне ядро

СХЯ — супрахіазмальне ядро

ЦНС — центральна нервова система

AgRP — agouti-related protein (агути-подібний пептид)

α -МСГ — альфа-меланоцит стимулюючий гормон

BNP — brain natriuretic peptide (мозковий натрійуретичний пептид)

CART — cocaine- and amphetamine-regulated transcript (кокаїн-амфетамін регулюючий транскрипт)

cAMP—циклічний аденозинмонофосфат

eNOS — ендотеліальна синтаза оксиду азоту

iNOS — індуцибельна синтаза оксиду азоту

NTS — nucleus tractus solitarii (ядро солітарного тракту)

NLRP1 — цитозольний пептид, NOD - подібний рецептор підгрупи

NALP

NO — монооксид азоту

nNOS — нейрональна синтаза оксиду азоту

NPY — нейропептид Y

NPY-1— рецептор першого типу до нейропептиду Y

NMDA — N-метіл -D- аспартат

NOS — синтаза оксиду азоту

POMC — Proopiomelanocortin (проопіомеланокортин)

γ -МСГ — гамма-меланоцит стимулюючий гормон

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. На сьогоднішній день артеріальну гіпертензію вже не можна розглядати як захворювання, що пов'язане виключно з порушенням судинного тону. Для неї притаманна присутність цілого комплексу патологічних процесів, а саме: симпатикотонії, метаболічних та гормональних порушень, прихованої інсулінорезистентності та швидко прогресуючого атеросклерозу, фіналом яких стає розвиток кардіо-васкулярної патології [1-3].

На «світової арені» серцево-судинні захворювання стають причиною приблизно 17 млн. випадків смерті щорічно, що становить третину від показника загальної смертності [4], серед яких 9,4 млн. летальних випадків виникає через ускладнення гіпертонії [5]. Згідно світової статистики, серед осіб, хворих на артеріальну гіпертензію, 57 % чоловіків та 47 % жінок працездатного віку отримують інвалідність внаслідок ушкодження органів-мішеней що призводить до ранньої непрацездатності та інвалідізації [5].

Слід зазначити, що незважаючи на чисельні дослідження та клінічні спостереження, питання окремих ланок патогенезу артеріальної гіпертензії, особливостей стану гіпоталамічних центрів регуляції артеріального тиску досі не з'ясовані. Залишаються суперечливими уявлення про морфо-функціональний стан нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу при артеріальній гіпертензії, не визначені особливості та відмінності стану локальної системи монооксиду азоту, балансу пресорних та депресорних нейрогормонів та структурно-популяційні особливості нейронів суб'ядер аркуатного ядра гіпоталамусу при етіологічно різних моделях патології – есенціальної та ендокринно-сольової гіпертензіях, які є прототипами клінічних нозологічних форм гіпертонічної хвороби, а саме, первинної та вторинної, ендокринно-асоційованої.

Саме ці важливі, але недостатньо вивчені, патогенетичні особливості морфо-функціонального стану нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу при різних моделях артеріальної гіпертензії (есенціальної та ендокринно-сольової) останнім часом викликають великий інтерес дослідників та клініцистів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри патологічної фізіології Запорізького державного медичного університету МОЗ України: «Роль пептидергічних структур гіпоталамусу та стовбуру мозку в патогенезі артеріальної гіпертензії», 2017–2019 рр. (№ державної реєстрації 0117U002579).

Мета і завдання дослідження. Мета – довести патогенетичні особливості морфо-функціонального стану нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу при різних моделях артеріальної гіпертензії (есенціальної та ендокринно-сольової).

Для досягнення поставленої мети були поставлені наступні завдання:

1. Оцінити особливості стану локальної внутрішньоядерної системи монооксиду азоту в АрЯ гіпоталамусу (ізоформний профіль ферменту NOS, патерн експресії mRNA nNOS, eNOS, iNOS, рівень стабільних метаболітів NO – нітритів в гомогенатах медіобазального гіпоталамусу) вміст нітритів та показника оксидативного стресу нітротирозину у плазмі крові щурів при генетично-детермінованій артеріальній гіпертензії (лінія SHR) та самців-щурів із ендокринно-сольовою моделлю артеріальної гіпертензії.

2. Дослідити особливості балансу депресорних нейропептидів мозкового натрійуретичного пептиду та β -ендорфіну в АрЯ гіпоталамусу у щурів при генетично-детермінованій артеріальній гіпертензії (лінія SHR) та самців-щурів із ендокрино-сольовою моделлю артеріальної гіпертензії.

3. Встановити особливості балансу пресорних нейропептидів ангіотензину II та нейротензину в АрЯ гіпоталамусу у щурів при генетично-

детермінованій артеріальній гіпертензії (лінія SHR) та самців-щурів з ендокринно-сольовою моделлю артеріальної гіпертензії.

4. Визначити особливості морфо-денситометричних показників нейронів АрЯ за площею ядер, вмісту та концентрації у ядрах нейронів гетерогенної РНК у щурів при генетично-детермінованій артеріальній гіпертензії (лінія SHR) та самців-щурів з ендокринно-сольовою моделлю артеріальної гіпертензії.

5. З'ясувати ключові відмінності балансу пресорних та депресорних нейропептидів, характерні особливості їхнього співвідношення, стан системи монооксиду азоту та морфо-денситометричні показники ядер нейронів АрЯ гіпоталамусу при різних за етіологією експериментальних артеріальних гіпертензіях.

Об'єкт дослідження: морфо-функціональний стан нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу за умов експериментальної артеріальної гіпертензії.

Предмет дослідження: стан системи монооксиду азоту, морфо-денситометричні характеристики ядер нейронів, баланс пресорних (ангіотензину II і нейротензину) та депресорних (мозкового натрійуретичного пептиду та β -ендорфіну) нейропептидів в аркуатному ядрі гіпоталамусу при різних за етіологією артеріальних гіпертензіях (есенціальній та ендокринно-сольовій моделях).

Методи дослідження: патофізіологічні, інструментальні, молекулярно-генетичні, імуногістохімічні, біохімічні, морфо-денситометричні дослідження нейронів гіпоталамусу для визначення балансу пресорних та депресорних систем за умов експериментальної артеріальної гіпертензії; статистичний аналіз результатів.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше на двох експериментальних моделях артеріальної гіпертензії, що є прототипами клінічних нозологічних форм гіпертонічної хвороби, а саме есенціальної (первинної) та вторинної, ендокринно-асоційованої, надана комплексна характеристика пресорно-депресорних взаємин та морфо-денситометричних

параметрів ядер нейронів суб'ядер (вентромедіального, вентролатерального та дорсомедіального) аркуатного ядра гіпоталамусу та визначені ключові етіопатогенетичні особливості.

Вперше встановлено, що формування артеріальної гіпертензії змінює стан системи монооксиду азоту у структурі АрЯ гіпоталамусу. Доведено, що при артеріальній гіпертензії, незалежно від етіологічного чиннику та механізмів її формування, відбувається стимуляція відповідних генів конститутивних ізоформ NOS у медіобазальному гіпоталамусі, що характеризується підвищеним рівнем експресії мРНК nNOS та eNOS, але зниженням мРНК iNOS. Визначено, що трансляція білків-ферментів nNOS та eNOS при ендокринно-сольовій та есенціальній моделях артеріальної гіпертензії знижується, що проявляється зниженням у них концентрацій імунореактивного матеріалу до відповідних ізоформ на 7-10 %. При артеріальній гіпертензії доведена зворотна картина експресії iNOS, що показує в обох моделях збільшений її вміст на 13-15 % та концентрації на 5-10 %. Встановлене зниження вмісту нітритів як у гомогенатах медіобазального гіпоталамусу, так і у плазмі крові тварин з артеріальною гіпертензією на фоні підвищення концентрації нітротирозину в плазмі крові, свідчить про зсув вектору метаболізму системи монооксиду азоту з фізіологічного в бік формування активних форм кисню – пероксинітриду з прогресуванням оксидативного стресу.

Вперше встановлено, що у щурів зі сформованою артеріальною гіпертензією, незалежно від етіології та патогенезу її формування, спостерігаються однотипні зміни вмісту пресорних та депресорних нейропептидів в аркуатному ядрі гіпоталамусу, які характеризуються зменшенням рівнів мозкового натрійуретичного пептиду, β -ендорфіну та ангіотензину II із достовірним збільшення нейротензину. Доведено, що особливості їхнього вмісту та балансу мають залежність від етіопатогенетичних механізмів сформованої патології. Так, порівняно з контролем, при ендокринно-сольовій артеріальній гіпертензії спостерігається

значне переважання вмісту депресорних нейропептидів над пресорними у 4,3 рази, тимчасом як при моделі есенціальної артеріальної гіпертензії – тільки у 2,83 рази.

Визначено, що відмінними рисами морфо-денситометричних показників ядер нейронів суб'ядер аркуатного ядра гіпоталамусу в щурів із ендокринно-сольової моделі артеріальної гіпертензії, на відміну від есенціальної, є протилежні характеристики, порівняно з контрольними значеннями, а при між груповому порівнянні мають зворотну залежність. Так, при ендокринно-сольовій моделі артеріальної гіпертензії ядрам нейронів суб'ядер аркуатного ядра більшістю притаманна великоядерність, тимчасом як при есенціальній артеріальній гіпертензії популяція нейронів представлена клітинами з дрібними ядрами. Доведено, що артеріальна гіпертензія сприяє структурно-популяційній перебудові у суб'ядрах аркуатного ядра гіпоталамусу щурів із сформованою артеріальною гіпертензією, які мають загальні особливості та притаманні обом моделям. Визначено, що незалежно від етіології артеріальної гіпертензії, клітинна популяція аркуатного ядра гіпоталамусу стає неоднорідною, з'являються нейрони із дуже дрібними (35-40 мкм²) та дуже великими (100-110 мкм²) ядрами.

Практичне значення отриманих результатів. Робота є фундаментальним дослідженням. Її результати розширюють наукові уявлення про патогенетичні особливості морфо-функціонального стану нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу при різних за етіологією та патогенезом артеріальними гіпертензіями, есенціальної та ендокринно-сольової моделях, які є прототипами клінічних нозологічних форм гіпертонічної хвороби – первинної та вторинної, ендокринно-асоційованої. Отримані результати характеризують стан локальної системи монооксиду азоту, особливості пресорно-деперсорних взаємин у структурі аркуатного ядра гіпоталамусу та морфо-денситометричні відмінності популяцій нейронів вентромедіального, вентролатерального та дорсомедіального його суб'ядер на фоні стійкого підвищення артеріального тиску.

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 Запорізького державного медичного університету 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.

Особистий внесок дисертанта. Дисертаційна робота є самостійно виконаним дослідженням автора, науковим керівником визначені тема і складена програма дослідження. Дисертант особисто виконав патентно-інформаційний пошук і аналіз літератури, а також патофізіологічні, інструментальні, молекулярно-генетичні, імуногістохімічні, біохімічні, морфо-денситометричні дослідження матеріалу всіх щурів; провів статистичний аналіз отриманих даних, систематизував та інтерпретував отримані результати; написав всі розділи дисертації; сформулював висновки.

Апробація результатів дисертації. За рішенням Вченої Ради Запорізького державного медичного університету МОЗ України протокол № 12 від 26.06.19 р., фаховий семінар для апробації дисертації відбувся на базі призначеного структурного підрозділу кафедри патологічної фізіології (заступник голови професор кафедри, д.мед.н., професор Абрамов А.В.), за участю призначених рецензентів (професор, д.мед.н., Камишний О.М., доцент, к.мед.н. Мельнікова О.В.) та співробітників кафедр патологічної фізіології, мікробіології, вірусології та імунології, патологічної анатомії і судової медицини; нормальної фізіології, анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії; гістології, цитології та ембріології Запорізького державного медичного університету МОЗ України 27.06.2019р.

Основні положення роботи були представлені та обговорені на: 2-х Всеукраїнських науково-практичних конференціях молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2015» (Запоріжжя, 2015), «Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я» (Запоріжжя, 2016), 7-х міжнародних науково-практичних конференціях студентів та молодих вчених «Інновації в медицині» (Івано-Франківськ, 2016), «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2017» (Запоріжжя, 2017); «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2018» (Запоріжжя, 2017); «Інтегративні механізми пат. процесів: від експеримент. досліджень до клінічної практики» (Полтава 2018), «Frontiers in Cardio Vascular Biology» (Відень 2018), «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології» (Харків 2019), 20-му з'їзді Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П. Г. Костюка (Київ, 2019).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 19 наукових праць: 6 статей у наукових фахових виданнях України, серед яких 3 статті у журналах, які індексуються міжнародними наукометричними базами (з них 1 стаття без співавторів); 1 стаття у зарубіжному журналі (без співавторів), 12 тез в матеріалах міжнародних і Всеукраїнських з'їздів та науково-практичних конференцій.

Структура то обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 226 сторінках машинопису і складається з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 3 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, додатків. Робота ілюстрована 46 рисунками та 16 таблицями. Список літератури містить 225джерела (31 кирилицею та 194 латиницею).

РОЗДІЛ 1
СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ОСОБЛИВОСТІ МОРФО-
ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ НЕЙРОНІВ АРКУАТНОГО ЯДРА ТА
ПЕПТИДЕРГІЧНОЇ СИСТЕМИ ГІПОТАЛАМУСУ В ПАТОГЕНЕЗИ
АРТЕРІАЛЬНОЇ ГІПЕРТЕНЗІЇ
(ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Аналіз поширеності та захворюваності на артеріальну гіпертензію

Комітетом експертів ВООЗ ще у 1962 році була розроблена програма, що дозволила отримати в різних країнах порівнянні данні про розповсюдженість артеріальної гіпертензії (АГ) серед різних контингентів обстежених та оцінити вплив різних зовнішніх факторів на відсоток гіпертоніків. Методами статистики також була оцінена роль підвищеного артеріального тиску (АТ) у розвитку ускладнень з боку внутрішніх органів, в першу чергу, з боку серця, мозку та нирок [6].

У багатьох країнах були зроблені спроби з'ясувати залежність захворюваності від умов зовнішнього середовища та різних додаткових факторів, намітити шляхи її зниження. Розпочато та тривають масові обстеження різних груп населення за виробничим, територіальним, національно-етнографічним та іншим принципам [6-7].

Повномасштабні багатоцентрові обстеження хворих показали, що на долю гіпертонії припадає не менш 45 % летальних випадків, які викликані захворюваннями серця, та 51 % випадків смертей, що спричинені інсультом. Згідно світової статистики, серед осіб, хворих на артеріальну гіпертензію, 57 % чоловіків та 47 % жінок працездатного віку отримують інвалідність через ушкодження органів-мішеней, що призводить до ранньої непрацездатності та інвалідизації [5].

Слід зазначити, що багаторічні обстеження хворих та клінічні спостереження дозволили науковцям прослідити закономірності закріплення, або зворотного розвитку гіпертензивних реакцій, фазу становлення первинної гіпертензії, як хвороби, починаючи з ініціальних форм до розгорнутих та ускладнених форм гіпертонічної хвороби. Саме завдяки проведеним масовим обстеженням відкрилися перспективні можливості для співставлення та вивчення динаміці захворюваності на АГ. Але, нажаль, якщо клінічна картина, особливості перебігу та формування ускладнень при АГ дуже добре досліджено, питання її патогенезу, ролі порушення центральної ланки регуляції артеріального тиску, залишається відкритим.

Тому, з огляду на вище відмічену тенденцію захворюваності на гіпертонію, складність її лікування, значні витрати на підтримання життя хворого та збереження його якості, вивчення патогенетичних особливостей механізмів розвитку артеріальної гіпертензії є актуальною проблемою сучасної медицини. Розуміння механізмів формування артеріальної гіпертензії має вагому клінічну та соціальну значущість, тому що розширює уявлення про можливі ускладнення і методи лікування даного захворювання.

1.2 Розповсюдженість артеріальної гіпертензії у світі

На теперішній час артеріальну гіпертензію діагностовано вже в 972 мільйонів людей, до 2025 року прогнозується зростання кількості хворих до 1,56 мільярда [8]. За даними ВООЗ, АГ носить «омолоджуючий» характер, тому як у світі через ускладнення цієї хвороби щорічно біля 8 млн. людей, віком від 18 до 60 років, втрачають працездатність. Більш ніж 17 млн. людей, помирають від ускладнень АГ в віці до 60 років. Після проведеного аналізу розповсюдженості АГ було встановлено, що в країнах з високим рівнем розвитку, кількість летальних випадків через ускладнення АГ не перевищує 4 % від загальної кількості смертей, у той час як у країнах із середнім та низьким рівнем розвитку цей показник сягає 42 % [7].

Також було встановлено, що при своєчасному діагностуванні хвороби, 2/3 всіх летальних випадків можна було б попередити [9]. Саме цей важливий факт, що припускає оборотність процесу формування та прогресування АГ, дозволяє припустити, що своєчасне діагностування та лікування АГ надасть таку можливість. Але для його реалізації необхідно розуміти етіопатогенез даної хвороби, враховуючи всі складні ланки патогенезу АГ.

1.3 Захворюваність на артеріальну гіпертензію в Україні, статистичні та популяційні дослідження, особливості перебігу

За даними офіційної статистики МОЗ в Україні, 32,2 % дорослого населення країни страждає на АГ. Більш того, спостерігається стійке зростання поширеності АГ – більше, ніж удвічі в порівнянні з 1998 роком та на 170 % у порівнянні з 2000 роком. Після проведених епідеміологічних досліджень, стандартизованих за віком, було визначено, що показник поширеності АГ у міській популяції становив 29,6 % як у чоловіків, так і у жінок. У сільській популяції поширеність АГ була вищою та становила 36,3 %, в тому числі серед чоловіків – 37,9 %, серед жінок – 35,1 %. При аналізі структури АГ за рівнем АТ у 50 % хворих була виявлена АГ 1-го ступеня, у кожного третього – АГ 2-го ступеня, у кожного п'ятого – АГ 3-го ступеня. Аналіз структури АГ за рівнями систолічного і діастолічного АТ (САТ і ДАТ) свідчить, що як у сільській, так і в міській популяції, найбільш поширеною формою є змішана АГ, яку реєструють у 2/3 осіб за підвищеним АТ, найменш поширеною є ізольована діастолічна АГ, яка становила 12 % серед міського та 8 % серед сільського населення. У сільській популяції поширеність ізольованої систолічної АГ у 3,6 рази була вище, ніж ізольована діастолічна АГ та на 34 % перевищувала поширеність ізольованої систолічної АГ в міській популяції [10].

Проведені в 2006 році епідеміологічні дослідження показали, що в Україні знають про наявність АГ 81 % міських та 68 % сільських жителів з

підвищеним АТ. Приймають будь-які антигіпертензивні препарати 48 % та 38% хворих, відповідно, а ефективність лікування становить лише 19 % у міській та 8 % в сільській популяціях. За останні 5 років спостерігається зменшення цих показників, тож, ефективність контролю АТ в міській популяції становила менше 15 % [11].

Таким чином, як вже було відмічено раніше, захворюваність на АГ як у світі, так і в Україні не зменшується, а збільшується, тому більш детальне дослідження окремих патогенетичних ланок її формування стає важливим та актуальним для експериментальної медицини.

1.4 Сучасні теорії формування та прогресування артеріальної гіпертензії

На теперішній час існує декілька теорій виникнення АГ.

Першою теорією виникнення АГ була нейрогенна теорія, яку висунув Мясніков А.Л. зі співавторами у 1965 році. Ними був зібраний великий клінічний матеріал, який свідчив про роль психоемоційного «перенавантаження» у порушенні діяльності вищих нервових центрів, що регулюють судинний тонус. За їх ствердженням, перенавантаження та зрив коркових нервових процесів збудження та гальмування призводить до утворення корково-підкоркового комплексу (домінанти збудження) з залученням до нього адренергічних структур заднього гіпоталамусу, ретикулярної формації, що призводить до підвищення тонусу симпатичної нервової системи (СНС). Результатом підвищення тонусу СНС стає дисфункція пресорних центрів головного мозку, яка виникає внаслідок розладу їхньої трофіки [12]. Окрім висунутої гіпотези, про роль психоемоційного «перенавантаження» у формуванні АГ було отримано експериментальне підтвердження, яке довело, що обмеження кровопостачання та ішемія головного мозку призводять до підвищення АТ [13, 14].

На наступному етапі було необхідно з'ясувати основні причини, що призводять до підвищення тонуусу СНС. Вони виявилися дуже різноманітними. Це і психоемоційне перенавантаження, що призводить до збільшення продукції та викиду у внутрішнє середовище організму катехоламінів, через це – спазм судин та порушення трофіки тканин. Це, і порушення центральних механізмів регуляції кровообігу, зміна чутливості барорецепторів, порушення метаболізму норадреналіну у синаптичній щілині. Крім того, це може бути збільшення кількості та (або) підвищення чутливості адренорецепторів на мембрані гладком'язових клітин судин, що підсилює їхню вазоконстрикторну відповідь на дію катехоламінів [15-17].

Враховуючи все вище зазначене, цю теорією сьогодні вважають як одну з провідних у механізмах розвитку АГ [15-19].

У цьому ж 1965 році, іншими дослідниками, на чолі з Dickinson L.M. була сформована подібна теорії психоемоційного «перенавантаження» розвитку АГ, але підґрунтям було те, що ініціативною ланкою розвитку АГ є зменшення загального мозкового кровообігу. Відповідно до цієї теорії, атеросклероз або тривалий спазм магістральних мозкових артерій призводить до дефіциту кровопостачання, внаслідок цього відбувається активація механізмів, спрямованих на нормалізацію мозкового кровообігу, зокрема, активація СНС та, як наслідок, зростання АТ та компенсаторного збільшення припливу крові до мозку [20].

Таким чином, ці дві теорії відображали лише роль порушення, або надмірної активації центральних механізмів регуляції АТ, проте не пояснювали роль периферичних чинників, що впливають на рівень АТ та його регулюють.

Згодом, у 1987 році Постнов Ю.В. та Орлова С.Н. висунули теорію, в якій причиною первинної АГ визнали порушення обміну кальцію. Суть цієї теорії полягала в тому, що у хворих на первинну АГ є генетично обумовлений дефект клітинних мембран, який призводить до порушення трансмембранного переносу моновалентних іонів та накопиченню катіонів

кальцію в цитоплазмі. Наслідком цього стає підвищення вмісту кальцію в нейронах гангліїв, гладком'язових клітинах судин, кардіоміоцитах, що призводить до посилення симпатичних впливів та підвищення чутливості гладком'язових елементів судин до пресорних стимулів [21].

Ще однією теорією розвитку АГ, яка основана на порушенні електролітного балансу, є теорія «переключення нирок», яку висунув Гайтон А. у 1987 році. Основою цієї теорії є експериментальні та клінічні дані, що демонструють розвиток гіпертензії на тлі гіперволіємії, пов'язаної із затримкою натрію та води в організмі. Іншими словами, нирки, які працюють в режимі «перемикання», здійснюють достатню екскрецію води і натрію лише при підвищеному рівні АТ. Таким чином, дана теорія розглядається як стійка компенсаторна реакція до збільшеного об'єму циркулюючої крові та підвищеного АТ [22-23].

Одним з фундаментальних відкриттів останніх років є визначення ролі дисфункції ендотелію в розвитку серцево-судинної патології та патогенезі АГ, зокрема. Під ендотеліальною дисфункцією сьогодні розуміють втрату ендотелієм здатності регулювати тонус та товщину судин, керувати процесами коагуляції та фібринолізу, надавати протизапальну дію [24-25]. У певних ситуаціях – при ішемії, гіпоксії, підвищенні АТ, має місце зниження клітинами ендотелію утворення оксиду азоту (NO) та інших факторів вазодилатації та посилення синтезу потужних вазоконстрикторних субстанцій – ендотеліну та тромбоксану [26-29], в результаті чого розвивається дисфункція ендотелію. При цьому відповідно посилюються процеси проліферації, коагуляції та запалення [30].

Більш того, встановлено, що найважливішим фактором, який призводить до ендотеліальної дисфункції, є хронічна активація ренін-ангіотензин-альдостеронової системи, яка реалізує свої впливи за допомогою головного ефекторного гормону ангіотензину II [31-32].

Таким чином, існуючі патогенетичні теорії розвитку АГ, за суттю, пояснюють неоднорідність природи та різноманітність клінічних форм цього

захворювання. Слід також відзначити, що до сучасних уявлень, патогенез АГ багатофакторний та є результатом взаємодії спадкових чинників, що сприяють розвитку захворювання, та різних зовнішніх впливів, що реалізують таку можливість [33-34].

Необхідно відмітити, що незважаючи на численні дослідження, патогенетичні ланки формування АГ і сьогодні лишаються до кінця не вивченими.

1.5 Особливості виникнення та перебігу артеріальної гіпертензії в залежності від патогенетичних механізмів формування та розвитку

АГ вже багато років – з часу винаходу приладів для реєстрації артеріального тиску – знаходиться у центрі уваги багатьох дослідників.

Масова захворюваність на гіпертонічну хворобу, тяжкі її наслідки, що уражують найбільш діяльну, творчу частину людства, надали історії вивчення цього патологічного стану особливого драматизму.

Але зусилля багатьох вчених, в різний час та в різних країнах, що працювали над рішенням цієї проблеми, не пройшли марно. Сьогодні вже достатньо детально вивчені варіанти виникнення гіпертонії та розроблені шляхи її діагностики. Встановлено, що АГ за етіологією та патогенезом – це неоднорідне захворювання. Окрім есенціальної АГ, або гіпертонічної хвороби, сьогодні лікарі виділяють велику групу симптоматичних гіпертензій, що розглядаються як форми хронічного, або рецидивуючого підвищення АТ, в основі якого лежить процес з боку патологічно зміненого органу та/або порушення тих чи інших окремих механізмів, що впливають на стан кровообігу [6]. У сформованій класифікації симптоматичних АГ виділяють велику кількість факторів, що сприяють її виникненню, але серед них можна виділити дві основні, які або самостійно, або у комплексі із іншими порушеннями, стають головними чинниками стійкого підвищення АТ – це нейрогенні порушення та ендокринні розлади [6].

1.5.1 Нейрогенна артеріальна гіпертензія, сучасні теорії формування та патогенетичні механізми

За даними епідеміологічних досліджень, нейрогенна АГ становить 10% усіх діагностованих випадків захворювання. При цьому до 5% виявленої нейрогенної АГ становлять особи до 18 років [35-36].

Згідно теорії нейрогенної АГ, висунутої Лангом та Мясніковим, «нервове перенавантаження» призводить до порушення трофіки певних мозкових структур, які регулюють АТ. Про це свідчать часті випадки розвитку первинної АГ у людей «стресових» професій. Особливе значення при цьому мають негативні емоції, зокрема емоції, які не знайшли «виходу» у руховому акті, коли вся сила їхнього патогенного впливу обрушується на систему кровообігу. На цій підставі Г.Ф. Ланг назвав гіпертонічну хворобу «хворобою невідреагованих емоцій». Безпосередній механізм підвищення АТ пов'язаний з виникненням вогнища застійного збудження вегетативних центрів головного мозку, в першу чергу, судинного центру [6, 12-19].

Стрес викликає активацію гіпофізарно-надниркової та симпатoadреналової систем із подальшим включенням пресорного механізму ренін-ангіотензин-альдостеронової системи (РААС). Це призводить до збільшення серцевого викиду при незмінній або злегка зниженій величині загального периферичного опору судин (ЗПОС) [6, 12-19].

Розглянуті процеси формуються на першій стадії гіпертонічної хвороби, яка називається транзиторною, та клінічно характеризується нетривалими епізодами підвищення АТ. На другій стадії гіпертонічної хвороби збільшення АТ та місцевого кровообігу призводить до збільшення судинного тонуусу і генералізованого спазму артеріол, що призводить до підвищення ЗПОС, спрямованого на приведення у відповідність місцевого кровообігу до потреби в ньому тканин [6, 12-19].

У формуванні стабільного підвищення тону судин мають значення «патологічні кола», які формуються на цій стадії: барорецепторне, ниркове (за участю юстагломерулярного апарату (ЮГА), гіпофізарно-надниркового та судинного (підвищення чутливості стінки судин до катехоламінів) [6, 12-19, 35-36].

У результаті підвищення АТ розвивається парабіоз барорецепторів судин, що призводить до зниження гальмівного контролю над нейронами судинного центру. Це все призводить до підвищення тону судин, і, як наслідок, АТ підвищується ще сильніше. Спазм судин призводить до гіпоксії ЮГА нирок, що в свою чергу сприяє активації РААС. Внаслідок спазму судин виникає ішемія аденогіпофізу, відповіддю на яку стає секреція адренкортикотропного гормону (АКТГ), що, в свою чергу, призводить до підвищення вмісту в крові гормонів кори надниркових залоз мінерало- та глюкокортикоїдів. Саме ці складні механізми, які замикаються у декількох «порочних» колах, сприяють підвищенню тону судин на тривалий час [6, 37].

Не менш важливим механізмом тривалого підвищення АТ є симпатикотонія. За неї відбувається підвищення чутливості стінки судин до катехоламінів, тому навіть невеликі дози адреналіну надають виражений вазоконстрикторний ефект [15,19].

Враховуючи вище сказане, можна зробити висновок, що у розвитку нейрогенної АГ визначальну роль відіграють зміни нейрогуморальної регуляції судинного тону, сформована симпатикотонія та комплекс гормональних змін.

1.5.2 Ендокринна, вторинно-асоційована артеріальна гіпертензія, сучасні теорії формування та патогенетичні механізми

На долю ендокринних АГ припадає від 5 до 25% усіх діагностованих АГ [5-7, 38].

Велике значення в патогенезі ендокринних форм АГ має гіперфункція коркового шару надниркових залоз на тлі різних клініко-морфологічних форм захворювань різної етіології. У більшості випадків спостерігається розвиток тяжкої АГ, часто резистентної до антигіпертензивної терапії. Перше місце серед цієї патології посідає первинний гіперальдостеронізм (ПГА), який призводить у 5-10 % випадків до неускладненої АГ, та в 7-20 % випадків до стійкої АГ [39]. Поширеність ПГА однакова серед чоловіків і жінок, середній вік дебюту захворювання становить 40-50 років. ПГА характеризується автономною секрецією альдостерону в клубочковій зоні надниркових залоз за контролю РААС, іонів калію, АКТГ, натрійуретичного гормону та дофаміну. У нормі підвищення рівня калію в крові викликає посилення секреції альдостерону, що в свою чергу, збільшує екскрецію калію. Відомо, що альдостерон підвищує АГ шляхом збільшення затримки натрію в нирках. Останні дослідження показали вплив альдостерону на центральну нервову систему, який проявляється збільшенням тонуусу СНС. Також альдостерон впливає на стінку судин, що приводить до вазоконстрикції та, як наслідок, розвитку гіпертензії [39].

Серед причин ПГА виділяють аденому надниркової залози, одно- або двосторонню гіперплазію надниркових залоз, у рідкісних випадках – сімейний гіперальдостеронізм [39].

Наступною патологією надниркових залоз є гіперкортицизм, який розвивається через підвищену секрецію глюкокортикоїдів. Гіперкортицизм призводить до розвитку АГ у 70-85 % пацієнтів старше 18 років та у 50-78 % пацієнтів молодше 18 років з ендегенним гіперкортицизмом [40-43]. Виділяють АКТГ-залежні та АКТГ-незалежні ендегенні форми гіперкортицизму. АКТГ-залежні форми ендегенного гіперкортицизму виявляються в 85% випадків [40-43].

АКТГ-залежний ендегенний гіперкортицизм, або хвороба Іценко-Кушинга, це захворювання, обумовлене пухлиною гіпофіза або гіперплазією клітин аденогіпофіза, які секретують АКТГ, або порушенням продукції

кортиколіберину в гіпоталамусі. При цьому значно підвищується секреція АКТГ, а також всіх тропних гормонів гіпофіза. Підвищення секреції АКТГ веде до стимуляції стероїдогенезу в корі надниркових залоз і розвитку гіперплазії кори надниркових залоз [44].

АКТГ-незалежна двостороння мікронодулярна гіперплазія надниркових залоз зустрічається в дітей і осіб молодого віку. Мікронодулярна гіперплазія надниркових залоз відрізняється значною функціональною активністю з автономною гіперсекрецією кортизолу. АКТГ-незалежна двостороння макронодулярна гіперплазія надниркових залоз зустрічається рідко. Найбільш частою причиною є наявність в надниркових залозах рецепторів до гастроінтестинального поліпептиду. Секреція цього поліпептиду клітинами шлунково-кишкового тракту підвищується після прийому їжі, що стимулює секрецію глюкокортикоїдів в надниркових залозах, тобто розвивається пов'язаний з прийомом їжі гіперкортицизм [45].

Основним патогенетичним механізмом розвитку АГ при ендогенному гіперкортицизмі є підвищення рівня глюкокортикоїдів в крові, внаслідок чого збільшується продукція ангіотензиногену в печінці [46], зменшується продукція простагландинів за рахунок інгібування фосфоліпази А та збільшується інсулінорезистентність [47-48], також відзначається підвищення симпатичної активності. Надмірний рівень глюкокортикоїдів впливає на мінералокортикоїдні рецептори нирок за рахунок гіперактивації 11 β -гидрокси-стероїд-дегідрогенази – ферменту, що каталізує перетворення кортизолу в кортизон [49], що веде до підвищення концентрації натрію та затримки води. Існують дані, що гіперкортицизм призводить до зниження активності вазодепресорних механізмів, особливо ендотеліального оксиду азоту [49].

При гіперкортицизмі АГ носить постійний характер з тенденцією до поступового зростання рівня АТ незалежно від етіології захворювання [41-42]. При тривалій гіперпродукції глюкокортикоїдів в міокарді розвиваються функціональні та структурні зміни, а саме виражена гіпертрофія міокарда

лівого шлуночка, електролітно-стероїдна кардіопатія, дилатаційна кардіоміопатія, зниження скорочувальної здатності міокарда.

1.6 Сучасні експериментальні дослідження патогенетичних механізмів формування артеріальної гіпертензії

Необхідність розробок та використання експериментальних моделей АГ сьогодні актуальна не менше, чим 50 років тому. Це пов'язано із тим, що незалежно від етіології захворювання, сам гіпертензивний синдром стає головним патогенетичним фактором подальшого розвитку хвороби, який, частіше, визначає долю хворого. Більш того, летальність та розвиток тяжких ускладнень, таких як судинні ураження головного мозку, інфаркт міокарду, недостатність кровообігу та багато інших, залежать не тільки від рівня АТ, свій внесок вносять саме патогенетичні особливості формування хвороби, які залежать від етіологічного чиннику. До того ж, незважаючи на однотипний основний симптом – підвищення АТ, розвиток хвороби, особливості перебігу, ускладнень та важкість безпосередньо залежать від етіології та патогенезу АГ. Саме тому для більш ретельного вивчення патогенезу АГ, були розроблені наступні моделі АГ:

1.6.1 Щури лінії SHR, які відповідають есенціальній артеріальній гіпертензії людини

Щури зі спонтанною АГ (SHR) були виведені шляхом близькоспоріднених схрещувань щурів лінії Вістар із тваринами з розвиненою АГ. Також були виведені щури лінії Вістар-Кіото (WKY), які служили групою контролю (Окамото і Аокі 1963). У щурів лінії SHR АГ розвивається приблизно у 4-6 тижневому віці без фізіологічного, фармакологічного або хірургічного втручання [50-51].

Дослідження *in vivo* показали, що на ранніх стадіях АГ щури лінії SHR мають підвищений серцевий викид із нормальним загальним периферичним опором, але у міру розвитку АГ у тварин лінії SHR серцевий викид повертається до нормальних значень, в той час як гіпертрофований м'язовий шар кровоносних судин призводить до збільшення ЗПОС. Також прогресивно розвиваються (у віці 6-24 місяці) структурні зміни в серці, які пов'язані з прогресуючою гіпертрофією міокарду [52].

Гіпертрофія м'язового шару судин призводить до підвищення судинного опору, що в свою чергу, призводить до підвищення швидкості току крові в пристінковому пулі. Через це кровоносні судини стають менш чутливими до гуморальних факторів регуляції судинного тонусу. За таких обставин є ризик розвитку атеросклеротичних бляшок, і як наслідок, можуть виникати такі ускладнення, як тромбоз, крововилив у мозок, нефросклероз та ураження міокарда [53].

Саме через ці механізми у щурів лінії SHR частота виникнення спонтанного інсульту досягає 80% у самців та 60% у самок з поширеним церебральним атеросклерозом [54]. За рахунок високого АТ, щури лінії SHR схильні до загибелі від інсульту, що є яскравим прикладом цереброваскулярних уражень, які є результатом АГ, тому цю лінію щурів найбільш часто використовують як модель спонтанного інсульту та розглядають як унікальну, на якій профілактика інсульту може бути вивчена експериментально.

1.6.2 Модель ниркової артеріальної гіпертензії

З 1934 року, коли Goldblatt L.G. та його колеги викликали підвищення АТ шляхом часткового звуження ниркової артерії собаки, було успішно затверджено багато ниркових моделей АГ. Техніка Голдблатта складається зі звуження однієї або обох ниркових артерій за допомогою невеликого регульованого срібного затиску [55]. Експериментальна нирково-індукована

АГ включає в себе АГ «дві нирки і один затискач» (2К1С; звуження однієї ниркової артерії, при цьому контралатеральна нирка залишається інтактною), (1К1С; одна ниркова артерія звужена та контралатеральна нирка видалена) та «дві нирки і два затискача»(2К2С; констрикція аорти або обох ниркових артерій) [56].

Оскільки в моделі 2К1С затискач недостатньо серйозний, щоб викликати ішемію, гіпертонія індукується одностороннім стенозом ниркової артерії. Проте зниження ниркового перфузійного тиску стимулює збільшення синтезу реніну та ангіотензину II (АГ II) через його прямі судинні ефекти, різко збільшує загальний периферичний опір що призводить до підвищення АТ, а також впливає майже на кожну систему органів [57].

Звуження ниркової артерії разом з контралатеральною нефректомією призводить до АГ. Ця гіпертонічна модель, як правило, вважається залежною від концентрації натрію та об'єму рідини та є ідеальною моделлю для вивчення ролі збільшення об'єму крові у розвитку АГ, при цьому через відсутність другої нормальної нирки немає компенсаторного збільшення виділення натрію та води [57].

Коли аорта або обидві ниркові артерії звужені, настає важка ниркова ішемія, викликана обмеженням кровообігу у останніх. В свою чергу, ниркова ішемія призводить до активації ренін-ангіотензин альдостеронової системи та підвищення тонуусу СНС, що супроводжується підвищенням рівня вазопресину у плазмі крові, призводячи до підвищення АТ [57].

Модель АГ 2К2С характеризується високою частотою спонтанного інсульту та може використовуватися, як і модель SHR, у вивченні патогенезу розвитку інсультів при АГ. Проте, модель 2К2С не залежить від генетичних порушень. Основною причиною інфаркту або інсульту головного мозку у моделі щурів 2К2С є ураження артерій малого калібру або артеріол з тромботичною непрохідністю. Патоморфологічно це може бути схожим на лакунарний інфаркт або інсульт головного мозку людини [57].

1.6.3 ДОКА-модель артеріальної гіпертензії

Модель ДОКА-гіпертензії ініціюють введенням 11-дезоксикортикостерон-ацетату у вигляді щоденних підшкірних ін'єкцій (1-10 міліграм впродовж 30-70 днів) або шляхом імплантації великої кількості (близько 40-50 міліграм) масляного розчину ДОКА під шкіру тварин. Найбільш ефективним є введення ДОКА при додатковому сольовому навантаженні (пиття 1-4 % розчинів кухонної солі). В результаті введення ДОКА може викликати 30-кратне збільшення абсорбції натрію та води в організмі тварини, що призводить до підвищення АТ. Особливістю цієї гіпертензії є пригнічення секреції реніну та зниження його активності у плазмі крові. Ниркові ефекти цієї моделі схожі на гіперальдостеронізм людини [58]. Крім того, спостерігається збільшення утворення активних форм кисню, що, в свою чергу, призводить до оксидативного стресу [59].

ДОКА модель характеризується швидким розвитком АГ, яка призводить до гіпертрофії міокарда та системним ураженням органів-мішеней. Враховуючи стрімку динаміку розвитку АГ та її наслідків, цю модель не можна використовувати для довгострокових досліджень патогенезу АГ. Також, у цієї моделі є ряд недоліків, а саме, висока смертність тварин під час моделювання експерименту, необхідність великих доз лікарського засобу та прийом великої кількості розчину NaCl. Більш того, це не дуже реалістична модель, що відтворює клінічну картину в пацієнтів з гіпертонічною хворобою [60].

1.6.4 Модель артеріальної гіпертензії, що викликана психоемоційними перенавантаженнями

Існують данні, що підвищення АТ у результаті повторного впливу стресових ситуацій може призвести до стану постійної гіпертензії [61].

Окрім порушення нервової регуляції, сформованої симпатикотонії та «центрів збудження», доведена роль оксидативного стресу, у результаті якого виникає накопичення в тканинах вільних радикалів. Неспроможність антиоксидантних систем клітин сприяє розвитку вільного перекислового окислення ліпідів мембран різних клітин, особливо нейронів головного мозку та ендотелію судин, що призводить до порушення їх функцій [62].

Пошкодження мембран нейронів лімбіко-ретікулярної та гіпоталамо-гіпофізарної систем призводить до зниження їхньої чутливості до депресорних нейрогормонів, що сприяє формуванню "застійного" емоційного збудження, наслідком чого стає стійке порушення механізмів регуляції АГ [63].

Так звана рефлексогенна АГ розвивається внаслідок пошкодження мембран ендотеліоцитів, що призводить до заміщення їх сполучною тканиною. Результатом цього процесу є зменшення еластичності судин, а од же, неможливість функціонування такого негайного механізму регуляції АГ, як барорефлекс. До того ж, зі зменшенням кількості ендотеліоцитів зменшується і кількість генерованого ними оксиду азоту, що призводить до підвищення загального опору судин і, як наслідок, розвитку АГ [64-65].

Для моделювання «застійної» АГ рядом дослідників були застосовані різні види стресу, такі як емоційні стимули, психосоціальний стрес, стрес іммобілізації, позбавлення їжі та електричні стимули, шум повітряного струменя, миготливі вогні, холод і взаємодія членів соціальної групи у змаганні за їжу і воду. Проте незалежно від чинника в усіх експериментальних групах розвивалась стійка АГ [66-71].

Рефлексогенну АГ моделюють за рахунок денервації каротидних синусів та дуги аорти, накладенням навколо каротидних синусів пластмасових або металевих футлярів, що перешкоджають розтягуванню біфуркацій сонних артерій. Метою всіх втручань є зменшення депресорних впливів з барорецепторних зон [72].

1.7 Сучасні уявлення про механізми регуляції артеріального тиску та їх порушення

У даний час існує велика кількість доказів посилення симпатичної іннервації серця і судин практично в усіх моделях експериментальної артеріальної гіпертензії. Так, доведено, що неонатальна симпатикотомія у щурів лінії SHR затримує розвиток АГ. У тварин лінії SHR електрична активність симпатичних нервів, на відміну від нормотензивних щурів, вище, при чому посилення симпатичної активності спостерігається паралельно зі збільшенням АТ [73]. Авторами також відзначається, що штучне збільшення АТ призводило до незначного зменшення симпатичної активності. Coote і Sato в своїх дослідженнях довели, що у щурів лінії SHR має місце ослаблення барорецепторного гальмування електричної активності у СНС. Також ними було встановлено, що у щурів цієї лінії підвищена концентрація адреналіну і його попередників [73].

Продовжуючи дослідження в даному напрямку, Чернов М.В. з колегами, визначили, що у щурів з ДОКА-сольовою гіпертензією і у щурів з вазоренальною гіпертензією відмічається збільшена симпатична активність. Також існують роботи, в яких показано, що у щурів лінії SHR частота розряду нейронів рostrальної і вентролатеральної частини довгастого мозку, які віддають низхідні проєкції до прегангліонарних симпатичних нейронів спинного мозку, вище, ніж у нормотензивних щурів. На цьому підґрунті, авторами було висловлено припущення, що збільшення частоти розрядів вище зазначених структур призводить до збільшення бульбарного та сомато-симпатичного рефлексу [74,75].

Таким чином, якщо сам факт підвищення активності СНС, доведений багатьма авторами, і не викликає сумнівів, то механізм розвитку підвищення вивчений недостатньо.

1.7.1 Роль центральних механізмів регуляції артеріального тиску у формуванні артеріальної гіпертензії. Пресорні та депресорні системи регуляції артеріального тиску, їхній вплив на гіпоталамічні регуляторні центри

У своїх роботах ряд дослідників представили результати власних дослідів з локальним електричним подразненням різних відділів гіпоталамуса собак і мавп. Подразнення основи мозку між зоровим трактом та окоруховим нервом латеральніше воронки викликало розширення зіниці і очної щілини, а також призводило до змін серцевої діяльності, підвищення кров'яного тиску, салівацію, потовиділення, гальмування рухової діяльності травного тракту. Видалення кори великих півкуль за 6-12 тижнів до експерименту, а також всіх частин центральної нервової системи, розташованих до переду від гіпоталамуса, не перешкоджало наступу ефектів подразнення гіпоталамуса. Видалення надниркових залоз і гіпофіза також не призвело до змін ефектів подразнення гіпоталамуса. Проте перетин спинного мозку у шийному відділі усував всі ефекти подразнення гіпоталамічної області. Після перерізання шийних симпатичних нервів явища з боку очей (розширення зіниці і очної щілини) при подразненні гіпоталамуса вже не спостерігалися [76-77].

Вегетативні прояви носили характер, властивий впливу симпатичних нервів. На підставі своїх дослідів дослідники розглядають гіпоталамус як центр вегетативної, зокрема, симпатичної іннервації [77].

Ці перші експериментальні докази регуляції гіпоталамусом вегетативних функцій були підтверджені пізніше іншими авторами різними методиками, у тому числі, подразненням і вимиканням окремих частин гіпоталамуса у різних тварин із застосуванням для точної локалізації стереотаксичного апарату. Ranson M. зі співробітниками, використавши методику подразнення електродами, введеними за допомогою стереотаксичного апарату Хорслі-Кларка, отримали експериментальні дані про регуляцію гіпоталамусом різних вегетативних функцій, а саме:

терморегуляції, водного обміну, серцевого ритму, сну. При локалізації подразнюючих електродів у латеральній частині гіпоталамуса спостерігалися симпатичні ефекти: розширення зіниць і очних щілин підвищення кров'яного тиску. Підвищення кров'яного тиску і було використано цією школою як показник для визначення проєкцій, що відходять від гіпоталамуса до симпатичних нервів. Виконуючи перетин стовбура мозку на різних рівнях і отримуючи збереження або зникнення пресорної реакції при подразненні частин нижче перетину, дослідники простежили, таким чином, проєкції симпатичних волокон від гіпоталамуса до бічних стовпів спинного мозку. Ефекти, отримані дослідниками при подразненні гіпоталамуса, не можна пояснити подразненням медіального пучка переднього мозку, що там проходить (*fasciculus medialis prosencephali*), тому що при подразненні преоптичної області, де також проходять волокна цього пучка, не відмічалось вище описаних явищ при подразненні гіпоталамуса [77].

Згодом, Huang С. в дослідях на собаках, голова яких була позбавлена нервових зв'язків з тулубом і зберігала тільки судинний зв'язок, подразнював різні відділи гіпоталамуса, вимірюючи АТ стегнової артерії [78]. Поступове тривале підвищення АТ автор спостерігав при подразненні супраоптичного, супрахіазматичного регіону, антеролатеральної частини, області мамілярних тіл і задньої частини сірого бугра. Після гіпофізектомії або зруйнування ніжки гіпофіза подразнення зазначених відділів гіпоталамуса залишалося безрезультатним. У тварин з нормальним нервовим та судинним зв'язком голови з тулубом подразнення вище зазначених частин гіпоталамуса викликало швидке і нетривале підвищення АТ, при цьому гіпофізектомія не завадила розвитку швидкого підвищення АТ [78].

Бронко зі співавторами у дослідях на котах за допомогою стереотаксичного апарату вводили електроди у супраоптичну область гіпоталамуса, латерально від середньої лінії, та при її подразненні реєстрували АТ і електричну активність (ЕА) – імпульсацію в одному або невеликій групі симпатичних волокон, що йдуть до серця і судин.

Подразнення повторними 3-5 імпульсів в 1 секунду розрядами конденсатора призводило до швидкого (через 0,1 секунди) збільшення імпульсації в серцевих і судинних нервах та через 1-2 секунди – до підвищення АТ. Після припинення подразнень гіпоталамуса швидко зникла і імпульсація у нервах, іноді гальмувалася і спонтанна їхня імпульсація, проте АТ ще деякий час залишався підвищеним. Припинення імпульсацій по симпатичних нервах автори пояснювали її гальмуванням імпульсами з аортального синусу, у відповідь на підвищений АТ, так званим «буферним рефлексом». Такий само ефект, гальмування імпульсацій у нервових волокнах, автори отримували і при механічному розтягуванні синусів. Це явище є доказом переключення гіпоталамічних симпатичних шляхів у довгастому мозку. При більш сильному подразненні гіпоталамуса підвищення АТ було не в змозі загальмувати імпульсацію у нервах. Залежно від частоти подразнення, автори спостерігали різний ефект: то підвищення АТ – при більш частому ритмі подразнення, то його зниження – при більш рідкісному ритмі подразнення одного і того ж місця гіпоталамуса. Упродовж дослідження, Беррі зі співавторами також показали, що подразнення одного й того ж регіону гіпоталамусу призводить до різних ефектів, так, подразнення з частотою 5 імпульсів у секунду призводило до підвищення АТ, а при частоті менше 5 імпульсів у секунду - до його зменшення [79-80].

Інші дослідники в гострих дослідах на котах під пентобарбіталовим і ефірним наркозом спостерігали різний ефект на подразнення переднього і заднього гіпоталамуса зануреними електродами за Несс Е. за результатами запису електрокардіограми (ЕКГ) і вимірювання АТ. Подразнення переднелатеральних частин гіпоталамуса призводило до падіння АТ і уповільнення серцевого ритму. Після ваготомії цих змін не було. Під час подразнення заднього гіпоталамуса наступало значне підвищення кров'яного тиску, а з боку серця спостерігалися шлуночкові екстрасистоли, зміна зубця Т, при цьому також змінювався серцевий ритм – відбувалося або його прискорення, або його уповільнення.

Існують роботи, в яких показано двохфазну зміну АТ в щурів при подразненні області заднього гіпоталамуса, частіше латеральних ядер: початкова фаза – короткочасне підвищення АТ до 5 хвилин, та друга фаза, тривалістю від 5 до 35 хв. Друга фаза підвищення АТ була відсутня при руйнуванні інфундібулярної частини нейрогіпофізу. Це дає підставу вважати, що послідовне підвищення АТ, експериментально зафіксоване авторами, було спричинено вазопресином [82].

Смирнова Н.П. і Володін В.М. у гострих дослідах на котах під хлоралозно-уретановим наркозом досліджували тонус коронарних судин методом резістографії при подразненні різних відділів гіпоталамуса (супраоптичного, супрахіазматичного, вентромедіального ядер). Ефект подразнення гіпоталамуса зберігався після виключення іннервації серця (вплив фармакологічних речовин, перетин спинного і серединного мозку). На підставі цього, автори дійшли висновку, що зафіксований ними вплив гіпоталамуса на тонус коронарних судин гормонального походження, а саме, ефект гормону вазопресину [83].

Sherrer R.L. в дослідах на щурах і котах під нембуталовим і уретановим наркозом подразнював через стереотаксично вставлені біполярні електроди зони гіпоталамуса, відомі як пресорні, так і депресорні зони, і спостерігав два типи відповіді АТ короткої тривалості: початкова відповідь – підвищення АТ, змінювалося його зниженням, або навпаки – початковий ефект був у вигляді зниження АТ, яке потім змінювалося його підвищенням. Та чи інша відповідь залежала від вихідного рівня АТ і наркозу. У щурів протилежно спрямовані зміни АТ можуть бути викликані змінами як частоти, так і амплітуди подразника. Подразнення гіпоталамуса може викликати тимчасову нестабільність АТ (вазомоторні хвилі), особливо часто автор спостерігав це на тлі підвищеного АТ [84].

Bitty E.A. і співавтори описали екстрасистолічну аритмію при подразненні задньої частини латеральної області III шлуночка мозку у котів, зміни серцевого ритму у вигляді брадикардії або навіть зупинки серця у

тварин. Тимчасом як при подразненні області заднього гіпоталамуса ними була відмічена тахікардія у котів – синусна або вентрикулярна [85].

1.8 Аркуатне ядро гіпоталамусу, функціональні та анатомічні особливості при експериментальних патологіях

АрЯ гіпоталамусу розташоване в вентральній частині медіобазального гіпоталамусу ростро-каудально від супрахізмального ядра до мамілярних тіл та утворено, насамперед, поліморфними дрібно-клітинними нейронами [86].

Окрім нейронів, великий відсоток тканини АрЯ складається з таніцитів, прототипів радіальних гліальних клітин. Таніцити розташовані як в бічних стінках, так і на дні третього шлуночка, і їх основні процеси відбуваються вентрально та на поверхні кровоносних судин. Таніцити залучені до транспорту гормонів спинномозковою рідиною в капіляри гіпофізарної системи і від гіпоталамічних нейронів до спинномозкової рідини [87]. Ця функція може включати процес трансцитозу, в якому речовини піднімаються вгору таніцитом шляхом ендоцитозу та переміщуються в протилежному напрямку, де речовини вивільняються через плазмову мембрану шляхом екзоцитозу [88]. Особливістю цього ядра є тісна близькість до серединного підвищення, куди, насамперед, спрямовані проєкції його нейронів [89]. Крім того, нейрони АрЯ мають широкі зв'язки всередині самого ядра [90-92], а також дають еферентні проєкції до паравентрекулярного ядра (ПВЯ) [89], вентромедіального ядра (ВМЯ) [93-94], дорсомедіального ядра (ДМЯ) [95]. У свою чергу, нейрони АрЯ отримують аферентні проєкції від ПВЯ [96].

У АрЯ розрізняють три суб'ядра: дорсомедіальне (дм-АрЯ), вентромедіальне (вм-АрЯ) та вентролатеральне (вл-АрЯ) [97]. В основу поділу АрЯ на суб'ядра покладені не тільки топографія нейронів, а й характер нейрональних зв'язків та спектр синтезованих в них нейропептидів. Так,

нейрони дм-АрЯ синтезують дофамін, γ -аміномасляну кислоту (ГАМК), галанін та нейротензин; у вм-АрЯ ідентифіковані нейрони, які синтезують соматостатин; в вл-АрЯ виявлені: соматоліберін, галанін, ГАМК, ацетілхолін, тіроліберін, дінорфін, нейротензин, проопіомеланокортін, субстанція P, адрено-кортикотропний гормон (АКТГ), β -ендорфін, α -меланоцит стимулюючий гормон (α -МСГ), γ -меланоцит стимулюючий гормон (γ -МСГ.) Також у всіх трьох суб'ядрах АрЯ були ідентифіковані нейропептид Y (NPY) -синтезуючі нейрони. В області АрЯ проходить велика кількість нервових волокон від ПВЯ до серединного підвищення, що містять вазопресин, кортиколіберин, холецистокінін, соматостатин, NPY, галанін [97-98].

Слід відмітити, що АрЯ має мультирецепторний апарат. Так, у ньому ідентифіковані рецептори до інсуліну, лептину та глюкокортикоїдним гормонам, що передбачає участь даної структури в процесах гіпоталамічної регуляції глюкозного і енергетичного гомеостазу. Крім того, нейрони АрЯ містять рецептори до естрадіолу, що свідчить про їхню участь у регуляції репродуктивної функції та статевого диференціювання мозку [99]. За допомогою трасерного методу дослідження було встановлено наявність проєкцій від АрЯ до nucleus tractus solitarius (NTS), каудальна вентролатеральна область (КВЛМ), ростральна вентролатеральна область (РВЛМ), інтермедіолатеральний стовп спинного мозку (ІМЛ) та ПВЯ, які, як вже добре відомо, приймають участь у регуляції АТ [100].

Така складна будова АрЯ наштовхнула деяких дослідників на гіпотезу про те, що воно може відігравати ключову роль в інтеграції емоційної, вегетативної та гомеостатичної функцій організму [101-102]. Також АрЯ відведена роль обробки сенсорної інформації, особливо від больових рецепторів, з наступною відповіддю з боку ендокринних органів, що забезпечує адекватну відповідь організму на вплив подразнюючих чинників. Під час фізіологічних та психологічних проблем, наприклад, таких як стрес, АрЯ за допомогою аферентної іннервації отримує інформацію зі стовбура мозку про стан вегетативної нервової системи [103-104].

Припускають, що за допомогою аферентної іннервації АрЯ отримує інформацію від лімбічної системи та таламусу. Після отримання інформації від різних відділів нервової системи АрЯ інтегрує та порівнює інформацію з поточним станом ендокринної системи, яка реалізується за допомогою довгих, коротких та ультракоротких петель гормонального зворотного зв'язку. Змінюючи активність нейронів інших структур, які відповідають за підтримання гомеостазу організму, АрЯ здатне регулювати ендокринну систему в цілому. Одночасно з цим, АрЯ передає інформацію про зміни ендокринного статусу в лімбічну систему та таламус, а також може змінювати активність нейронів цих структур [103-104]. Так, наприклад, аферентні проопіломелакортинові (РОМС) нейрони АрЯ виділяють β -ендорфін та α -МСГ у своїх термінальних областях під час стресу або на больові подразники. β -ендорфіни забезпечують аналгезію, що блокує біль, а α -МСГ викликає підвищене збудження та увагу, щоб адекватно реагувати на стресову ситуацію [105].

Окрім впливу АрЯ на АТ, проводилися дослідження його ролі у регуляції роботи серцево-судинної системи, в ході яких було виявлено, що кардіоваскулярні ефекти при стимуляції АрЯ залежать від рівня базального тиску. У разі, якщо АТ знаходиться в межах нормальних значень, то хімічна стимуляція АрЯ викликає депресорний ефект, який реалізується за рахунок активації рецептору $NPY-1$ та ГАМК у ПВЯ. У разі, якщо показники АТ нижче норми, то стимуляція АрЯ призводить до підвищення АТ та симпатичного тону за рахунок активації рецептору меланокортину у ПВЯ [106]. При білатеральній бародеіннервації депресорний ефект змінюється на пресорний. Хімічна стимуляція АрЯ завжди призводить до розвитку тахікардії, незалежно від початкового рівня АТ або частоти серцевих скорочень [105]. Білатеральна ваготонія значно знижує ймовірність розвитку тахікардії, але не впливає на пресорні ефекти від мікроін'єкцій в АрЯ. Це підтверджує той факт, що тахікардія, викликана стимуляцією АрЯ, опосередкована зниженням вагусних впливів на серце. Тим паче, що

тахікардія, викликана стимуляцією АрЯ, після білатеральної ваготонії повністю не зникла, що передбачає наявність опосередкованого симпатичного впливу АрЯ. Виходячи з отриманих даних, можна припустити, що імпульси від барорецепторів можуть відігравати ключову роль в напрямку серцево-судинних ефектів АрЯ [106].

У роботі Rahmouni K. було доведено, що пряма ін'єкція лептину у АрЯ гіпоталамусу призводить до підвищення АТ [107]. Також, рядом дослідників було встановлено, що ефективність регуляції АТ в більшості залежить від тих нейромодуляторів та нейрогормонів, що утворюються або надходять до гіпоталамусу. Найбільш значущі в регуляції АТ серед визначених нейрогормонів – це BNP, β -ендорфін, нейротензин та ангіотензин II. Проте, не менш важливим фактором, що грає суттєву роль у регуляції активності нейронів, є їхній функціональний стан, який залежить від адекватного кровопостачання, іннервації та міжнейрональних взаємин нейронів, що забезпечується за рахунок спроможності мікроциркуляторного русла і функцій нейроглії.

1.8.1 Пептидергічна система аркуатного ядра гіпоталамусу

АрЯ розташоване біля основи гіпоталамусу в безпосередній близькості від серединного підвищення та гіпофіза і тісно пов'язане як нейрональними, так і нейрогемальними зв'язками [86]. Його анатомічна організація вказує на те, що ця структура відіграє важливу нейроендокринну роль, і це припущення було підтверджено результатами ряду експериментів [86-98]. Данні досліджень показують, що АрЯ безпосередньо приймає участь у секреції пролактину і гормону росту, має важливі взаємодії з регуляцією естрального циклу і сексуальної поведінки, статевої диференціації, функції щитоподібної залози, надниркових залоз і реакції на стрес. Існує думка, що організація цієї ділянки гіпоталамусу дозволяє інтегрувати ендокринну та нейронну інформацію і організовувати відповідні поведінкові і ендокринні реакції для адаптації до змінного середовища [86-98].

З появою імуногістохімічного методу, дослідження пептидергічної системи гіпоталамуса перейшло на новий рівень. Так, з використанням даного методу рядом авторів було встановлено, що в АрЯ міститься велика кількість нейротрансмітерів і нейрогормонів, таких як ацетилхолін, дофамін, дінорфін, альфа і бета-меланоцит стимулюючі гормони, бета-ендорфін, енкефаліни, ГАМК, галанін, нейротензин, NPY, пролактин, соматостотін, субстанція Р [108-109]. Така велика кількість пептидів в цій, порівняно невеликій ділянці гіпоталамусу, нашоухнула дослідників на думку, що повинна бути значна колокалізація нейротрансмітерів і нейропептидів в одному і тому ж нейроні. Удосконалення імуногістохімічного методу дослідження з використанням первинних і вторинних антитіл зробило можливим досліджувати нейрони і їх аксони на наявність кількох нейротрансмітерів і нейрогормонів одночасно [110].

Так, за допомогою даного методу Chronwall В. М. встановив, що в АрЯ існують популяції нейронів, які містять одночасно дофамін і нейротензін або дофамін і ГАМК. Так само була встановлена колокалізація між NPY і соматостатином і NPY і агоуті-зв'язаним пептидом. Пізніше були відкриті нейрони, в яких відбувається синтез POMC, і кокаїн-амфетамін-регулюючого транскрипта (CART). POMC є попередником альфа-меланоцит-стимулюючого гормону, бета-ендорфіну і адренкортикотропіну. У АрЯ існують дві окремі субпопуляції нейронів POMC/CART: одна містить ГАМК, а інша містить глутамат [111]. Wamsley E.J у своїй роботі продемонстрував, що нейрони, які містять POMC / CART, знаходяться в тісному взаємозв'язку з нейронами, які містять енкефалін і субстанцію Р, що необхідно для встановлення синаптичних контактів з іншими нейронами [112].

1.8.2 Роль порушення морфо-функціонального стану та особливості пептидергічної системи АрЯ гіпоталамусу при артеріальній гіпертензії

Вже добре відомо, що в патогенезі АГ є цілий комплекс патологічних процесів, а саме: симпатикотонія з порушенням судинного тону, метаболічні порушення, які призводять до ожиріння, інсулінорезистентності та атеросклерозу. Встановлено, що структурою, яка відповідає за підтримку гомеостазу організму, є гіпоталамус [113]. У реалізації цієї функції приймає участь цілий комплекс ядерних структур: паравентрикулярне, супраоптичне, перивентрикулярне, аркуатне та інші ядра [113-114]. Від узгодженості та скоординованості їхньої дії буде залежати ефективність роботи систем організму в умовах, що змінюються, для адекватної відповіді на мінливі умови середовища. Ключовою структурою, яка координує та модулює їх роботу, більшість науковців розглядають аркуатне ядро. Ця функція реалізується завдяки топографічному розташуванню та синтезу в ньому великої кількості нейропептидів, мультирецепторному апарату та великій кількості проєкцій до кори головного мозку, інших ядер гіпоталамусу, надсегментарних та сегментарних структур [115-117].

Так, дослідниками було встановлено зв'язок між АрЯ та ПВЯ та досліджена роль POMC/CART та NPY/AgRP нейронів АрЯ у підтриманні енергетичного балансу. Визначили, що за допомогою таніцитів, лептин та інсулін потрапляють до АрЯ та пригнічують NPY/AgRP нейрони, стимулюють нейрони POMC/CART, що призводить до вивільнення альфа-меланоцит стимулюючого гормону у ПВЯ, активація у ньому рецепторів меланокортину 3 та 4 типу, завдяки чому пригнічується споживання їжі і збільшується витрата енергії [118].

Вважають, що реалізація більшості впливів АрЯ відбувається через ПВЯ. Доведено, що ПВЯ грає важливу роль у центральній регуляції серцево-судинної системи [119]. Наприклад, хімічна стимуляція викликає підвищення АТ і підвищення тону СНС [120-122]. Відомо, що ПВЯ дає велику

кількість проєкцій у ростральну вентролатеральну мозкову пресорну область (РВЛМ) і інтермедіолатеральний стовп спинного мозку (ІМЛ) [123]. Повідомлялося, що розгальмовування і хімічна стимуляція ПВЯ збуджують нейрони РВЛМ [123]. Крім того, порушення нейронів РВЛМ у відповідь на хімічну стимуляцію ПВЯ було опосередковано через глутамат в РВЛМ [124].

Існує дуже мало досліджень, в яких АрЯ було хімічно стимульоване для оцінки його ролі у регуляції серцево-судинної системи [125-126]. Зважаючи на складність хімічної природи різних популяцій нейронів АрЯ, очікуються різні серцево-судинні реакції після хімічної стимуляції АрЯ. Існують роботи, де стимуляція АрЯ шляхом мікроін'єкцій N-метил-D-аспарагінової кислоти (NMDA) викликала підвищення АТ, частоти серцевих скорочень і тонусу СНС [127].

Відомо, що ГАМК, бета-ендорфіни та NPY у великій кількості були ідентифіковані в АрЯ. Визначено, що вони чинять пригнічуючу дію на нейрони [128]. Ґрунтуючись на цій інформації, ряд авторів висловлював думку, що зниження АТ і тонусу СНС може бути викликано хімічною стимуляцією АрЯ, і ці відповіді можуть бути опосередковані через ПВЯ [124-127].

У роботі Hreday було встановлено, що мікроін'єкції NMDA у АрЯ призводили до зниження АТ, проте розвивалася тахікардія. Мікроін'єкції габазину у ПВЯ призводили до зменшення депресорного впливу на мікроін'єкції NMDA у АрЯ, але ніяк не вплинули на розвиток тахікардії [128]. Схожі данні отримали дослідники і при введенні інгібітору рецептору NPY-1 та опіодних рецепторів у ПВЯ. Таким чином, дослідники дійшли висновку, що активація ГАМК, NPY та нейронів, що містять бета-ендорфін, у АрЯ викликає депресорні ефекти через активацію ГАМК-А, NPY₁ та опіодні рецептори у ПВЯ [129].

Отже, АрЯ завдяки своєму топографічному розташуванню та високій швидкості кровообігу є ключовою структурою, яка отримує інформацію від безлічі структур вегетативної та соматичної нервової системи. В ньому

відбувається інтеграція, комутація та «переключення» цієї інформації, що необхідно як для визначення адекватної поведінки організму, так і його ендокринної відповіді для кращої адаптації у постійно мінливому середовищі.

Результати багаточисельних фактів інших науковців демонструють високий рівень складності будови АрЯ, розгалуженість аферентних та еферентних проєкцій робить його ключовою структурою, яка контролює роботу як внутрішньогіпоталамічних ядер, так і інших структур мозку, відповідальних за підтримання гомеостазу організму в цілому. Саме ця значущість аркуатного ядра гіпоталамусу в регуляції чисельних фізіологічних функцій та суперечливість даних про морфо-функціональний стан нейронів, баланс пресорних та депресорних нейропептидів в структурі ядра при АГ потребують проведення цього експериментального дослідження.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дисертаційна робота виконана на базі кафедри патологічної фізіології та навчального медико-лабораторного центру Запорізького державного медичного університету МОЗ України.

2.1. Матеріал дослідження

Для проведення експериментального дослідження, яке було присвячено вивченню патогенетичних механізмів формування та розвитку АГ, визначенню морфо-функціонального стану нейронів АрЯ гіпоталамусу, встановленню особливостей балансу пресорних та депресорних нейропептидів у структурі ядра при різних за етіологією та патогенезом АГ, було обрано за міжнародною класифікацією хвороб (МКБ) дві експериментальні моделі АГ – це первинна (ессенціальна) АГ І10 (на сьогоднішній день признаною її моделлю є лінія щурів SHR, у яких з віком суттєво підвищується та залишається стабільно високим АТ [50-51]), та вторинна АГ по відношенню до ендокринних порушень І15.2 (в експерименті на щурах це індукована ендокринно-сольова АГ, яка формується через хронічно підвищений рівень кортикостероїдів та затримку Na⁺) [31-32].

Дослідження проведені на 32 статевозрілих щурах-самцях лінії Wistar та на 16 статевозрілих щурах-самцях лінії SHR. Тварини, які були використані в експериментах, отримані з розплідника Об'єднання ветеринарної медицини ПП «Біомодельсервіс» міста Києва. Всі дослідження були проведені в осінньо-зимовий період у віварії Запорізького державного медичного університету. Тварини перебували при температурі повітря 20-25 °С, при світловому дні 7-00 – 19-00, з вільним доступом до їжі й води.

Експериментальну частину дослідження виконували в суворій відповідності з національними «Спільними етичними принципами

експериментів на тваринах» (Україна, 2001), погодженими з положенням Ради 2010 / 63EU Європейського парламенту і Ради від 22 вересня 2010 року по захисту тварин, які використовуються в наукових цілях, (Council Directive 2010 / 63EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes). Комісією з питань біоетики Запорізького державного медичного університету МОЗ України (протокол №7 від 08.05.2019) порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено.

Експериментальні тварини були розподілені на три групи з двома підгрупами у кожній (рис. 2.1):

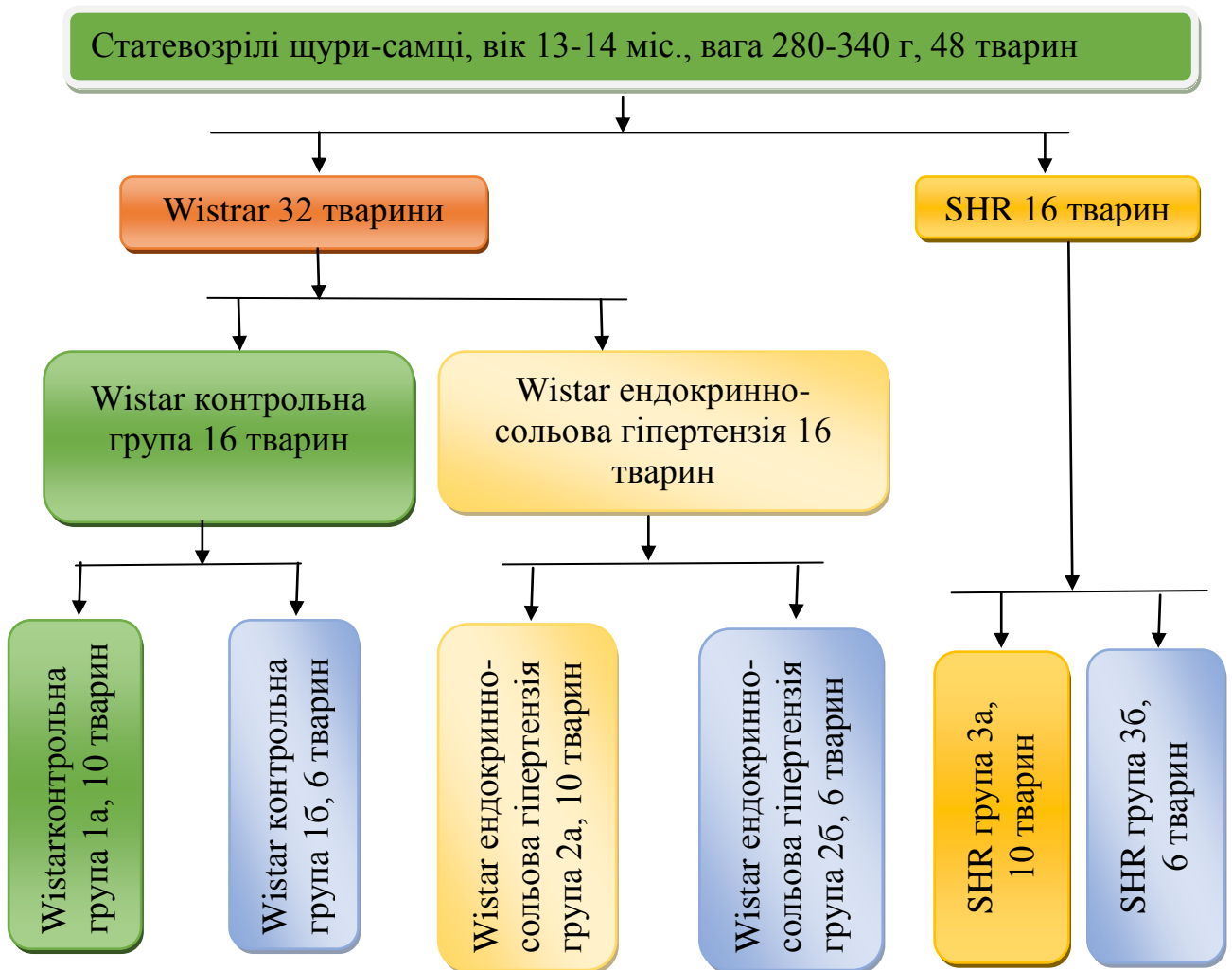


Рисунок 2.1 – Розподіл щурів в експериментальних групах (блок-схема)

Група 1а - контрольна група була сформована з 10 статевозрілих щурів лінії Wistar, які знаходилися на стандартному раціоні, проведено п'ятиразове

вимірювання у них АТ показало стабільні показники протягом усіх досліджень Рс/Рд $110/75 \pm 5$ мм.рт.ст., що дало нам змогу віднести їх до групи нормотензивних тварин.

Група 1б – є додатковою контрольною групою з 6 статевозрілих щурів лінії Wistar, яка сформована для дослідження вмісту в АрЯ гіпоталамусу нейропептидів. Тварини знаходилися на стандартному раціоні, п'ятиразове вимірювання у них АТ показало стабільні показники протягом усіх досліджень Рс/Рд $110/75 \pm 5$ мм.рт.ст. Щурам цієї групи на 28 день дослідження за 48 годин до виведення з експерименту інтрацеребровентрикулярно в латеральний шлуночок мозку вводили 120 мкг колхіцину (SIGMA Chemical, США), розведеного в 20 мкл 0,9 % розчину NaCl [130].

Група 2а – сформована з 10 статевозрілих щурів лінії Wistar, в яких протягом 30 діб моделювали вторинну АГ по відношенню до ендокринних порушень шляхом формування добового дисбалансу кортикостероїдів та сольового навантаження – ендокринно-сольова АГ (ЕСАГ). На початку моделювання АГ у щурів тиск дорівнював $110/75 \pm 5$ мм.рт.ст. Стійке підвищення АТ досягалося на 14 добу $160/100 \pm 10$ мм.рт.ст. та залишалося стабільно високим до кінця моделювання.

Група 2б – додаткова, яка була сформована для дослідження вмісту в АрЯ гіпоталамусу нейропептидів. Складалася з 6 статевозрілих щурів лінії Wistar, в яких протягом 30 діб моделювали вторинну АГ по відношенню до ендокринних порушень шляхом формування добового дисбалансу кортикостероїдів та сольового навантаження – ендокринно-сольова АГ (ЕСАГ). На початку моделювання АГ у щурів тиск дорівнював $110/75 \pm 5$ мм.рт.ст. Стійке підвищення АТ досягалося на 14 добу $160/100 \pm 10$ мм.рт.ст. та залишалося стабільно високим до кінця моделювання. На 28 день дослідження за 48 годин до виведення з експерименту щурам інтрацеребровентрикулярно в латеральний шлуночок

мозку вводили 120 мкг колхіцину (SIGMA Chemical, США), розведеного в 20 мкл 0,9 % розчину NaCl [130].

Група 3а – сформована з 10 статевозрілих щурів лінії SHR, які знаходилися на стандартному раціоні, п'ятиразове вимірювання у них АТ показало стабільно високі показники протягом усіх досліджень, Рс/Рд 165/110±10 мм.рт.ст., що підтвердило розвиток у них спонтанної АГ.

Група 3б – додаткова група, до неї ввійшли 6 статевозрілих щурів лінії SHR для дослідження вмісту в АрЯ гіпоталамусу нейропептидів. Тварини знаходилися на стандартному раціоні, п'ятиразове вимірювання у них АТ показало стабільно високі показники протягом усіх досліджень, Рс/Рд 165/110±10 мм.рт.ст. Щурам цієї групи на 28 день дослідження за 48 годин до виведення з експерименту інтрацеребровентрикулярно в латеральний шлуночок мозку вводили 120 мкг колхіцину (SIGMA Chemical, США), розведеного в 20 мкл 0,9% розчину NaCl [130].

На 30 день моделювання тварин з 18.00 позбавляли їжі і наступного дня з 10.00 виводили з експерименту методом одномоментної декапітації під наркозом (тіопентал натрію 40 мг/кг внутрішньочеревно). Об'єктом дослідження у тварин був гіпоталамус. Для цього негайно, після декапітації тварин, відбирали мозок та розподіляли його на дві частини: для приготування гомогенату та гістохімічних досліджень. Кров збирали у пробірки, попередньо оброблені 10 % розчином Трилону Б (ЕДТА 2,7 %) на 0,9 % розчині NaCl. Для попередження згортання крові розчин Трилону Б додавали до зібраної крові у співвідношенні 1:6.

2.2 Моделювання артеріальних гіпертензій

Зацікавленість АГ обумовлена широкою її розповсюдженістю, частими та важкими ускладненнями, високою летальністю. АГ є основним фактором ризику розвитку серцево-судинних захворювань, таких як інфаркт міокарда, інсульт, серцева недостатність [5-7]. Згодом у людей з АГ виникає ураження

органів-мішеней, а саме кровоносних судин, сітківки ока, нирок, серця, головного мозку [5-7].

З огляду на той важливий факт, що АГ у своєї етіології та патогенезі неоднорідна, має певні особливості розвитку й перебігу процесу, виникає необхідність в експериментальних дослідженнях використовувати не одну модель, а проводити паралельні дослідження двох та більше етіологічних моделей АГ, що найчастіше зустрічаються в популяції. Саме цей підхід дозволить встановити основні загально-біологічні закономірності виникнення хвороби та її хронізації, довести роль кожного з факторів у формуванні патології, визначити ключові патогенетичні особливості, що пов'язані із окремим етіологічним чинником.

На нашу думку, адекватна експериментальна модель АГ - це модель, при якій у лабораторних тварин формується не тільки стійке підвищення АТ, але й розвиваються специфічні ураження органів-мішеней, подібні до змін у людей, що страждають на АГ. При цьому повинна зберігатися висока виживаність тварин. Крім того, необхідно досліджувати саме ті АГ, які найчастіше зустрічаються у популяції, мають складні патогенетичні механізми та формують «порочні кола». Саме тому наш вибір зосередився на двох моделях – це первинна (есенціальна) та вторинна по відношенню до ендокринних порушень.

За даними багатоцентрових рандомізованих досліджень, на частку есенціальної гіпертензії припадає 90 % хворих, вторинної АГ через порушення гормонального балансу - 10 % [5-9, 31-32]. Це потребує більш прискіпливої уваги саме до цих патологій.

2.2.1 Модель первинної есенціальної артеріальної гіпертензії

Вибір щурів лінії SHR в якості моделі первинної АГ був пов'язаний із тим, що розвиток та формування підвищеного АТ у них за механізмами та патогенезом дуже схожі із первинною АГ у людей. Саме через це вона

визнана багатьма вченими світу, як найбільш схожа за патогенезом із есенціальною АГ людини, повторює основні патогенетичні характеристики та особливості клінічного перебігу [50-51].

Так, у щурів лінії SHR, за даними багатьох дослідників, вже на 5 тижні відмічається стійке підвищення АТ, прогресують ураження органів-мішеней, швидко формуються ускладнення (інсульты, інфаркти), що неодноразово було підтверджено результатами розтину тварин [50-53].

Для формування експериментальних груп 2а й 2б і проведення дослідження серед щурів лінії SHR відбирали тварин за результатами багаторазових вимірювань АТ, що коливались у межах від 150/110 мм рт.ст. до 165/110 мм рт.ст. У групи відбирали щурів із АТ, що перевищував 160/100 мм.рт.ст. Після ретельного вимірювання АТ були відібрані 16 тварин та сформовані групи із моделлю есенціальної артеріальної гіпертензії (ЕАГ).

2.2.2 Модель вторинної ендокринно-сольової артеріальної гіпертензії

Відомо, що вторинна АГ по відношенню до ендокринної патології у патогенезі свого формування поєднує багато різноспрямованих механізмів, є результатом комплексного мультифакторіального впливу на організм людини [29-32]. Саме тому, вагомими критеріями вибору застосованої нами ендокринно-сольової моделі АГ (ЕСАГ) було відтворення та поєднання цих факторів, а саме похилий вік, гіпернатріємія, підвищення рівня та порушення добового циркадного ритму кортикостерону, гіперальдостеронізм та, як результат, збільшення ОЦК й стійке підвищення АТ.

Вищеописану симптоматику відтворювали у тварин шляхом довготривалого комплексного впливу, а саме, багаторазового введення преднізолону із альдостероновою активністю, утворення високої концентрації стероїду ввечері та щоденного сольового навантаження.

Методика моделювання вторинної ендокринної артеріальної гіпертензії. Для моделювання вторинної АГ щурам-самцям лінії Wistar віком 13-14 місяців протягом 30 днів два рази на день внутрішньом'язово вводили преднізолон вранці о 7-00 годині у дозі 2 мг/кг та ввечері о 20-00 у дозі 4 мг/кг із одночасним примусовим випоюванням 5 мл сольового розчину (NaCl 2,3 %). На 7-й, 14-й, 21-й та 30-й день вимірювали систолічний АТ методом плетизмографії за допомогою приладу Transonic Animal Research Flowmeter T-106 Series (Transonic Systems Inc., США).

Систолічний АТ до початку моделювання складав $110/75 \pm 5$ мм.рт.ст., на 7-й день – $135/95 \pm 10$ мм.рт.ст. на 14-й, 21-й та 30-й відмічалось стійке підвищення систолічного АТ до $160/100 \pm 10$ мм.рт.ст.

З метою виключення небажаних ефектів внутрішньочеревних ін'єкцій, додатковим 5 тваринам водили за наведеною схемою 1,0 мл ізотонічного розчину. Достовірних змін досліджуваних параметрів, у порівнянні з контрольною групою тварин, не відзначалося.

2.3 Методи дослідження

У щурів всіх експериментальних груп було:

- проведено багаторазове дослідження рівня АТ;
- проаналізовано стан системи монооксиду азоту АрЯ гіпоталамуса шляхом визначення ізоформного профілю ферменту NOS (eNOS, iNOS, nNOS) та експресії їх мРНК, дослідження концентрації нітритів у гомогенатах гіпоталамусу, вмісту нітритів та нітротирозину в плазмі крові;
- встановлено вміст, концентрацію та розповсюдженість у структурі АрЯ гіпоталамусу нейропептидів ангіотензину II, нейротензину, мозкового натрійуретичного пептиду та бета-ендорфіну; проаналізовано особливості балансу пресорних та депресорних нейропептидів у АрЯ.

- визначено морфо-денситометричні параметри ядер нейронів АрЯ гіпоталамусу та проведено структурно-популяційний аналіз нейронів суб'ядер АрЯ;

2.3.1 Методика вимірювання артеріального тиску у щурів

Для вимірювання АТ була застосована система неінвазивного вимірювання кров'яного тиску Blood Pressure Analysis Systems TM BP-2000 Series II (Visitech Systems, USA) із автоматичним контролем температури в іммобілізаційному тунелі, яка складається з комп'ютера із встановленим програмним забезпеченням, та вимірюючих приладів (рис. 2.2).



Рисунок 2.2 – Одночасне вимірювання АТ двом щурам, розміщеним у тунелях системи неінвазивного вимірювання кров'яного тиску Blood Pressure Analysis Systems™ BP-2000 Series II (Visitech Systems, USA) (А). Фіксування результатів багаторазового вимірювання АТ на персональному комп'ютері (В)

Щури розміщувалися у спеціальних «тунелях» - фіксаторах, які знаходились на термостатичній платформі, для забезпечення підтримання температури 37°-38°С, що необхідно для підтримання адекватного кровообігу у хвостовій артерії. Манжет та вимірюючий датчик накладались на хвіст якомога проксимальніше. Середній час вимірювання АТ становив 7 хв, за який система автоматично робила 3-5 попередніх, а потім і контрольних замірів АТ. Завдяки спеціалізованому програмному

забезпеченню в автоматичному режимі фіксувалися ЧСС, систолічний та діастолічний тиск [131].

2.3.2 Комплексний метод дослідження стану системи монооксида азоту АрЯ гіпоталамуса щурів експериментальних груп

Аналіз наукової літератури та результати оригінальних досліджень інших науковців дозволив виділити серед методів визначення стану системи монооксида азоту найбільш інформативні та сучасні [132-133]. Це дозволило дати комплексну характеристику цієї регуляторної системи, враховуючи особливості експресії генів ізоформ, безпосередньо локальний ізоформний профіль та кількісні показники кінцевих метаболітів.

2.3.2.1 Метод визначення ізоформного профілю NOS

Для підготовки біологічного матеріалу для імуно-гістохімічного дослідження негайно після декапітації тварин мозок вилучали і розміщували у фіксуючу суміш фіксатор Буена на 20 годин при температурі 23-25 °С. Після 2-годинного відмивання пікринової кислоти в проточній холодній воді мозок проводили у висхідних концентраціях етанолу від 50 % до 100 %, розчинах етанол/ксилол, ксилол, ксилол/парапласт ($t = +37^{\circ}\text{C}$), на 1 годину розміщували в рідкому парапласті ($t = +56^{\circ}\text{C}$), а потім укладали в парапластові блоки [134].

Для гістологічного дослідження з мозку на ротаційному мікротомі MICROMHR-360 (Microm, Німеччина) виготовляли фронтальні серійні зрізи завтовшки 14 мкм. Перед нанесенням антитіл, гістологічні зрізи депарафінізували та проводили регідратацію у низхідних розчинах етилового спирту (100 %, 96 %, 70 %, 60 %, 50 %) і тричі по 10 хвилин відмивали в 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,4).

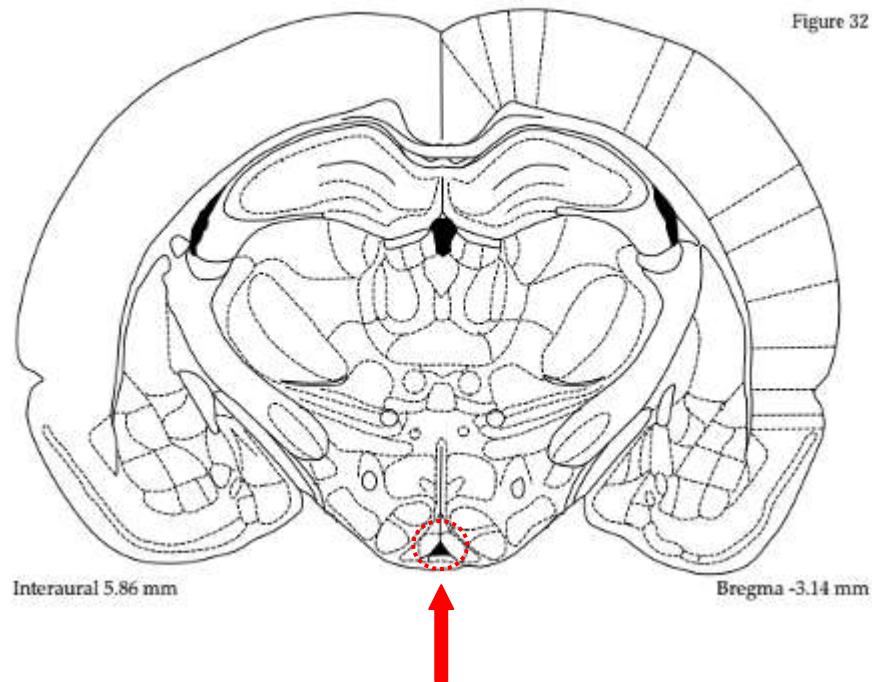
Для дослідження експресії ізоформ синтази оксиду азоту серійні гістологічні зрізи гіпоталамусу розподіляли на 3 групи:

- 1-у групу зрізів інкубували з кролячими IgG до нейрональної синтази оксиду азоту (Santa Cruz Biotechnology, USA) у розведенні 1:200;
- 2-у групу зрізів інкубували з кролячими IgG до ендотеліальної синтази оксиду азоту (Santa Cruz Biotechnology, USA) у розведенні 1:200;
- 3-ю групу зрізів інкубували з мишачими IgG до індукційної синтази оксиду азоту, кон'юговану з FITC (SantaCruzBiotechnology, USA) у розведенні 1:200.

Скельця з нанесеними первинними антитілами тримали у полімерних фіксаторах при ($t = +4^{\circ}\text{C}$, 24 години). Потім тричі по 10 хв. відмивали фосфатним буфером 0,1 М (pH 7.2).

На другому етапі на скельця першої та другої груп наносили вторинні антитіла – мишачій IgG до повної молекули IgG кроля, кон'югованими з FITC (Santa Cruz Biotechnology, USA), у розведенні 1:200 і тримали при $T = +37^{\circ}\text{C}$, 45 хв., промивали три рази по 10 хв. фосфатним буфером та укладали в суміш гліцерин/фосфатний буфер (9:1). Скельця з третьої групи після триразового промивання у фосфатному буфері укладали в суміш гліцерин/фосфатний буфер (9:1).

Для окремої ідентифікації нейронів АрЯ використовували стереотаксичний атлас щура (рис. 2.3) [135].



Примітка. Стрілкою та пунктирною лінією вказане розташування аркуатного ядра гіпоталамуса.

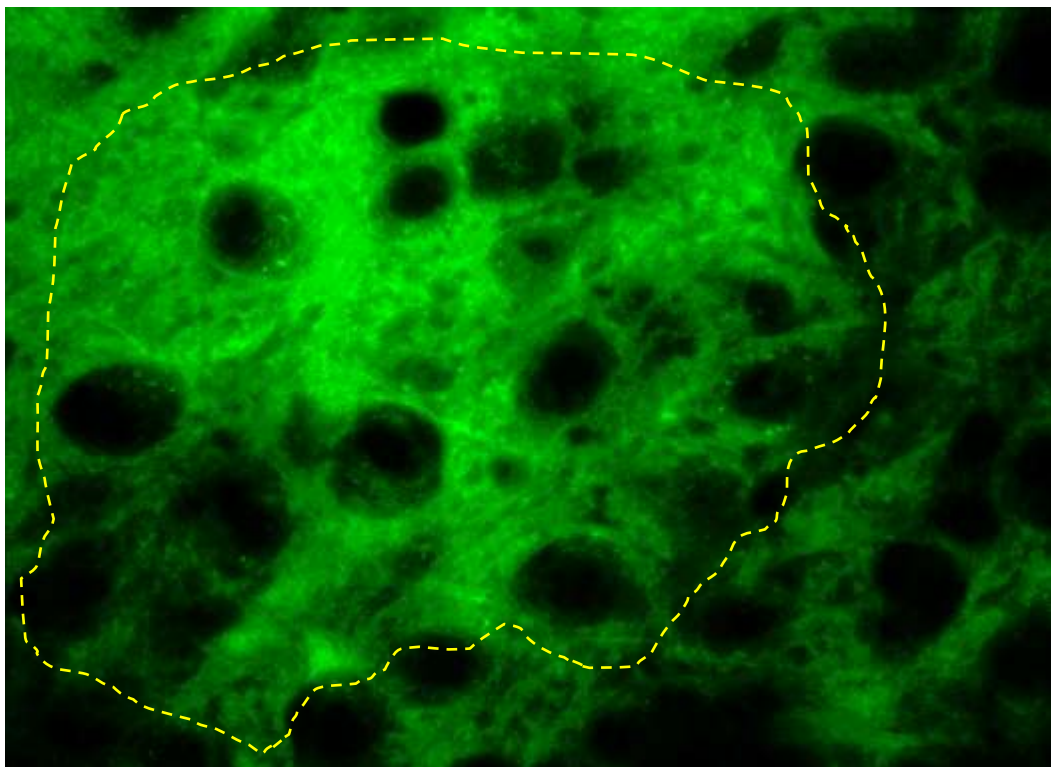
Рисунок 2.3 – Топографічне розташування нейронів АрЯ [135].

Мікрозображення гістологічних зрізів, які були отримані на мікроскопі AXIOSKOP, через високочутливу відеокамеру COHU 4922 (COHU Inc., США) вводилися в комп'ютерну систему цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина) із використанням високо емісійного світлофільтру 38 HE (Zeiss, Німеччина) при спектрі збудження 450-490 нм, спектрі емісії – 500-550 нм. При цьому виключався ефект "вигорання" препарату, пов'язаний з поступовим руйнуванням молекули FITC під впливом тривалого ультрафіолетового опромінення. Введені зображення з імунофлюоресценцією оцифровували за денситометричною шкалою з 256 градаціями сірого кольору. Аналіз зображення здійснювався у напівавтоматичному режимі за допомогою програмного забезпечення з відкритим кодом Image J (National Institutes of Health, USA).

В мікрозображеннях, які були отримані при дослідженні гістологічних зрізів АрЯ гіпоталамусу, в інтерактивному режимі проводилося визначення зони значущої флуоресценції, на яку накладалася «маска». Це дозволяло відділити зону значущої флуоресценції у відповідному регіоні ядра. В нашому випадку, це дозволило відокремити нейрони АрЯ від інших ядерних структур гіпоталамусу та судин.

Кількість досліджених полів зору з «масками» зрізів АрЯ склало не менше 170-200 у кожній серії експериментів.

У ході автоматичного цифрового аналізу зображення у виділений ділянці АрЯ («маски») визначали питому площу імунореактивного матеріалу до досліджуваної ізоформи NOS (S_{IM} , %); сумарний вміст імунореактивного матеріалу до досліджуваної ізоформи NOS (C_{IM} , $Од_{IF}$) та його концентрацію в 1 мкм^2 (K_{IM} , $Од_{OF}/\text{мкм}^2$) (рис. 2.4).



Примітка. Пунктирною лінією виділена «зона інтересу» області аркуатного ядра гіпоталамусу.

Рисунок. 2.4 — Імуногістохімічне дослідження експресії eNOS в АрЯ гіпоталамусу щура групи 1а (контрольна). Інтерактивна «маска» для виділення зони значущої флуоресценції. Ок. х 40

Питому площу імунореактивного матеріалу до відповідної ізоформи NOS (S_{IM} , %) розраховували за формулою:

$$S_{IM} = (aS_{IM} \cdot 100 \%) / S_M, \quad (2.1)$$

де aS_{IM} – абсолютна площа флуоресценції, імунореактивної до відповідної ізоформи ферменту NOS, мкм^2 ;

S_M – абсолютна площа «маски», мкм^2 .

Сумарний вміст імунореактивного матеріалу до відповідної ізоформи NOS (C_{IM} , $\text{Од}_{\text{ДФ}}$) розраховували за формулою:

$$C_{IM} = sC_{IM} - (F_f \cdot S_M), \quad (2.2)$$

де sC_{IM} – сумарний вміст флуоресценції в площі «маски», $\text{Од}_{\text{ДФ}}$;

F_f – середня фонова флуоресценція, $\text{Од}_{\text{ДФ}}/\text{мкм}^2$;

S_M – абсолютна площа «маски», мкм^2 .

Концентрацію імунореактивного матеріалу до досліджуваної ізоформи NOS (K_{IM} , $\text{Од}_{\text{ДФ}}/\text{мкм}^2$) розраховували за формулою:

$$K_{IM} = |\log(F_f \text{BGgrey} / F_{IM} \text{GreyROI}) / \log 10|, \quad (2.3)$$

де F_f – середня фонова флуоресценція, $\text{Од}_{\text{ДФ}}/\text{мкм}^2$;

F_{IM} – середня значуща флуоресценція, $\text{Од}_{\text{ДФ}}/\text{мкм}^2$.

На підставі даних показників судили про особливості експресії ізоформ NOS та їхній розподіл у структурі ядра.

2.3.2.2 Метод дослідження концентрації нітритів у гомогенатах мозку та плазмі крові

Концентрацію стабільних метаболітів NO, нітритів, в гомогенатах гіпоталамусу та плазмі крові щура визначали за якісною реакцією з реактивом Грісса [136]. Для цього попередньо проводили відповідну підготовку гомогенату гіпоталамусу та плазми крові.

Приготування гомогенатів гіпоталамусу. Одразу після декапітації фрагменти головного мозку, які анатомічно відповідали гіпоталамусу, відокремлювали навішували вагою 200 мг, та гомогенізували у сольовому ізотонічному середовищі 0,15 М розчину KCl при $t = +4^{\circ}\text{C}$ за допомогою гомогенізатора Heidolf Instruments D-91126 (ser. № 091002770, Німеччина) у співвідношенні тканина/сольовий розчин 1:40. Після цього, методом диференціального центрифугування при 15000g на центрифусі Sigma Labor zentrifugen D-37520 (ser. № 141672, Німеччина) виділялася цитозольна фракція. Цитозольну фракцію негайно акуратно відбирали в сухі пластикові пробірки і заморожували при температурі (-50°C) для подальших досліджень.

Приготування плазми крові. Для проведення попередньої депротейнізації до 0,2 мл плазми крові додавали 2,0 депротейнізатору та інкубували 15 хв. при температурі $t = +27 - +30^{\circ}\text{C}$ у термостаті. Після цього проби центрифугували при 3000 об/хв протягом 20 хв. Надосад в об'ємі 2,0 мл виділяли та розміщували в підготовлених пробірках.

Визначення концентрації нітритів у біологічних матеріалах. Для цього до 2,0 мл гомогенату та 2,0 мл надосаду депротейнізованої плазми додавали 1,0 мл реактиву Грісса, попередньо приготованого шляхом розведення сухого реактиву, та витримували 15 хв. при температурі $t = +27-30^{\circ}\text{C}$ у термостаті. Потім проби центрифугували при 3000 об./хв. протягом 20 хв. Одночасно з експериментальною готували контрольну пробу, що складалася з 2,0 мл дистильованої води та 1,0 мл реактиву Грісса. Експериментальні та контрольну проби залишали на 15 хв. при температурі $+23^{\circ}\text{C}$, після чого спектрофотометрували при довжині хвилі 540 нм. Отримані показники експериментальної екстинції перераховували за значеннями калібрувального графіка та виражали в мкМ/л.

2.3.2.3 Метод дослідження концентрації нітротирозину в плазмі щурів

Після декапітації кров самців-щурів негайно відбирали в пробірки, які попередньо були розміщені на льоді із завантаженням 2,7 % ЕДТА в 0,9 % розчині NaCl, вміст ретельно перемішували. Для поділу плазми і формених елементів зразки крові центрифугували при 3000 об/хв на центрифугі Sigma Labor zentrifugen D-37520 (ser. № 141672, Німеччина) протягом 10 хвилин. Плазму обережно відбирали в сухі пластикові пробірки і заморожували при $t = -50^{\circ}\text{C}$ для подальших досліджень.

Рівень нітротирозину в плазмі крові щурів досліджували за допомогою комерційного набору для імуноферментного аналізу *in vitro* (Nucult biotech, НК 5010).

2.3.2.4. Метод дослідження експресії мРНК nNOS, iNOS та eNOS

Дослідження експресії мРНК ізоформ NOS було проведено у відділі молекулярно-генетичних досліджень Навчального медико-лабораторного центру ЗДМУ. Відділ укомплектований необхідним сучасним обладнанням для виділення, ампліфікації та детекції результатів ПЛР в режимі реального часу, зокрема: міні-центрифугою Vortex FV-2400, центрифугою CM-50, вакуумним аспіратором FTA-1, термостатом TDB-120, ламінарними шафами BIO II ADVANCE4 та BBS-DDS, ультрафіолетовим боксом для ПЛР UVC/TM-AR, подрібнювачем тканин TUBE MILL CONTROL, системою ПЛР у реальному часі CFX-96, спектрофотометром Nano Drop ND1000 (Nano Drop Technologies, USA), холодильним обладнанням та дозаторами піпетковими змінного об'єму (рис. 2.5).



Рисунок 2.5 – Лабораторія молекулярно-генетичних досліджень НМЛЦ
ЗДМУ

Для аналізу експресії генів трьох ізоформ NOS використовували метод ПЛР зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР). Об'єктом дослідження були гомогенати гіпоталамусу. Молекулярно-генетичне дослідження включало декілька етапів.

Виділення тотальної РНК.

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

1.1 В пробірки загальним об'ємом 1,5 мл вносили по 100 мкл подрібненої тканини, що досліджується, додавали 1 мл Trizol reagent та інтенсивно перемішували вміст до утворення гомогенної емульсії. Інкубували пробірки при $t = + 4 \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 5 хв.

1.2 Додавали в пробірки 200 мкл хлороформу та інтенсивно перемішували вміст пробірок. Пробірки інкубували при $t = + 4 \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 5 хв.

1.3 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 задіти пограничну між фазами білу плівку з ДНК та білками.

1.4 Додавали в пробірки рівний об’єм ізопропанолу, приблизно 600 мкл.

1.5 Інтенсивно перемішували вміст пробірок та переносили пробірки в морозильну камеру („LG”, Корея) при $t = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 30 хв.

1.6 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.

1.7 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.

1.8 Просушували осад при $t = + 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 3 хв.

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

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

Зворотна транскрипція (виділення кДНК)

Для зворотної транскрипції (синтез кДНК) використовували „Набор реагентів для проведення зворотної транскрипції (ОТ-1)” („СИНТОЛ”, Москва) (табл. 2.1). Підготовку та проведення реакції проводили відповідно до протоколу набору з виконанням наступних етапів:

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.

До пробірки додавали наступні компоненти в зазначеному порядку: реакційна суміш 2,5x (10 мкл); зворотна транскриптаза MMLV-RT (1 мкл). Загальний об'єм — 25 мкл. Обережно перемішували і центрифугували.

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

Зупиняли реакцію прогріванням при $t = + 92 \text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 5 хв. Переносили пробірки на лід.

Полімеразно-ланцюгова реакція в режимі реального часу. Для визначення рівня експресії досліджуваних генів використовували ампліфікатор CFX96™Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) і набір реактивів для проведення ПЦР-РВ в присутності SYBR Green R-402 («СИНТОЛ», Російська Федерація). Фінальна реакційна суміш для ампліфікації включала барвник SYBR Green, ДНК – полімераза SynTaq з антитілами, що пригнічують активність ферменту, по 0,2 мкл прямого і зворотного специфічних праймерів, dNTP-дезоксинуклеозидтрифосфати, 1 мкл матриці (кДНК). Реакційну суміш доводили до загального об'єму 25 мкл додаванням деіонізованої H_2O .

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

Ген	Нуклеотидна послідовність праймера	$T_{пл}, ^\circ C$	Довжина продукту ПЛР, п. н.	Екзон-екзонний стик
<i>NOS1</i>	F = GACGCAGATGAGGTTTTTCAGC R = GGGGGCAGGAGGATCCAG	59.87 61.17	45	4477/4478
<i>NOS2</i>	F = GTTCCTCAGGCTTGGGTCTT R = CCGTGGGGCTTGTAGTTGAC	59.6 60.95	49	143/144
<i>NOS3</i>	F = CCCAGGAGAGATCCACCTCA R = CAGCACATCCTGGGTTCTGT	60.03 59.96	58	2899/2900

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

Специфічні пари праймерів (5'-3') для аналізу досліджуваних і референсного генів були підібрані за допомогою програмного забезпечення Primer Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) та виготовлені фірмою Thermo Scientific, США (табл.). Ампліфікація відбувалася за таких умов: ініціююча денатурація 95 °C – 10 хв; далі 50 циклів: денатурація – 95 °C, 15сек., віджиг праймерів – 58-63 °C, 30 сек., елонгація – 72 °C, 30 сек. Реєстрація інтенсивності флуоресценції відбувалася автоматично наприкінці стадії елонгації кожного циклу по каналу Sybr Green.

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 C_t метод ($\Delta\Delta C_t$ метод). Статистичний аналіз даних ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення CFX Manager TM(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.

2.3.3 Метод детекції нейропептидів ангіотензину II, нейротензину, мозкового натрійуретичного пептиду та β -ендорфіну в структурі АрЯ гіпоталамусу

Дослідження вмісту нейропептидів в експериментальних тварин здійснювали в декілька етапів.

Першим етапом було введення додатковим експериментальним групам (1б, 2б, 3б) колхіцину в латеральний шлуночок мозку. Необхідність проведення попередньої операції у щурів із введенням колхіцину в шлуночки мозку пов'язано із тим, що для об'єктивного та достовірного визначення рівня нейропептидів необхідно їхнє накопичення у цитоплазмі нейронів. Однак невеликий об'єм цитоплазми дрібноклітинних нейронів АрЯ не дозволяє їм накопичувати нейропептиди у достатній кількості, що ускладнює їхнє імуногістохімічне виявлення та не дає змогу дослідити синтетичну та секреторну активність нейронів. Тому більшість дослідників нейрофізіологів для підвищення детекції нейропептидів у дрібноклітинних нейронах гіпоталамусу застосовують прижиттєве введення в шлуночки мозку нейротоксичної отрути колхіцину [130].

Введення колхіцину в шлуночки мозку призводить до руйнування мікротрубочок цитоскелету, аксонів та дендритів нейронів, що перешкоджає виходу нейросекрету з перикаріону пептид-синтезуючих нейронів, супроводжується блокадою аксоплазматичного транспорту в нервових волокнах і гальмуванням виділення нейропептиду в кровообіг. У результаті нейросекрет накопичується в перикаріоні нервових клітин і у волокнах, що сприяє кращому його виявленню в імуногістохімічних реакціях [137].

1-й етап детекції нейропептидів - введення колхіцину. Щурам 1б, 2б та 3б груп за 48 годин до їхнього виведення з експерименту інтрацеребровентрикулярно проводили ін'єкцію 120 мкг колхіцину (SIGMA Chemical, США), розведеного у 20 мкл 0,9% розчину NaCl. Ін'єкцію здійснювали тваринам, наркотизованим тіопенталом натрію (40 мг/кг, внутрішньочеревно) у стереотаксичному цифровому апараті (World Precision Instruments, США) (рис. 2.6).



Рисунок 2.6 – Позиціонування щура для інтрацеребровентрикулярного введення колхіцину у стереотаксичному цифровому апараті з вушними кріпленнями 18 град (World Precision Instruments, США), оснащеному датчиками переміщення і компактним рідкокристалічним екраном

Координати для інтрацеребровентрикулярного введення розчину колхіцину: 9,5 мм від міжвушної лінії до переду; 1,5 мм праворуч від серединної лінії та 6 мм у глибину. Позиціонування місця інтрацеребровентрикулярного введення щурам колхіцину здійснювали за рахунок використання стереотаксичної координатної системи, що спирається на зовнішньочерепні орієнтири та їх суміщення з даними стереотаксичного атласу мозку щура [135] (рис. 2.7).

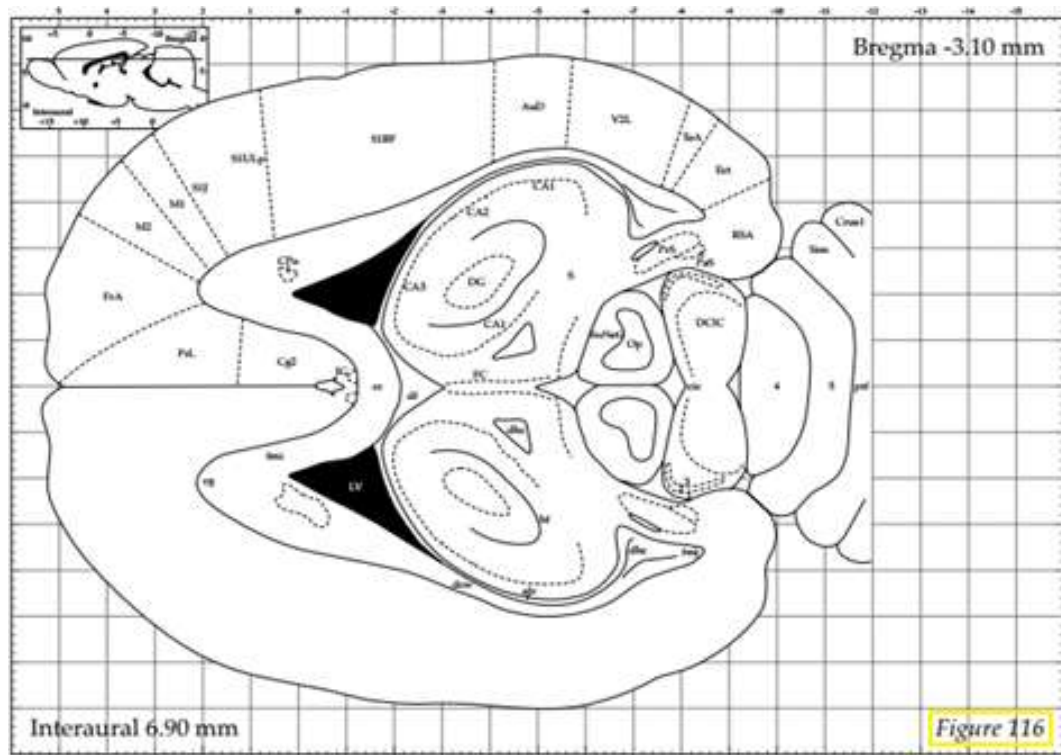


Рисунок 2.7 – Топографічна схема латеральних шлуночків мозку щура для інтрацеребровентрикулярного введення колхіцину [135]

З метою виключення небажаних ефектів внутрішньошлуночкових ін'єкцій додатковим 6 тваринам водили у латеральний шлуночок мозку 20 мкл 0,9% розчину NaCl. Достовірних змін досліджуваних параметрів, у порівнянні з контрольною групою тварин, не відзначалося.

2-й етап детекції нейропептидів – демаскування епітопів нейропептидів.

Через 2 доби після введення колхіцину тварин декапітували під тіопенталом натрію (40 мг/кг, внутрішньочеревно. Мозок негайно вилучали і розміщували у фіксаторі Буена на 20 годин при кімнатній температурі. Після стандартної процедури зневоднення і просочення хлороформом та парапластом, мозок заливали у парапластові блоки. На ротаційному мікротомі готували серійні фронтальні зрізи гіпоталамуса товщиною 14 мкм, які потім депарафінували у ксилолі, проводили регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100%, 96%, 70%) і тричі по 10 хв. відмивали в 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,4). Скельця зі зрізами мозку розміщували у

спеціальних скляних контейнерах об'ємом 50-70 мл, заповнених фосфатним буфером рН 6,0, та розміщували для інкубації в мікрохвильовій печі. Демаскування епітопів нейропептидів здійснювали шляхом 3-и разової інкубації по 3 хв. (ПВЧ 800 Ватт). Після третьої обробки контейнери вилучали, охолоджували до температури 20-25 °С та промивали фосфатним буфером рН 7,4 два рази по 5 хв. [130].

3-й етап детекції нейропептидів – імуногістохімічне визначення експресії нейропептидів.

Специфічне імуногістохімічне дослідження нейропептидів виконували згідно стандартного протоколу фірми виробника із використанням специфічних первинних та вторинних антитіл.

Після проведення 3-и разового демаскування епітопів скельця зі зрізами мозку діставали з контейнерів та розподіляли на чотири групи:

- першу групу зрізів інкубували з кролячими IgG до нейротензину (Santa Cruz Biotechnology, USA) у розведенні 1:200;
- другу групу зрізів інкубували з кролячими IgG до ангіотензину II (Santa Cruz Biotechnology, USA) у розведенні 1:200;
- третю групу зрізів інкубували з кролячими IgG до мозкового натрійутеричного пептиду (Santa Cruz Biotechnology, USA) у розведенні 1:200;
- четверту групу зрізів інкубували з кролячими IgG до β-ендорфіну (Santa Cruz Biotechnology, USA) у розведенні 1:200;

Скельця з нанесеними первинними антитілами тримали в полімерних фіксаторах при ($t = +4$ °С, 24 години). Потім тричі по 10 хв. відмивали фосфатним буфером 0,1 М (рН 7.2).

Після відмивання фосфатним буфером 0,1 М (рН 7.2) на скельця наносили вторинні мишачі IgG до повної молекули IgG кроля, кон'югованими з FITC (Santa Cruz Biotechnology, USA) у розведенні 1:64 і тримали при ($T = +37$ °С, 45 хв.), промивали три рази по 10 хв. фосфатним буфером й укладали в суміш гліцерин/фосфатний буфер (9:1).

Для окремої ідентифікації нейронів АрЯ використовували стереотаксичний атлас щура [135].

У мікрозображеннях АрЯ гіпоталамусу визначали питому площу імунореактивного матеріалу до досліджуваного нейропептиду (S_{IM} , %); сумарний вміст імунореактивного матеріалу до досліджуваного нейропептиду (C_{IM} , $Од_{IF}$) та його концентрацію в 1 мкм^2 (K_{IM} , $Од_{ог}/\text{мкм}^2$). Метод аналізу зображення та розрахунку описано вище (див. п.п. 2.3.2.1.).

2.3.3.1 Метод розрахунку співвідношення показників експресії нейропептидів та депресорно-пресорних взаємовідносин в аркуатному ядрі гіпоталамусу в щурів експериментальних груп

Аналіз співвідношення показників експресії кожного окремого нейропептиду проводилося між показниками груп, де за одиницю були прийняті показники контрольної групи, а саме контроль:ЕАГ:ЕСАГ. Визначали співвідношення за вмістом, концентрацією та питомою площею імунореактивного матеріалу

Для визначення депресорно-пресорних взаємовідносин в аркуатному ядрі гіпоталамусу в щурів експериментальних груп розраховувався коефіцієнт за сумою вмісту двох пресорних (нейротензину та ангіотензину II) та двох депресорних (мозкового натрійуретичного пептиду та β -ендорфіну) нейропептидів.

2.3.4 Методика морфо-денситометричного дослідження параметрів ядер нейронів АрЯ гіпоталамусу

Для проведення морфо-денситометричного дослідження нейронів АрЯ гіпоталамусу негайно після декапітації тварин виділяли мозок та розміщували його у фіксуєчій суміші на 20 годин при кімнатній температурі. З фіксуєчих сумішей використовували фіксатор Буена [134].

Після 20-годинної фіксації біологічного матеріалу протягом 2 годин відмивали пікринову кислоту в проточній холодній воді. У подальшому проводили дегідратацію мозку у висхідних концентраціях етанолу від 50 % до 100 %, розчинах етанол/ксилол, ксилол, ксилол/парапласт ($t = +37^{\circ}\text{C}$), на 1 годину розміщували в рідкий парапласт ($t = +56^{\circ}\text{C}$) і потім переносили в парапластові блоки, з яких на ротаційному мікротомі MICROM HR-360 (Microm, Німеччина) виготовляли фронтальні серійні зрізи нейронів АрЯ гіпоталамуса завтовшки 5 мкм. Для ідентифікації нейронів АрЯ використовували стереотаксичний атлас щура (див. рис 2.3)

Для визначення нуклеїнових кислот зрізи депарафінували та фарбували галоціанин-хромовими галунами за Ейнарсоном (рис. 2.7) [134].



Рисунок 2.7 – Мікрображення АрЯ гіпоталамусу мозку щура, забарвлення галоціанин-хромовими галунами за Ейнарсоном. Ок. х 20

Мікрображення, отримане на мікроскопі AXIOSKOP, за допомогою високочутливої відеокамери COHU-4922 (COHU Inc., США) вводилось в комп'ютерну систему цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия) та оцифровувалось.

Аналіз зображення здійснювався у напівавтоматичному режимі за допомогою програмного забезпечення з відкритим кодом Image J (National Institutes of Health, USA). В мікрозображеннях, які були отримані при дослідженні гістологічних зрізів АрЯ гіпоталамусу, в інтерактивному режимі накладали «маску» на ядро клітини (рис. 2.8), що дало змогу отримати унікальну характеристику кожного окремого нейрону.

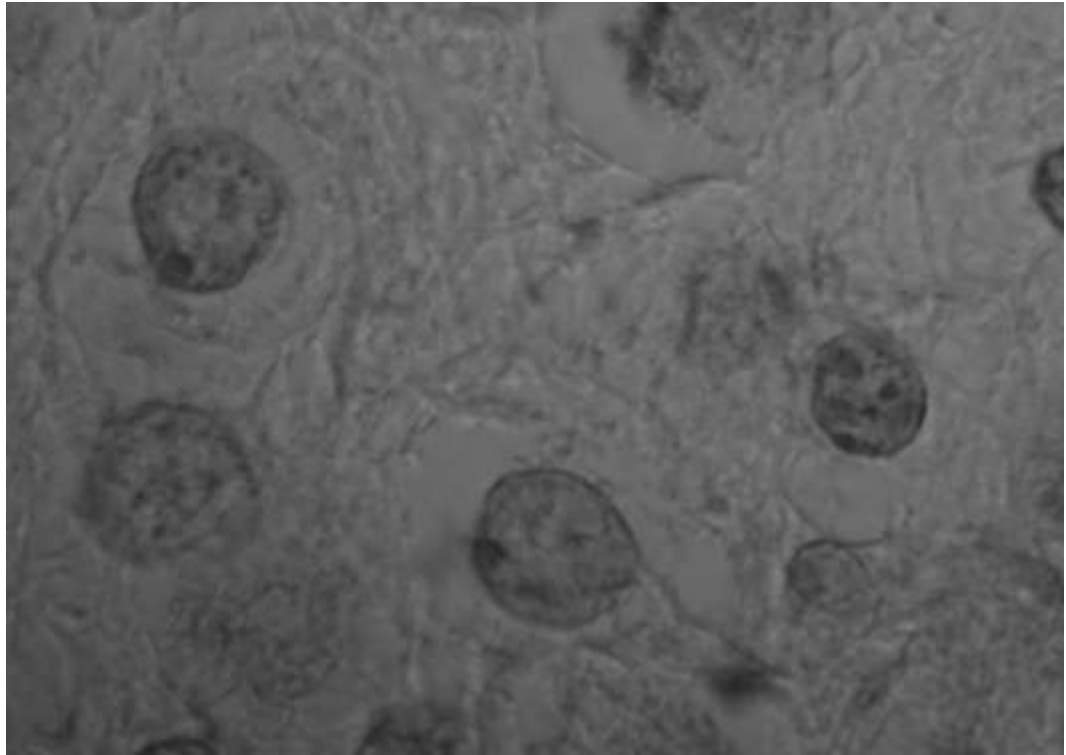


Рисунок 2.8 – Мікрозображення нейронів АрЯ гіпоталамусу для автоматичного розрахунку морфо-денситометричних параметрів. Ок. x 100

За допомогою програми imageJ в автоматичному режимі були отримані морфо-денситометричні характеристики нейронів: метричні – площа ядра (мкм^2) і денситометричні – концентрація ($\text{Од}_{\text{ог}}/\text{мкм}^2$) та вміст ($\text{Од}_{\text{ог}}$) РНК в ядрі нейрону.

Кількість досліджених нейронів в АрЯ склала не менше 250-300 клітин у кожній серії експериментів. Досліджували тільки ті нейрони, які в площині зрізу мали ядро та ядерце.

Концентрацію нуклеїнових кислот розраховували за формулою:

$$C_i = |\lg(D_i/D_0)|, \quad (2.4)$$

де D_1 – оптична щільність об'єкту;

D_0 – показник оптичної щільності ядра/ядерця та «фону» (міжклітинної речовини).

Вміст нуклеїнових кислот (C_1) розраховували за формулою:

$$C_1 = (C \cdot S), \quad (2.5)$$

де C – концентрація нуклеїнових кислот;

S – площа цитоплазми, ядра або ядерця.

2.3.4.1 Аналіз морфо-метричного показника площі ядер нейронів вентромедіального, доромедіального та вентролатерального суб'ядер АрЯ гіпоталамуса в щурів експериментальних груп

Структурно-популяційний аналіз (англ. cluster analysis) – це багатовимірна статистична процедура, яка виконує збір даних, а також впорядкування об'єктів у відносно однорідних групах. Найважливішими характеристиками процедури є вибір метрики та процедури об'єднання. У кожній групі об'єкти схожі, а між різними існують явні відмінності. Головна мета, яку даний аналіз переслідує – виявити схожі об'єкти в досліджуваній вибірці.

Основні етапи структурно-популяційного аналізу клітинної популяції нейронів АрЯ включають:

1. Вибір порівнянних між собою об'єктів, в роботі це ядра нейронів суб'ядер АрЯ гіпоталамусу.
2. Вибір ознаки, за якою буде проводитися порівняння, в роботі це площа ядер нейронів суб'ядер АрЯ гіпоталамусу.
3. Обчислення міри подібності між об'єктами відповідно до обраної метрики.
4. Групування об'єктів в групи за допомогою плоского алгоритму розбиття за одинарним зв'язком за визначенням максимальної суми міжкластерної відстані [138].

Для проведення структурно-популяційного каріометричного аналізу за площею ядер нейронів у кожному окремому суб'ядрі АрЯ гіпоталамусу з

гістологічних зрізів, забарвлених за Ейнарсоном [134], були зроблені мікрофотографії. У інтерактивному режимі з використанням програми Image J (з відкритим доступом) було виділено по 100 об'єктів (ядер нейронів, в яких на зрізі візуалізувалося не менше як одне ядерце), що дорівнювали 100 %. Після цього ці нейрони розподілили на групи за площею ядер від найменшого до найбільшого з кроком розподілу 10 мкм². Це дозволило визначити кількість груп та їх унікальні параметри (табл. 2.2).

Таблиця 2.2 – Кількісні характеристики ядер нейронів АрЯ гіпоталамусу за їхньою площею

Характеристика групи	Площа ядер нейронів, мкм ²
Дуже дрібні ядра нейронів	20-31
Дрібні ядра нейронів	31-40
	41-50
Середні ядра нейронів	51-60
	61-70
Великі ядра нейронів	71-80
	81-90
Дуже великі ядра нейронів	91-100
	101-110

2.3.5 Методи статистичного аналізу

Обчислення отриманих результатів проводили за допомогою програми “Statistica 11.0” (StatSoftIns, США). Для порівняння груп з нормальним розподілом даних використовували t-критерій Ст'юдента. Дані представлені у вигляді середнього арифметичного та стандартної похибки репрезентативності середнього значення. Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$ [138].

Матеріали розділу відображені в 2 статтях та 1 тезах [130, 139-142].

РОЗДІЛ 3

ОСОБЛИВОСТІ СТАНУ СИСТЕМИ МОНООКСИДУ АЗОТУ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ЩУРІВ З АРТЕРІАЛЬНОЮ ГІПЕРТЕНЗІЄЮ

У цьому розділі наведені результати комплексного дослідження стану системи монооксиду азоту (NO) в структурі АрЯ гіпоталамусу при різних за етіологією АГ. Зацікавленість до її вивчення, як системи, що чинить локальні регуляторні впливи на функціональну активність нейронів, пов'язана із значним надходженням наукових фактів про системні та місцеві ефекти NO в ЦНС. Доведений її вплив на васкуляризацію та інервацію нервових клітин, встановлено роль монооксиду азоту в захисних реакціях, визначені нейротрансмітерні ефекти [143-145]. Слід зазначити, що стан системи та, відповідно, спрямованість ефектів NO залежатиме від кількості утвореного монооксиду азоту, місця його синтезу та кінцевого метаболізму [146-147]. У той час як при порушенні балансу цих параметрів будуть спостерігатися його позитивні або негативні прояви. Однак саме ці питання, а саме стан локальної системи монооксиду азоту в структурі регуляторних ядер гіпоталамусу, залишаються не дослідженими. Що більше, відсутня інформація про особливості її змін при формуванні АГ, не проведено комплексне порівняльне дослідження показників експресії системи монооксиду азоту при різних за етіологією АГ.

Саме тому для вивчення особливостей стану системи монооксиду азоту в АрЯ гіпоталамусу при різних моделях АГ було сформовано протокол досліджуваних методів, який включав визначення безпосередньо у зрізах мозку в структурі АрЯ ізоформний профіль ферменту NO-синтази (нейрональної, ендотеліальної та індукцибельної), у гомогенатах гіпоталамусу експресію mRNA nNOS, eNOS та iNOS, концентрацію кінцевих метаболітів NO – нітритів та нітротирозину.

3.1. Ізоформний профіль ферменту NOS в аркуатному ядрі гіпоталамуса щурів експериментальних груп

Доведено, що процес утворення NO здійснюється за допомогою однойменного ензиму NO-синтази та носить ферментативний характер. У результаті окислення L-аргініну до L-цитруліну одною з трьох лізоформ, нейрональною (nNOS, NOS-1), індукцибельною (iNOS, NOS-2) або ендотеліальною (eNOS, NOS-3), відбувається утворення NO. Необхідно зазначити, що ізоформи NOS відрізняються за механізмом дії, індукції та біологічним значенням для організму. Саме тому їх розділяють на конститутивні (nNOS та eNOS) та індукцибельну (iNOS) форми. До того ж, активність конститутивних форм NOS залежить від концентрації Ca^{2+} , тимчасом як активація iNOS Ca^{2+} -незалежна [146-147].

Активація конститутивної ізоформи eNOS відбувається під впливом вазоділятаторних агентів (ацетилхоліну, аденозину, 5-оксітріптаміну, глутамату, брадикініну, гістаміну та ін.), при цьому в цитоплазмі ендотеліальних клітин зростає рівень Ca^{2+} , він з'єднується з кальмодуліном, тимчасом як утворений комплекс Ca^{2+} -кальмодулін виступає кофактором реакції. Гіпоксичні стани організму також виступають в ролі активаторів eNOS. Так, за вазоконстрикції судин під впливом фактору активації тромбоцитів (ФАТ) через ФАТ-рецептори на клітинах ендотелію відбувається активація eNOS, утворюється NO, розширюються судини – покращується кровопостачання [148].

Друга конститутивна ізоформа nNOS виступає в якості нейромедіатору, вторинного месенджера та регулятора нервової діяльності. Така здатність пов'язана з функціональним станом N-метил-D-аспартат (NMDA) рецепторами. Останні опосередковують дію збуджуючих амінокислот L-глутамату і L-аспартату в реалізації ряду фізіологічних ефектів NO [146-147]. NMDA-рецептори контролюють катіонні канали в мембрані, головним чином, кальцієві. Стимуляція NMDA підтипу глутаматних рецепторів мозку

ініціює вхід Ca^{2+} в клітину, який, зв'язуючись з кальмодуліном, активує NOS. Таким чином, утворення NO стає одним з внутрішньоклітинних ланок передачі глутаматергічних сигналів. Крім того, NO не тільки утворюється при активації NMDA-рецепторів, а також має здатність змінювати їхню активність [146-147].

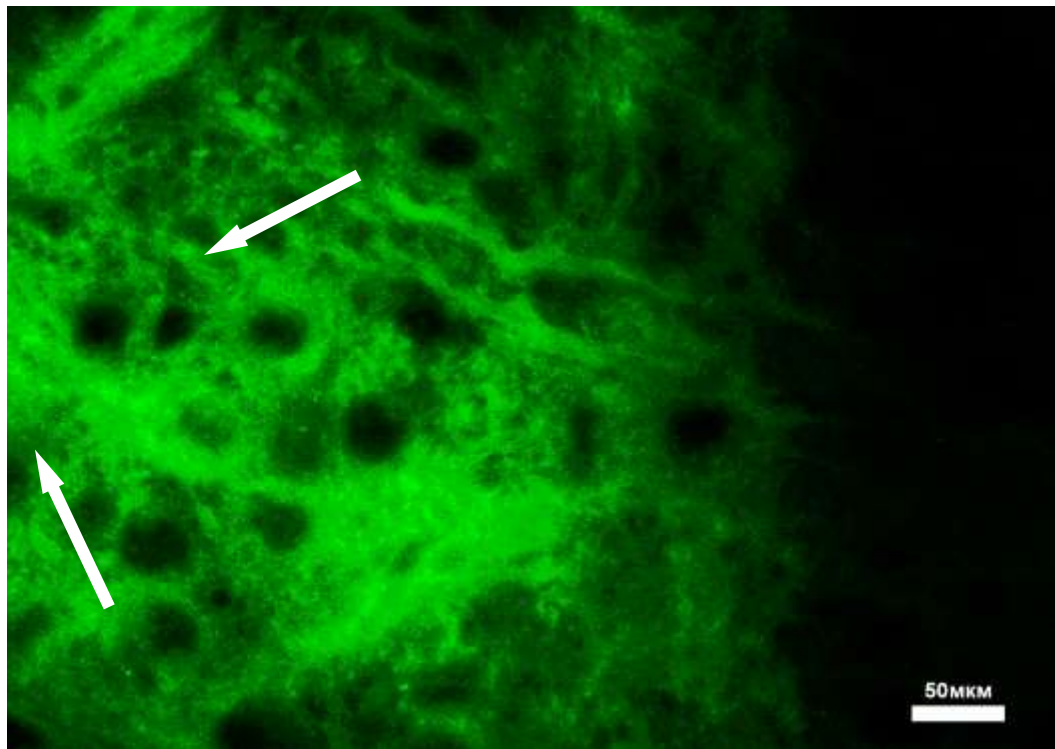
На відміну від конститутивних лізоформ, iNOS генерує в декілька разів більшу кількість NO, не використовуючи при цьому Ca^{2+} . Вона активується цитокінами при запальних процесах або бактеріальними антигенами. Також можлива активація нікотиною кислотою та гормонами (адреналін, глюкагон), які впливають на синтез cAMP [146]. Сьогодні з'явилась інформація, про те, що iNOS приймає участь не тільки у запальних реакціях, а й доведено її роль у фізіологічних процесах, визначено можливість базальної активності із утворенням невеликої кількості NO. То ж, з наведених вище даних можна припустити, що окрім протимікробної дії, iNOS також приймає участь у захисно-приспосувальних реакціях організму у відповідь на мінливі умови життєдіяльності [149].

Саме тому важливою умовою нормального функціонування клітинної популяції в АрЯ є збереження балансу ізоформного профілю NOS, тимчасом як його зрушення може стати підґрунтям формування системної патології (АГ, ожиріння, нецукровий діабет та ін.) через порушення регуляторної функції ядер гіпоталамусу.

3.1.1 Особливості показників експресії нейрональної NOS в аркуатному ядрі гіпоталамуса щурів експериментальних груп

За даними наукової літератури, nNOS широко поширена в ЦНС та в периферичній нервовій системі. У центральній нервовій системі (ЦНС) nNOS бере участь у рості, диференціюванні клітин та їх поновленні після ушкоджень. Також nNOS залучена до регуляції міжнейрональних зв'язків [143-145].

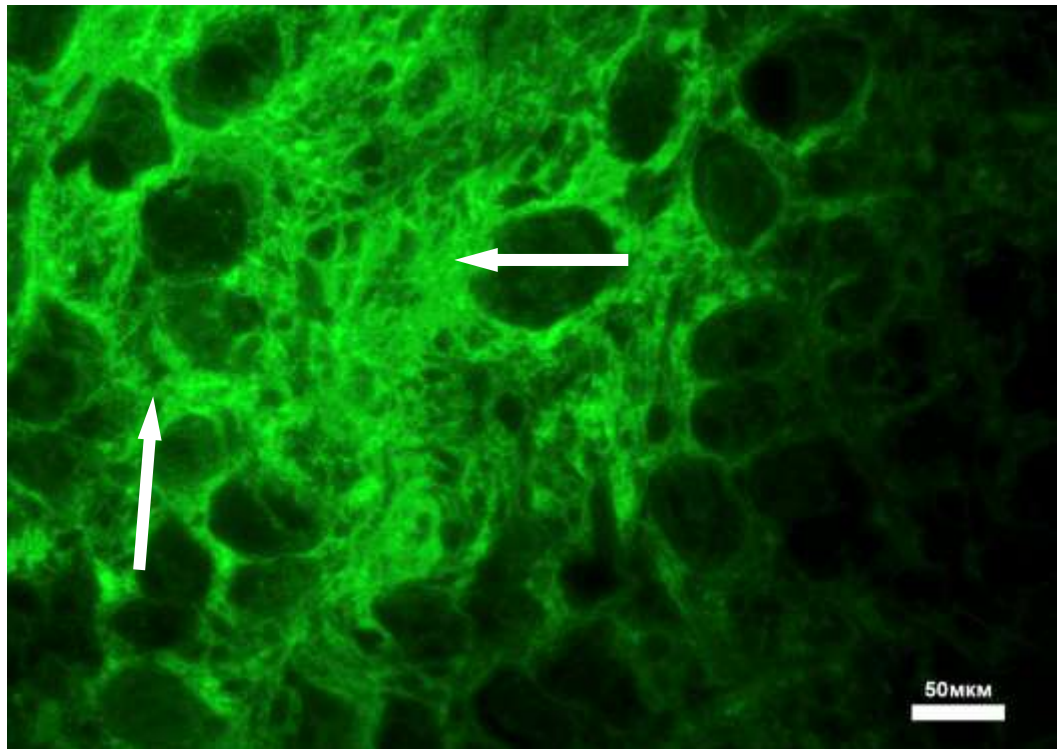
В ході проведеного імунофлюоресцентного дослідження 14 мкм зрізів гіпоталамусів щурів контрольної групи із локалізацією в області III шлуночка з топографічною ідентифікацією в передньому гіпоталамічному полі [135] було встановлено, що в АрЯ візуально IPM до nNOS розподілений в структурі ядра переважно в дорсолатеральній частині дифузно. Інтенсивна флуоресценція у вигляді гранул визначалася в більшості нейронів по периферії цитоплазми і в їхніх аксонах. У перинуклеарній області цитоплазми та ядрах клітин IPM до nNOS не виявлявся (рис. 3.1).



Примітка. Стрілками вказано IPM до nNOS.

Рисунок 3.1 – Експресія nNOS в нейронах АрЯ гіпоталамуса в контрольних щурів. Реакція непрямой імунофлюоресценції. Ок. х 40

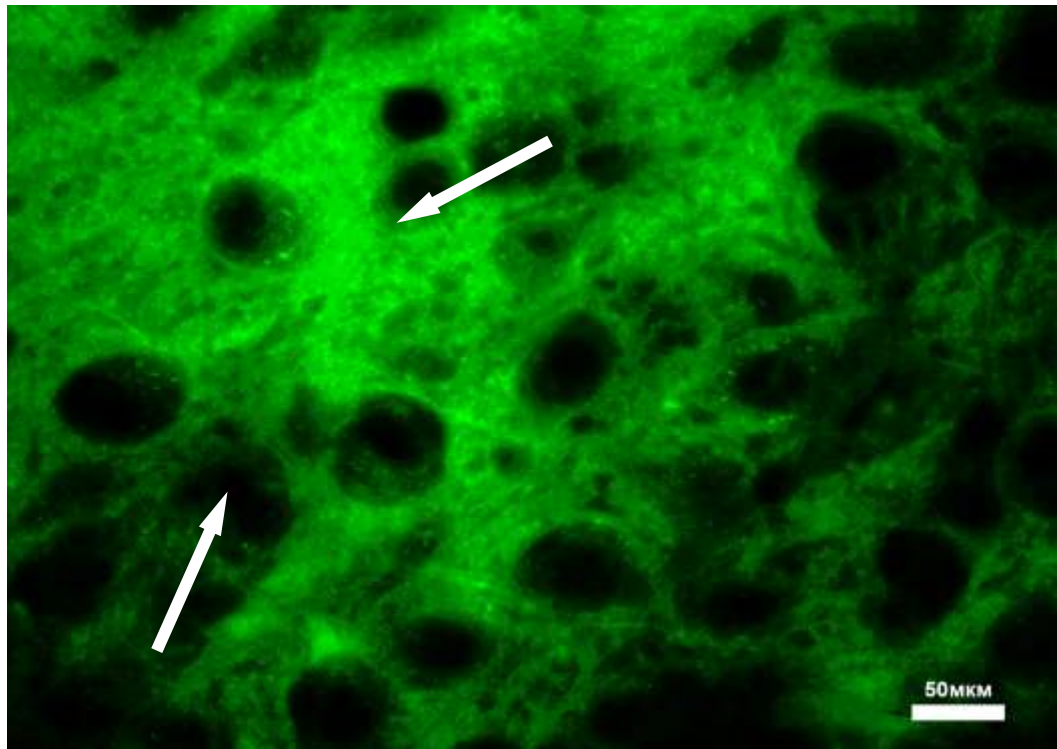
У щурів лінії SHR з ЕАГ також визначався виключно дорсолатеральний розподіл IPM до nNOS в АрЯ гіпоталамусу. Імунний матеріал ферменту розміщувався в більшості по периферії цитоплазми нейронів та їхніх аксонах. Слід зазначити, що скупчення IPM у вигляді гранул у цитоплазмі клітин не спостерігалось (рис. 3.2).



Примітка. Стрілкою вказано IPM до nNOS

Рисунок 3.2 – Експресія nNOS в нейронах АрЯ гіпоталамуса щурів з ЕАГ. Реакція непрямой імунофлюоресценції. Ок. х 40

Візуальна картина розподілу імунореактивного матеріалу до nNOS в щурів з ЕСАГ була подібною до групі контролю та ЕАГ: IPM до nNOS виявлявся тільки в дорсолатеральній частині АрЯ гіпоталамуса, його розподіл характеризувався дифузністю. Однак наявність скупчень IPM до nNOS у вигляді гранул була подібною до контрольної групи, чим суттєво відрізнялась від ЕАГ, за якої вони були відсутні (рис. 3.3).



Примітка. Стрілкою вказано ІРМ до nNOS

Рисунок 3.3 – Експресія nNOS в нейронах АрЯ гіпоталамуса в групі щурів з ЕСАГ. Реакція непрямой імуофлюоресценції. Ок. х 40

Після проведеного статистичного аналізу встановлено, що вміст ІРМ до nNOS в АрЯ гіпоталамуса в щурів з ЕАГ, в порівнянні з контролем, був достовірно вище на 34,8 % ($p < 0,05$), тимчасом як його концентрація в досліджуваній структурі була нижче за аналогічний показник контролю на 6,7 % ($p < 0,05$). Питома площа ІРМ до nNOS достовірних відмінностей від контролю не мала. У АрЯ гіпоталамуса щурів з ЕСАГ, в порівнянні з контролем, експресія nNOS характеризувалася збільшенням вмісту ІРМ на 31,5 % ($p < 0,05$), зниженням його концентрації на 10,7 % ($p < 0,05$). При цьому питома площа ІРМ до nNOS ставала достовірно більшою на 4,2 % ($p < 0,05$) (табл. 3.1.).

Таблиця 3.1 – Експресія nNOS в АрЯ гіпоталамуса експериментальних груп ($M \pm m$)

Експериментальні групи n=10	Вміст імунореактивного матеріалу, $OD_{i\phi}$	Концентрація імунореактивного матеріалу, $OD_{i\phi}/\mu\text{км}^2$	Питома площа імунореактивного матеріалу, %
Контрольна група	967,7±21,35	78,6±1,82	47,4±0,68
ЕАГ	1304,5±16,78 ¹	73,4±1,02 ¹	46,8±0,62
ЕСАГ	1272,6±18,42 ¹	70,2±0,98 ^{1,2}	49,2±0,59 ^{1,2}

Примітка 1. (¹) достовірні відмінності параметрів ($p < 0,05$) по відношенню до контрольної групи.

Примітка 2. (²) достовірні відмінності параметрів ($p < 0,05$) в групі з ЕАГ по відношенню до групи з ЕСАГ.

Порівняльний аналіз показників експресії nNOS в групах щурів з експериментальними моделями АГ показав, що вміст IPM до nNOS в обох групах достовірних відмінностей не мав, але він був достовірно вищим, ніж показник контролю. Концентрація IPM до nNOS, навпаки, залежала від етіології АГ, так, в групі з ЕАГ на 4,36 % ($p < 0,05$) була вищою, ніж в групі з ЕСАГ. Показник питомої площі IPM nNOS показав зворотну закономірність – максимальні значення спостерігалися в групі з ЕСАГ та перевищували відповідний показник групи з ЕАГ на 5,04 % ($p < 0,05$) (див. табл. 3.1).

Таким чином, було встановлено, що експресія nNOS спостерігається переважно в дорсолатеральному суб'ядрі АрЯ гіпоталамуса у всіх групах щурів як в нормі, так і при сформованій патології – АГ. Формування АГ, незалежно від типу моделі, призводило до збільшення вмісту IPM до nNOS на фоні зменшення його концентрації. Однак при цьому встановлені специфічні відмінності експресії ензиму, які залежали від етіо-патогенетичних особливостей формування АГ: втрата гранул з IPM до nNOS при ЕАГ та зменшення площі його розподілу, на відміну від показників групи з ЕСАГ, де відмічалось збереження гранул та, навпаки, достовірне

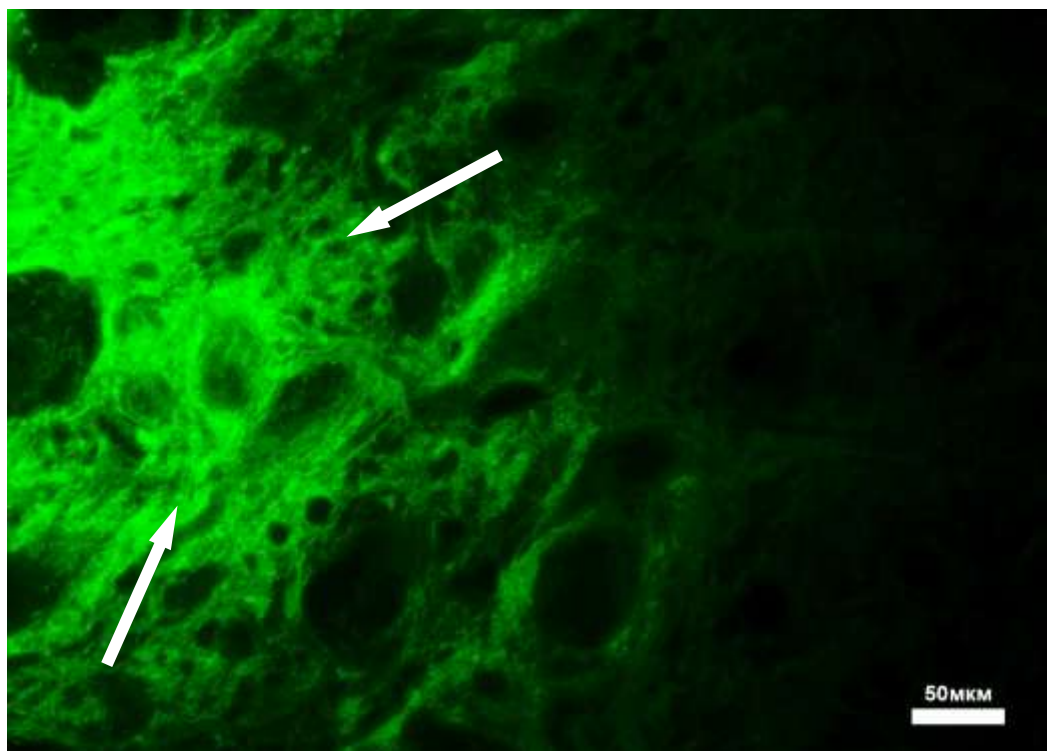
збільшення площі IPM до nNOS.

На нашу думку, встановлені відмінності можуть бути пов'язані як із функціональною роллю ізоформи ферменту, так і особливостями її утворення. Є припущення, що nNOS в умовах розвинутої патології стає важливим фактором компенсації, що сприяє нейропротекції, поліпшенню трофіки нейронів та їхньої функціональної активності [143-145].

3.1.2 Особливості показників експресії індукцйбельної NOS в аркуатному ядрі гіпоталамуса щурів експериментальних груп

Відомо, що iNOS виявлена не тільки в макрофагах, але і в нейтрофілах, кератиноцитах, фібробластах, хондроцитах, остеокластах, нейронах, астроцитах, в клітинах епітелію та ендотелію, гепатоцитах, ендокарді, гладких м'язах судин [149]. Її активація - це складова частина багатьох захисно-адаптаційних реакцій, які розвиваються за інфекційних, алергічних і автоімунних захворюваннях. Однак при активації iNOS відбувається синтез дуже високих концентрацій NO, що може призвести до його цитотоксичного ефекту [146-147, 149]. Проте деякі дослідники розглядають iNOS як складову частину багатьох захисно-приспосувальних реакцій організму. В даний час вже говорять про базальну NO-синтетичну активність iNOS та її ролі у регуляції судинного тонусу [150].

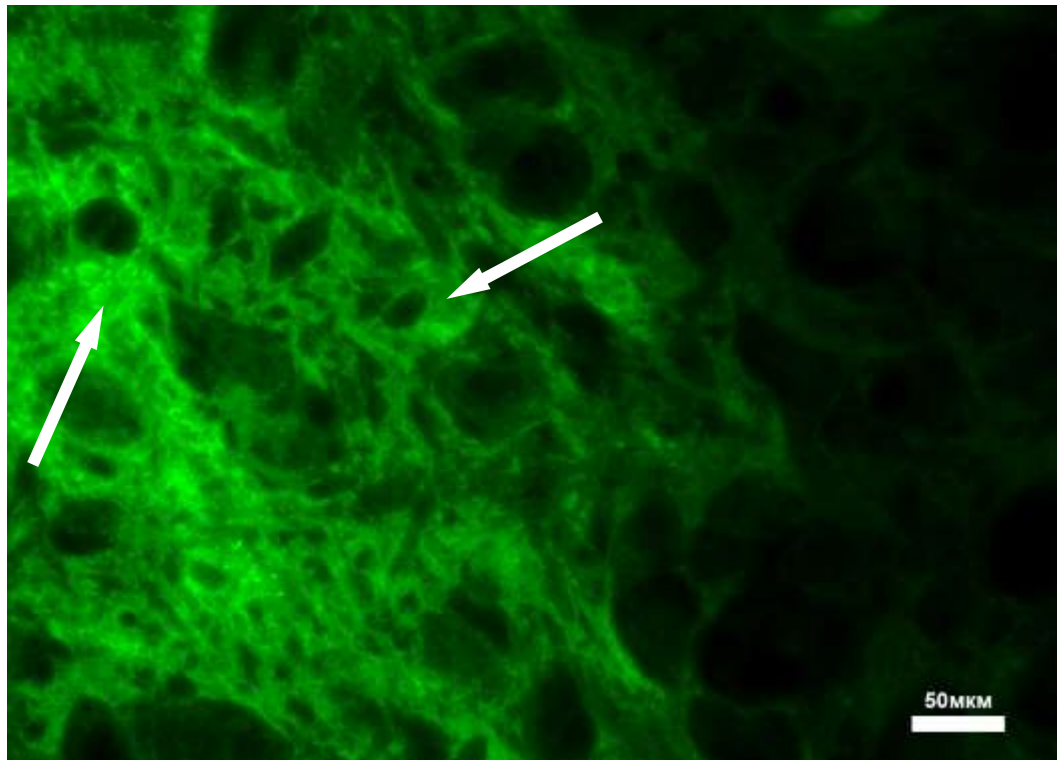
В ході дослідження експресії iNOS в АрЯ гіпоталамуса було встановлено, що IPM розподілявся в структурі ядра неоднорідно, локалізувався переважно в дорсолатеральній частині, при цьому відзначалися окремі нейрони з високою інтенсивністю експресії на тлі «слабкої» флуоресценції більшості клітин. У нейронах IPM до iNOS розташовувався переважно дифузно, відзначалися поодинокі аксони, що містили IPM (рис. 3.4).



Примітка. Стрілками вказано IPM до iNOS.

Рисунок 3.4 – Експресія iNOS в нейронах АрЯ гіпоталамуса в контрольних щурів. Реакція непрямой імунофлюоресценції. Ок. х 40

У групі щурів з ЕАГ в АрЯ гіпоталамуса IPM до iNOS характеризувався переважною локалізацією в дорсолатеральному суб'єдрі АрЯ, дифузним розташуванням в нейронах та появою одиничних гранул (рис. 3.5).



Примітка. Стрілками вказано ІРМ до іNOS.

Рисунок 3.5 – Експресія іNOS в нейронах АрЯ гіпоталамуса в щупів з ЕАГ. Реакція непрямой імуофлюоресценції. Ок. х 40

В ході статистичного аналізу показників експресії іNOS в АрЯ гіпоталамуса при ЕАГ, у порівнянні з контролем, було встановлено, що вміст ІРМ був більше на 13,57 % ($p < 0,05$), концентрація ІРМ до іNOS перевищувала відповідний показник контролю на 9,49 % ($p < 0,05$), тимчасом як питома площа достовірних відмінностей не мала (табл. 3.2).

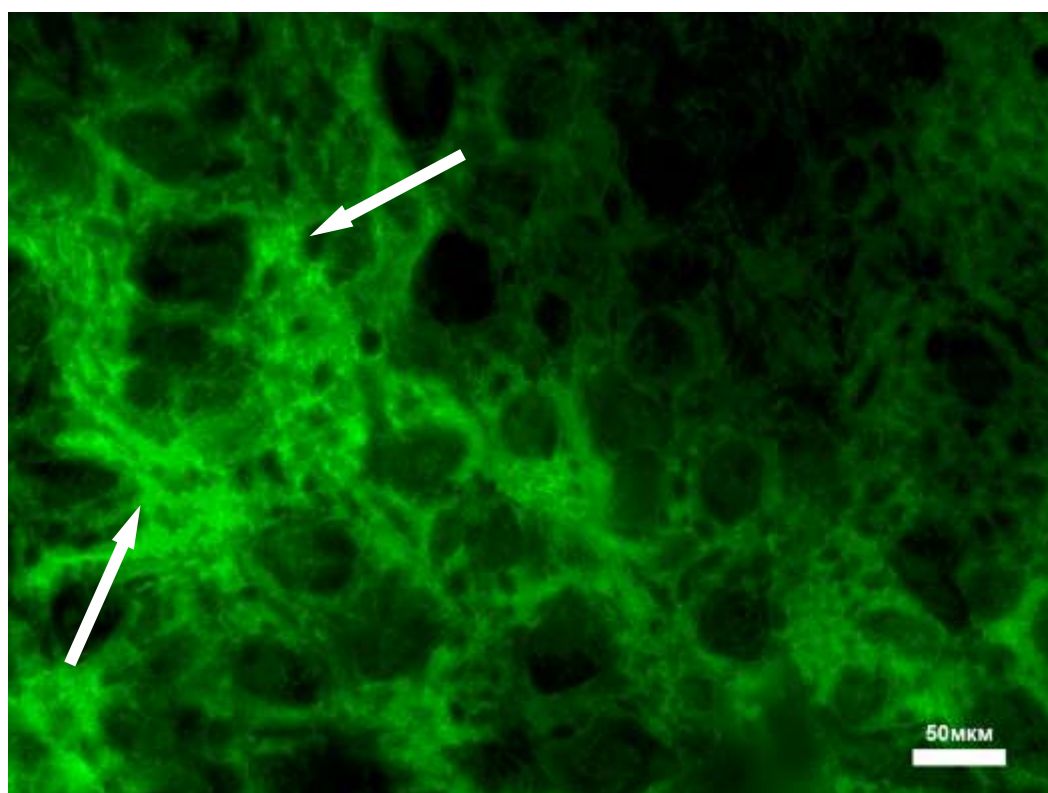
Особливістю експресії іNOS в АрЯ гіпоталамуса при ЕАГ було виявлення інтенсивної флюоресценції не тільки в дорсолатеральному суб'яздрі, але й у вентролатеральній частині АрЯ. ІРМ в цитоплазмі нейронів та їх аксонах розподілявся не тільки дифузно, але й відзначалася висока щільність гранул (рис.3.6)

Таблиця 3.2 – Експресія iNOS в АрЯ гіпоталамуса експериментальних груп ($M \pm m$)

Експериментальні групи n=10	Вміст імунореактивного матеріалу, $OD_{i\phi}$	Концентрація імунореактивного матеріалу, $OD_{i\phi} / \mu\text{км}^2$	Питома площа імунореактивного матеріалу, %
Контрольна група	1207,5±25,04	74,5±1,65	45,1±0,91
ЕАГ	1371,3±26,14 ¹	81,6±1,71 ¹	44,5±0,80
ЕСАГ	1395,4±15,33 ¹	78,7±0,96 ¹	47,9±0,73 ^{1,2}

Примітка 1. (1) достовірні відмінності параметрів ($p < 0,05$) по відношенню до контрольної групи.

Примітка 2. (2) достовірні відмінності параметрів ($p < 0,05$) в групі з ЕАГ по відношенню до групи з ЕСАГ.



Примітка. Стрілками вказано IPM до iNOS

Рисунок 3.6 – Експресія iNOS в нейронах АрЯ гіпоталамуса в щурів з ЕСАГ. Реакція непрямой імунофлюоресценції. Ок. х 40

У групі тварин з ЕСАГ було встановлено, що вміст, концентрація та питома площа ІМР до ферменту, у порівнянні з контролем, були вище на 15,56 % ($p < 0,05$), 5,61 % ($p < 0,05$) і 6,41 % ($p < 0,05$), відповідно (див. табл. 3.2).

Порівняльний аналіз особливостей експресії ферменту в експериментальних групах з АГ показав, що вміст та концентрація ІРМ до іNOS достовірних відмінностей не мали, але в обох моделях були вище, ніж у контрольних щурів із нормальним АТ. За таких умов питома площа ІМР до ізоформи в групі щурів з ЕСАГ на 10,76 % ($p < 0,05$) була вищою, ніж в групі з ЕАГ, що, на нашу думку, може бути пов'язано не тільки із посиленням синтезу ферменту та його накопичення, а й зі збільшенням кількості нейронів, які залучені до цих процесів (див. табл. 3.2).

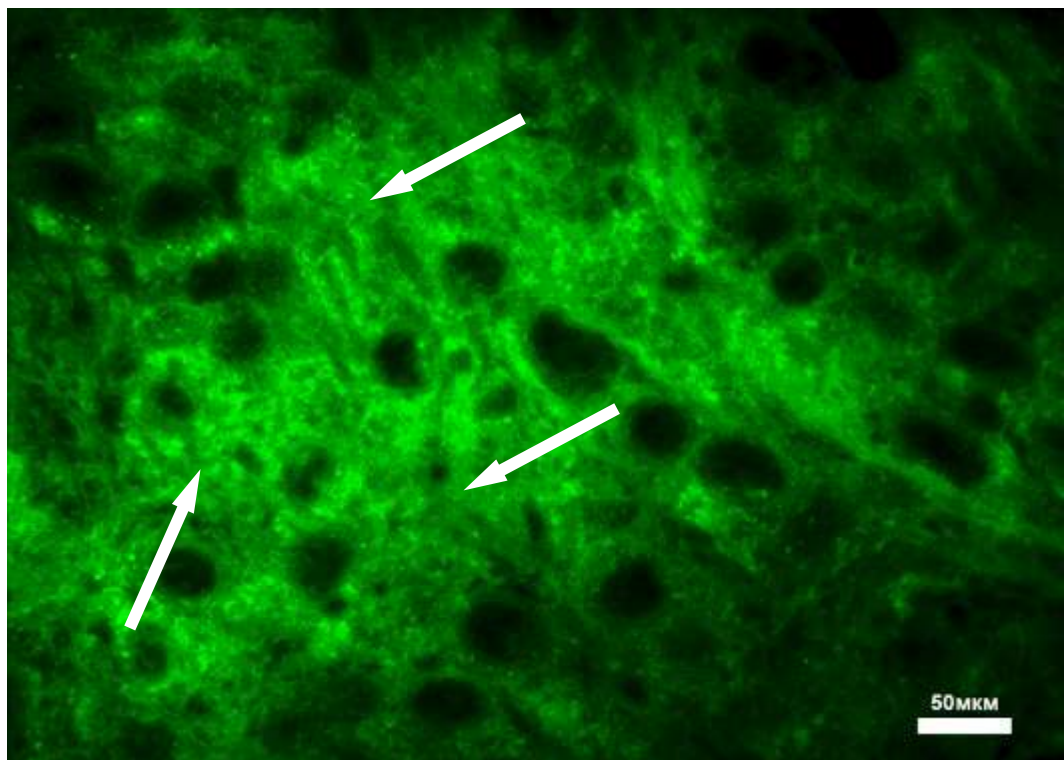
Отримані результати дозволяють стверджувати, що експресія іNOS у щурів контрольної групи з нормальним АТ характеризується локалізацією в дорсолатеральному суб'ядрі АрЯ гіпоталамуса, дифузним розташуванням ІРМ, практично повною відсутністю гранул в цитоплазмі нейронів на тлі поодиноких клітин з високою інтенсивністю флуоресценції. Розвиток АГ в обох моделях супроводжується появою гранул у цитоплазмі клітин, достовірним збільшенням концентрації та вмісту ІРМ до іNOS. Однак є виняток: ЕСАГ має свої особливості експресії іNOS – при неї спостерігається ще і збільшення питомої площі ІРМ до іNOS за рахунок залучення до синтезу нейронів дорсомедіального суб'ядра АрЯ гіпоталамуса.

3.1.3 Особливості показників експресії ендотеліальної NOS в аркуатному ядрі гіпоталамуса щурів експериментальних груп

eNOS є Ca^{2+} -залежним ензимом та відноситься до конститутивних ферментів. Встановлено, що вона локалізована в клітинах ендотелію кровоносних судин та може бути як у розчинній, так і в мембранозв'язаній формі. eNOS відводиться провідна роль у забезпеченні постійного базисного

рівня NO, який асоціюють з реалізацією механізмів локальної ендотеліальної цитопroteкції та підтриманням судинного гомеостазу [148]. Активність базального рівня eNOS залежить від фізіологічного стану організму [148].

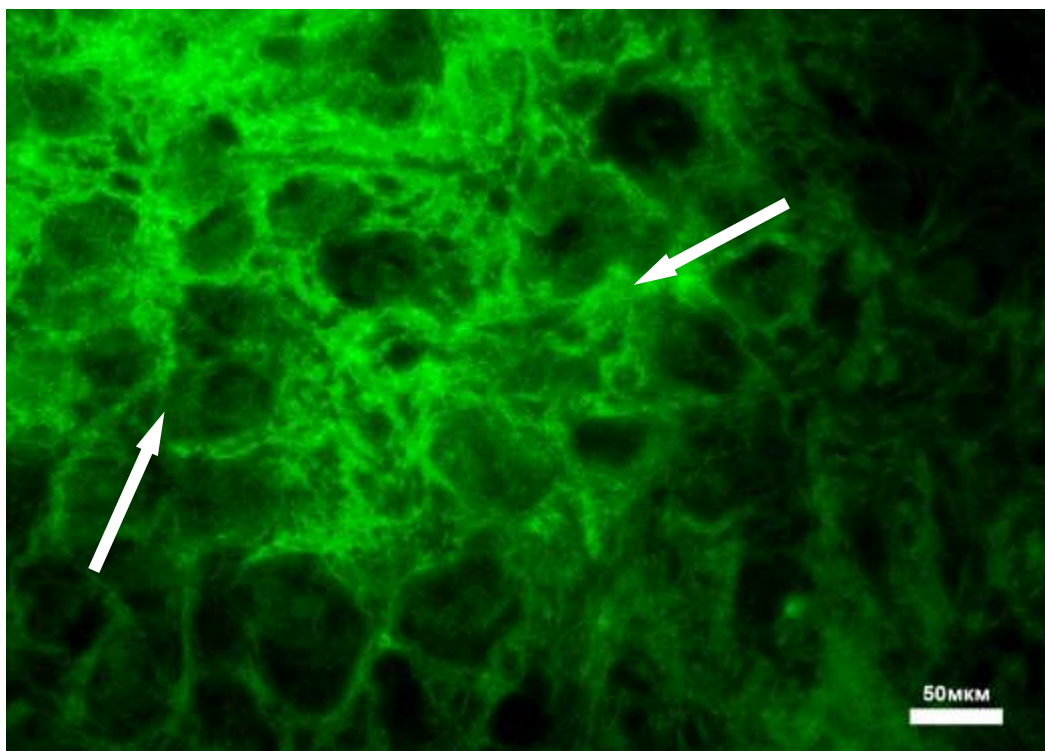
Після проведеного імунофлюоресцентного дослідження експресії eNOS в АрЯ гіпоталамуса щурів контрольної групи виявлено, що IPM був розподілений у суб'ядрі структури неоднорідно, відмічалася найбільш виражена імунофлюоресценція в вентролатеральному суб'ядрі з мінімальним «світінням» у дорсомедіальному суб'ядрі. IPM до eNOS розташовувався як дифузно, так і у вигляді гранул. Візуально імунореактивний матеріал розташовувався в цитоплазмі нейронів та їхніх аксонах (рис. 3.7).



Примітка. Стрілками вказано IPM до eNOS.

Рисунок 3.7 – Експресія eNOS у нейронах АрЯ гіпоталамуса контрольних щурів. Реакція непрямой імунофлюоресценції. Ок. x 40

У групі щурів з ЕАГ спостерігалася висока інтенсивність експресії eNOS, розподіл в суб'ядрі АрЯ був подібним до групи контролю, однак IPM розташовувався в нейронах більш дифузно ближче до мембрани клітини, гранули практично не виявлялися, візуально було відзначено збільшення «темних зон» перинуклеарного простору (рис. 3.8).

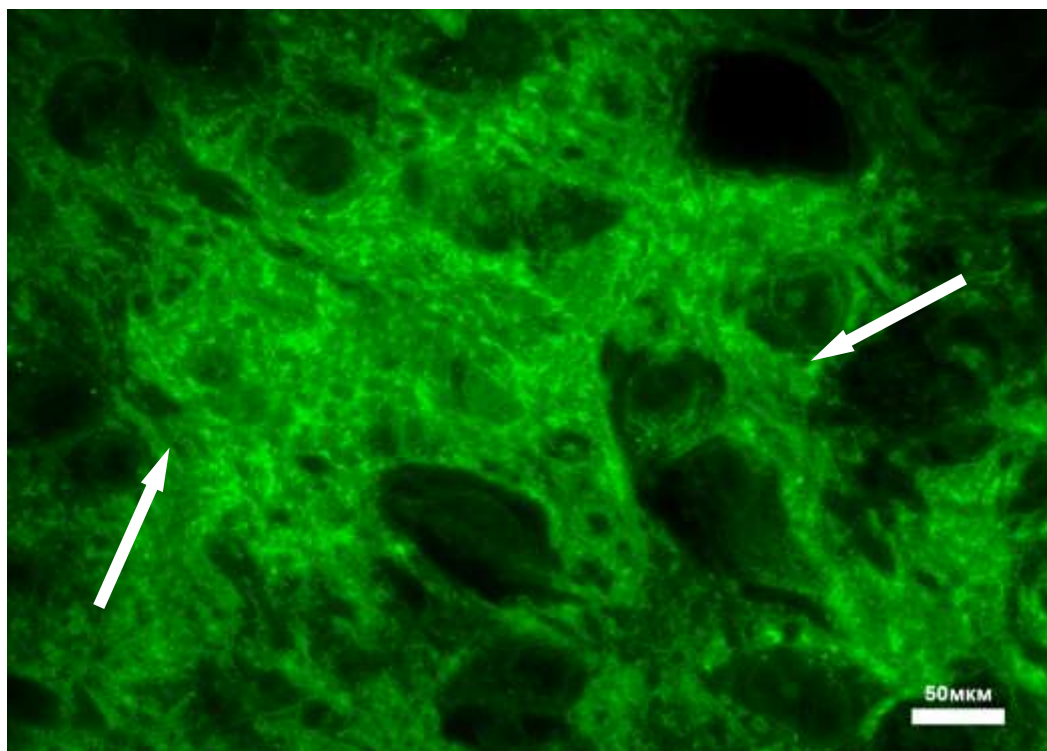


Примітка. Стрілками вказано ІРМ до eNOS.

Рисунок 3.8 – Експресія eNOS у нейронах АрЯ гіпоталамуса в групі з ЕАГ. Реакція непрямой імунофлюоресценції. Ок. х 40

Формування АГ в групі щурів з ЕСАГ характеризувалося істотними візуальними змінами експресії eNOS в АрЯ гіпоталамуса. Було відзначено дифузний розподіл ІРМ у нейронах з повною відсутністю гранул (див. рис. 3.9).

Статистичний аналіз цифрових даних експресії eNOS в АрЯ гіпоталамуса в групі з ЕАГ показав, що як вміст ІРМ до eNOS, так і його концентрація, були достовірно на 6,19 % ($p < 0,05$) та 8,16 % ($p < 0,05$), відповідно, нижче, ніж в групі контролю. Питома площа ІРМ до eNOS достовірно не відрізнялася (табл. 3.3).



Примітка. Стрілками вказано IPM до eNOS.

Рисунок 3.9 – Експресія eNOS у нейронах АрЯ гіпоталамуса щурів з ЕСАГ. Реакція непрямой імунофлюоресценції. Ок. х 40

Таблиця 3.3 – Експресія eNOS в АрЯ гіпоталамуса експериментальних груп ($M \pm m$)

Експериментальні групи n=10	Вміст імунореактивного матеріалу, $О_{диф}$	Концентрація імунореактивного матеріалу, $О_{диф} / мкм^2$	Питома площа імунореактивного матеріалу, %
Контрольна група	1410,2±46,50	80,9±2,56	44,7±0,87
ЕАГ	1289,8±18,02 ¹	73,3±1,07 ¹	44,8±0,79
ЕСАГ	1296,7±20,52 ¹	72,9±1,20 ¹	49,4±0,76 ^{1,2}

Примітка 1. ⁽¹⁾ достовірні відмінності параметрів ($p < 0,05$) по відношенню до контрольної групи.

Примітка 2. ⁽²⁾ достовірні відмінності параметрів ($p < 0,05$) в групі з ЕАГ по відношенню до групи з ЕСАГ.

У групі щурів з ЕСАГ було відзначено зниження вмісту та концентрації IPM до eNOS на 5,7 % ($p < 0,05$) і 8,6 % ($p < 0,05$), відповідно, тимчасом як

питома площа IPM перевищувала аналогічний показник контролю на 9,3 % ($p < 0,05$).

За порівняння показників експресії eNOS в групах з ЕАГ та ЕСАГ встановлено, що вміст та концентрація IPM до ізоформи односпрямовано знижувалися та не мали достовірних відмінностей. За таких умов розподіл IPM в структурі ядра мав особливості та залежав від етіопатогенезу формування АГ. Встановлено, що в групі з ЕСАГ питома площа IPM до eNOS була на 9,3 % ($p < 0,05$) вище, ніж у групі шурів з ЕАГ (див. табл. 3.3).

Проведене дослідження особливостей експресії eNOS в АрЯ гіпоталамуса дозволило встановити, що в контрольних шурів фермент локалізується в його дорсолатеральному суб'ядрі з невисоким ступенем експресії у дорсомедіальній частині, eNOS локалізована дифузно та у вигляді цитоплазматичних гран. Формування АГ у шурів експериментальних груп призводить до втрати гранул, зниження концентрації та вмісту IPM до eNOS, водночас питома площа IPM збільшується виключно в групі з ЕСАГ.

У результаті проведеного дослідження особливостей експресії ізоформ синтази оксиду азоту в АрЯ гіпоталамуса було встановлено, що в шурів з нормальним АТ контрольної групи всі три ізоформи локалізуються переважно в дорсолатеральному суб'ядрі АрЯ гіпоталамуса, eNOS та nNOS ізоформи ферменту розподілені як дифузно, так і у вигляді цитоплазматичних гранул, а проте для індукцібельної форми характерним був дифузний розподіл, відсутність цитоплазматичних гранул, наявність поодиноких клітин з високим ступенем експресії ферменту.

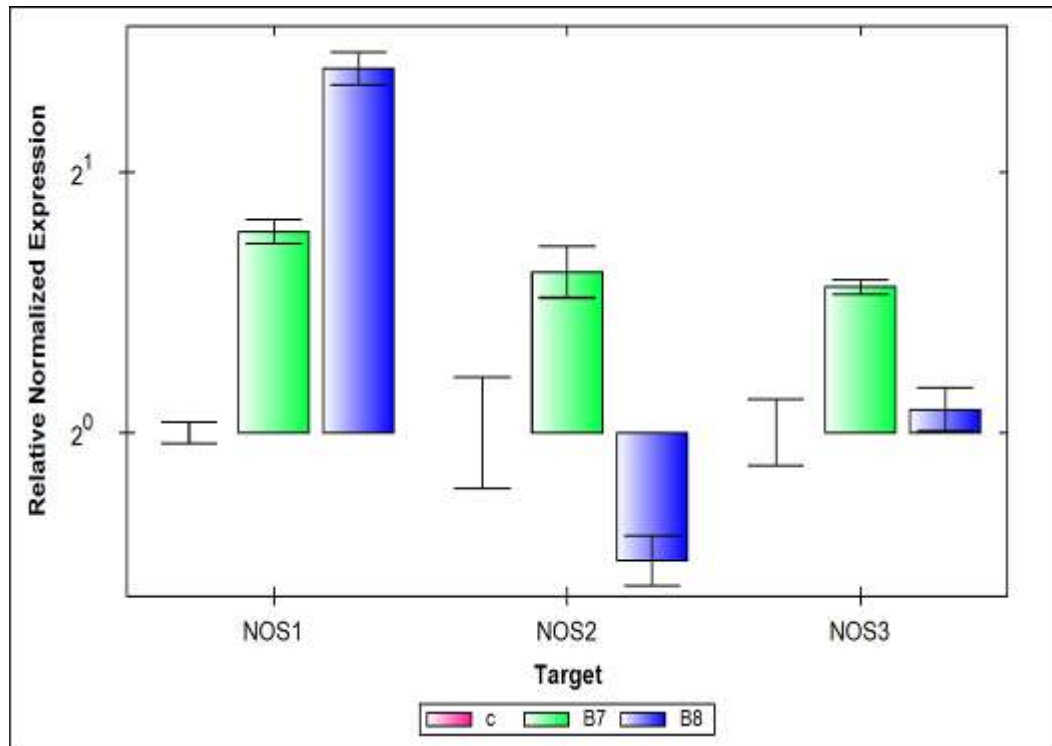
Розвиток АГ призводив до зміни експресії трьох ізоформ ферменту NOS в АрЯ гіпоталамуса. Важливим фактом було встановлення втрати гранул двох ізоформ ферменту – нейрональної та ендотеліальної, на тлі утворення цитоплазматичних гранул з індукцібельної синтазою. Ймовірно, встановлені зміни розподілу eNOS та nNOS пов'язані зі зниженням їхньої концентрації в АрЯ. Однак, вміст цих ізоформ змінювався неоднозначно, спостерігалось зниженням IPM до eNOS і підвищення до nNOS. Питома

площа IPM до трьох ізоформ в групі з ЕАГ не змінювалася, що, скоріше, пов'язано зі збереженням локалізації експресії в дорсолатеральному суб'єдрі АрЯ, тимчасом як в групі з ЕСАГ вона збільшувалася в середньому на 5-9 %, напевно, за рахунок залучення додаткових нейронів дорсомедіального суб'єдра АрЯ гіпоталамуса.

3.2 Показники експресії mRNA nNOS, iNOS та eNOS в медіобазальному гіпоталамусі в щурів експериментальних груп

Сьогодні вже у жодного науковця не викликає сумніву, що визначення мРНК, це високо інформаційний метод оцінки функціональної активності структури, активації відповідних генів та локальних синтетичних процесів. Доведена важлива роль мРНК у «проявленні» відповідних генів. Навіть більше, можна стверджувати, що підвищення експресії мРНК необхідно розглядати як показник стимуляції клітини та, опосередковано, її синтетичної активності. Незважаючи на відомі факти, які доводять, що збільшена експресія мРНК не завжди закінчується трансляцією відповідного білку через індукцію репресії трансляції та активації деградації мРНК, вважаємо, що підвищена експресія відповідної мРНК безпосередньо свідчить про активацію геному клітини, яка пов'язана з дією стимулюючих сигналів для включення адаптаційно-компенсаторних механізмів [151].

Після проведеного дослідження експресії мРНК методом ПЛР було встановлено, що формування АГ призводило до достовірного підвищення експресії мРНК nNOS у групі з ЕАГ на 70 %, а в групі щурів з ЕСАГ на 163 % ($p < 0,05$) по відношенню до контрольної групи (рис.3.10).



Примітка. Зелені стовпчики – кількість мРНК до відповідної ізоформи NOS у щурів із ЕАГ, сині стовпчики - кількість мРНК до відповідної ізоформи NOS у щурів із ЕСАГ.

Рисунок 3.10 – Відносна нормалізована кількість мРНК генів nNOS, iNOS та eNOS

Щодо експресії мРНК генів iNOS, слід відмітити різноспрямованість її кількості та залежність від етіологічного чинника формування АГ. Так, у щурів з ЕАГ було достовірне підвищення експресії мРНК на 53 %, втім як у групі з ЕСАГ відмічалася достовірне зменшення експресії на 30 % ($p < 0,05$) (див. рис. 3.4).

Дослідження кількості мРНК eNOS показали, що в щурів із сформованою АГ, незалежно від етіології, відмічалася достовірне підвищення експресії мРНК у щурів з ЕАГ на 47 % ($p < 0,05$), а в щурів з ЕСАГ на 6 % ($p < 0,05$) (див. рис. 3.4).

Проведене дослідження експресії мРНК ізоформ NOS у гомогенатах медіобазального гіпоталамуса експериментальних щурів показало, що розвиток АГ призводив до зміни їхньої кількості. Проте було встановлено підвищення експресії мРНК конститутивних форм NOS в обох моделях АГ по підношенню до контролю, тимчасом як експресія мРНК iNOS збільшилася тільки в щурів з ЕАГ, а в групі з ЕСАГ, навпаки, зменшилася.

3.3 Рівень кінцевих метаболітів NO у експериментальних щурів

Необхідність визначення рівня нітритів пов'язана із тим, що, утворившись, NO локально виконує свої функції та через декілька секунд метаболізується до кінцевих метаболітів нітритів та нітратів. Саме концентрація нітритів дає змогу кількісно оцінити функціональну активність всієї системи монооксиду азоту [152].

Усього відомо три шляхи метаболізму NO. Перший шлях – це зв'язування NO з атомами заліза гемоглобіну еритроцитів, що призводить до утворення метгемоглобіну, нітратів та нітритів [146-147, 152].

Другий шлях – реакція з супероксиданіоном (O_2^-), у результаті якої утворюється пероксинітрит ($ONOO^-$), який за умов ацидозу призводить до утворення нітритів та гідроксил-радикалу (OH^\cdot) [146-147, 152].

Третій шлях – це реакція з амінами та тіолами, у результаті якої утворюються нітрозаміни та нітрозотіоли [146-147, 152].

Утворення нітритів більшістю відбувається за рахунок здійснення фізіологічних ефектів NO, що утворюється в невеликій кількості переважно конститутивними формами NOS. У той час як накопичення нітротирозину відбувається через превалювання другого та третього шляхів метаболізму NO, які розвиваються частіше при запальних процесах [146-147, 152].

Ураховуючи вище описані особливості кінцевого метаболізму NO, вважаємо, що дослідження рівня нітритів та нітротирозину надасть змогу більш детально оцінити стан та функціональну активність системи монооксиду азоту, визначити основні напрями його метаболізму та припустити можливі вектори зсуення процесів у бік фізіологічних або патологічних.

3.3.1 Рівень нітритів в гомогенатах мозку та плазмі крові в щурів експериментальних груп

Так, після дослідження рівня нітритів у гомогенатах гіпоталамуса щурів було встановлено, що в обох експериментальних групах зі сформованою АГ спостерігалися однотипні зміни. Обидві моделі АГ (щери ЕАГ та щери ЕСАГ) характеризувались достовірним зниження концентрації нітритів на 43 % ($p < 0,05$) та 34 % ($p < 0,05$), по відношенню до контролю. Достовірної різниці концентрації нітритів між експериментальними моделями не було (табл.3.4).

Таблиця 3.4 – Концентрації стабільних метаболітів монооксиду азоту в щурів експериментальних груп ($M \pm m$)

Експериментальні групи n=10	Концентрація нітритів у плазмі крові, мкМ/л	Концентрація нітритів у гомогенатах гіпоталамусу, мкМ/л
Контрольна група	0,82±0,04	8,9±1,43
ЕАГ	0,64±0,05*	5,07±0,46*
ЕСАГ	0,59±0,04*	3,02±0,44*

Примітка. (*) – достовірні відмінності параметрів по відношенню до контрольної групи ($p < 0,05$).

Подібні зміни були відмічені при дослідженні концентрації нітритів у плазмі крові експериментальних тварин. В обох групах з АГ, ЕАГ та ЕСАГ, спостерігалось достовірне їхнє зменшення на 22 % ($p < 0,05$) та 29 % ($p < 0,05$), відповідно (див. табл. 3.4).

Таким чином, після проведеного дослідження було встановлено, що

формування АГ призводить до достовірного зниження концентрації нітритів як у гомогенатах гіпоталамусу, так і в плазмі крові. Отримані факти дозволяють припустити, що зміни стану системи монооксиду азоту при сформованій АГ носять системний характер та розвиваються як на рівні регуляторних центрів гіпоталамусу – АрЯ, так і на периферії.

3.3.2 Рівень ніротирозину в плазмі крові в щурів експериментальних груп

Утворившись у надлишку NO, починає взаємодіяти з супероксид аніоном, що призводить до утворення пероксинітриту (ONOO⁻). Останній призводить до нітрування білків, утворення нітрозотіолів, які підсилюють генерацію активних форм кисню, що сприяє розвитку оксидативного стресу. Важливою ланкою в реалізації токсичної дії ONOO⁻ в організмі є нітрування тирозину (вільного та в складі білків) з утворенням 3-ніротирозину. Існує висока кореляція між інтенсивністю утворення ONOO⁻ та 3-ніротирозину, тому останній розглядають як біомаркер, що відображає інтенсивність утворення ONOO⁻ [152].

Після проведеного дослідження було встановлено, що в щурів обох груп з АГ відмічається достовірне збільшення концентрації ніротирозину: у щурів з ЕАГ на 52 % ($p < 0,05$), у групі з ЕСАГ – майже в 3 рази ($p < 0,05$) в порівнянні з щурами з нормальним АТ. У порівнянні показників груп зі сформованою АГ було відмічено, що в щурів з ЕСАГ концентрація ніротирозину достовірно на 92 % ($p < 0,05$) була більше, ніж у щурів з ЕАГ (табл. 3.5).

Таблиця 3.5 – Концентрація нітротирозину у плазмі крові експериментальних груп ($M \pm m$)

Експериментальні групи n=10	Концентрація нітротирозину в плазмі крові, нМ/л
Контрольна група	16,77±1,30
ЕАГ	25,77±7,02 ¹
ЕСАГ	49,37±6.37 ^{1,2}

Примітка 1. (¹) – достовірні відмінності параметрів по відношенню до контрольної групи ($p < 0,05$);

Примітка 2. (²) – достовірні відмінності параметрів по відношенню до ЕАГ ($p < 0,05$).

В результаті проведеного дослідження було встановлено, що розвиток АГ призводить до підвищення концентрації нітротирозину в плазмі крові, що свідчить про підвищення інтенсивності утворення ONOO- та дозволяє припустити посилення оксидативного стресу при АГ.

Резюме

Загальний результат проведеного комплексного дослідження, а саме аналіз стану системи монооксиду азоту АрЯ гіпоталамусу в експериментальних щурів із сформованою АГ, дозволив зробити декілька проміжних висновків. Формування АГ, незалежно від етіологічного чиннику та механізмів розвитку, призводить до стимуляції відповідних генів конститутивних ізоформ у медіобазальному гіпоталамусі. Трансляція білків-ферментів конститутивних ізоформ у структурі АрЯ гіпоталамусу при ЕСАГ та ЕАГ, ймовірно, знижується, незважаючи на підвищений рівень експресії мРНК nNOS та eNOS. Водночас концентрація ІРМ до них у зрізах АрЯ стає нижче, в порівнянні з показниками контролю. Це супроводжується

зниженням вмісту IPM до eNOS, порівняно з контролем. Однак вміст IPM до nNOS, навпаки, показує більш високе значення, ніж у контролі, що може бути обумовлено підвищеною експресією мРНК даної ізоформи в інших структурах медіобазального гіпоталамусу.

Експресія ферменту iNOS у структурі АрЯ при АГ характеризується суттєвим підвищенням як концентрації IPM, так його вмісту в обох моделях. За такої умови, якщо в щурів з ЕАГ встановлене підвищення пояснюється збільшеним синтезом через підвищену нормовану кількість мРНК ферменту, то при ЕСАГ вона була нижчою. Зниження вмісту нітритів як у гомогенатах медіобазального гіпоталамусу, так і в плазмі крові на фоні підвищення концентрації нітротирозину, можна розглядати як важливе свідчення зсуву вектору метаболізму системи монооксиду азоту з фізіологічного в бік формування активних форм кисню – пероксинітриду з прогресуванням оксидативного стресу.

Таким чином, було встановлено, що стан системи монооксиду азоту АрЯ гіпоталамусу при АГ залежить від етіопатогенезу патології та має свої особливості: при ЕАГ ділянка АрЯ, де розташований IPM до всіх трьох ізоформ, відповідає контрольним значенням, тоді як при ЕСАГ розповсюдженість nNOS та iNOS ізоформ ферменту збільшується, водночас IPM до eNOS, навпаки, зменшується. Крім того, вміст нітритів у гомогенатах медіобазального гіпоталамусу в щурів з ЕСАГ був найнижчим, проте нітротирозин у плазмі показав майже двократне збільшення.

Матеріали розділу відображені в 1 статті та 4 наукових тезах [153-157].

РОЗДІЛ 4

ОСОБЛИВОСТІ ВМІСТУ НЕЙРОПЕПТИДІВ В АРКУАТНОМУ ЯДРІ ГІПОТАЛАМУСУ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ЩУРІВ З АРТЕРІАЛЬНОЮ ГІПЕРТЕНЗІЄЮ

У цьому розділі наведені результати комплексного дослідження експресії пресорних (нейротензин та ангіотензин II) та депресорних (мозковий натрійуретичний пептид (BNP) та β -ендорфін) нейропептидів у структурі АрЯ гіпоталамусу при різних за етіологією АГ (первинною, есенціальною, та вторинною, ендокринно-асоційованою). Оцінку експресії кожного з досліджуваних нейропептидів та їхнього співвідношення проводили шляхом визначення наступних показників: вмісту та концентрації імунореактивного матеріалу в АрЯ гіпоталамусу та питомої площі ІРМ, яку займає нейропептид у структурі ядра. Для більш детального аналізу вмісту, розподілу та співвідношення нейропептидів у структурі АрЯ гіпоталамусу, визначення спрямованості та домінування пресорних або депресорних нейрогормонів було розраховано співвідношення досліджуваних показників, їхньої експресії та проаналізовано особливості зміни депресорно-пресорного коефіцієнту (див. розд. 2. п.п. 2.2.4.1).

Зацікавленість до вивчення вмісту означених нейропептидів пов'язана з вже добре дослідженими контурами регуляції АТ, інтегративним центром яких є гіпоталамус з його ядрами [158-159]. Багато посилань та експериментальних фактів є про роль СОЯ, ПВЯ, СХЯ, АрЯ в системній регуляції судинного тонуусу та об'єму циркулюючої крові (ОЦК), що являють собою складову підтримання середнього гідродинамічного тиску в судинному руслі [158-159].

Слід зазначити, що ключовим координатором та регулятором діяльності, активності та співвідношення внутрішньо- та зовнішньогіпоталамічних центрів є його АрЯ [100, 103-104, 158, 159]. Ця функція реалізується завдяки топографічному розташуванню, кількістю

проекцій у відділі ЦНС, мультирецепторному апарату та широкому спектру нейропептидів, що синтезуються його нейронами або надходять до них [86, 90-99].

Існує думка, що формування АГ може бути пов'язане з дисбалансом пресорних та депресорних нейропептидів у регуляторному центрі вегетативних функцій – АрЯ гіпоталамусу. Проте, відомі дослідження ефектів та вмісту гіпоталамічних нейропептидів при АГ більше спрямовані на визначення ролі пресорних гормонів у регуляції АТ. До того ж, відсутня інформація про зміни експресії нейропептидів за формуванні АГ, не проведено комплексне порівняльне дослідження експресії показників при різних за етіологією АГ.

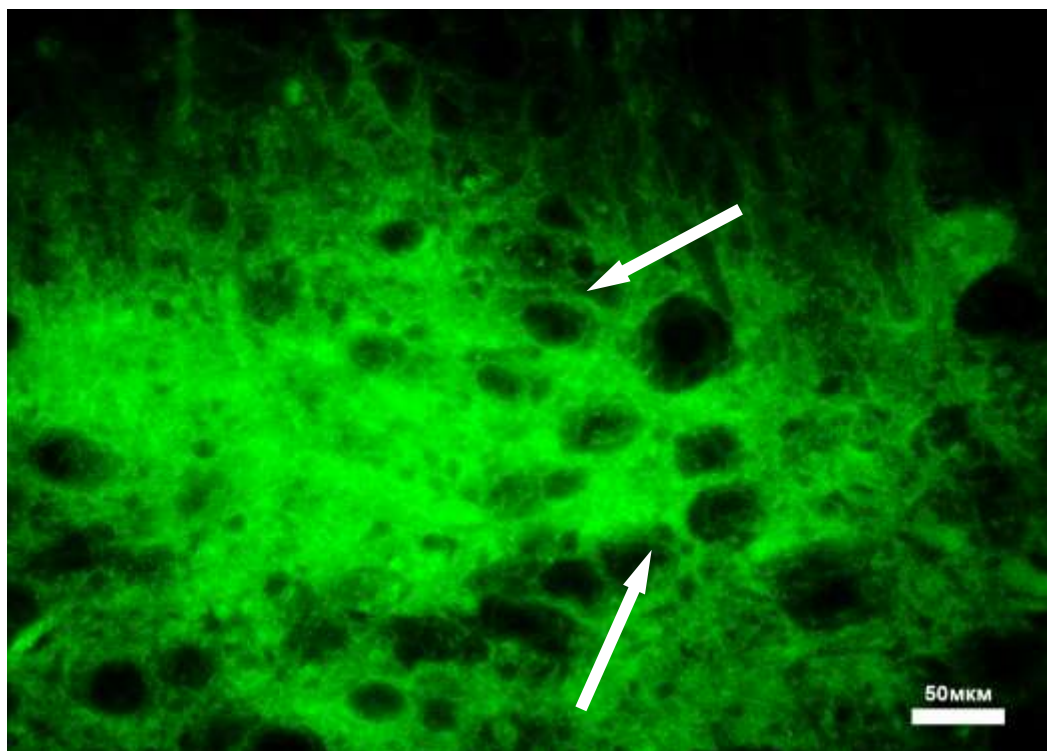
4.1 Особливості вмісту та розподілу нейротензину в аркуатному ядрі гіпоталамусу в щурів експериментальних груп

НТ являє собою тридекапептид, який широко поширений в організмі. За такої умови максимальна концентрація НТ відзначена в гіпоталамусі [160]. Фізіологічний ефект НТ залежить від місця дії та концентрації, причому ряд авторів описують його різноспрямовану дію. Периферична дія характеризується вазоконстрикцією, стимуляцією моторики кишечника, гальмуванням секреції соляної кислоти [161]. Але більш цікавими та непередбаченими описані його центральні ефекти. Так, було встановлено, що при одноразовому внутрішньомозковому введенні НТ приводив до гіпотермії, аналгезії, зниженню АТ та розслабленню м'язів [162]. Доведено, що мозковий НТ грає важливу роль у навчанні тварин та запам'ятовуванні. Цікавими виявилися роботи, в яких було показано, що зміна рівню НТ пов'язана з декількома невропатологічними станами, такими, як хвороба Альцгеймера, порушення настрою та ожиріння [163]. Більш того, патоморфологічно у хворих на есенціальну АГ, було доведено, що у СХЯ гіпоталамусу регуляторні нейропептиди вазопресин, вазоактивний кишковий

поліпептид та НТ зніжені більш ніж на 50 % у порівнянні з контролем. На думку науковців, це пов'язано із суттєвою дисрегуляцією біологічних годинників у хворих на гіпертонічну хворобу [164]. Нажаль, інформації щодо особливостей синтезу та надходження НТ до АрЯ гіпоталамуса недостатньо.

Враховуючи той доведений факт, що НТ синтезується та накопичується в достатній кількості в АрЯ, вважаємо, що дослідження вмісту та розподілу його у важливій регуляторній та координаторній структурі гіпоталамуса буде сприяти розширенню розуміння патогенезу АГ.

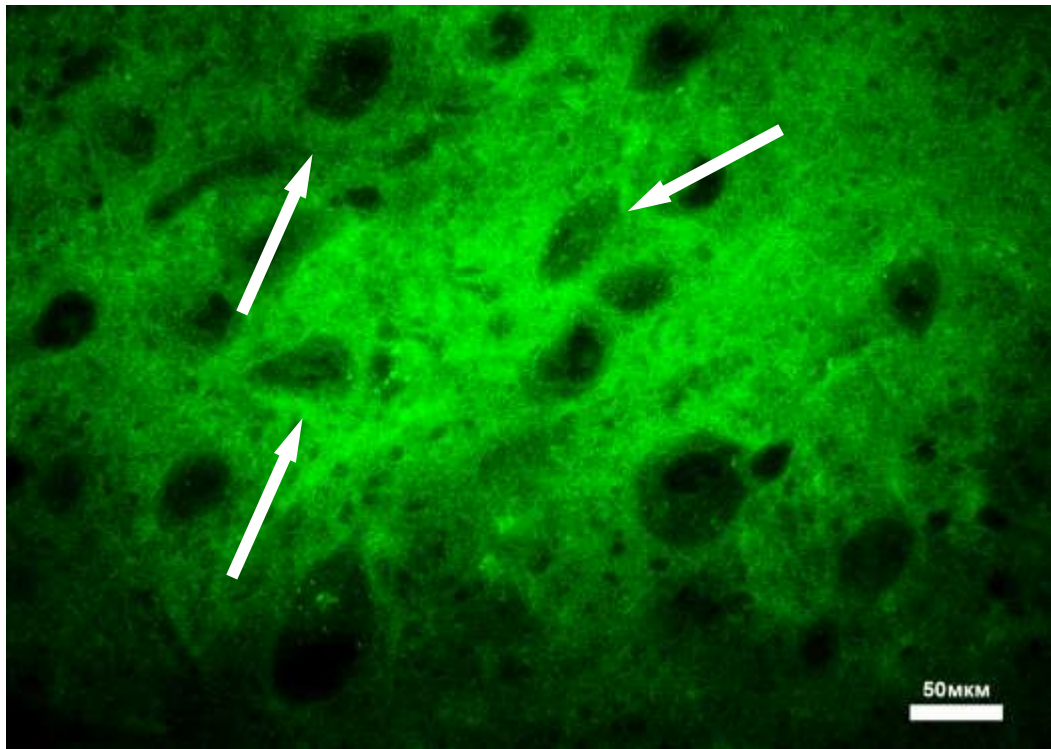
У ході проведеного імунофлуоресцентного дослідження 14 мкм зрізів гіпоталамуса щурів контрольної групи із локалізацією в області III шлуночка з топографічною ідентифікацією в передньому гіпоталамічному полі [135] було встановлено, що в АрЯ візуально ІРМ до НТ розташований неоднорідно, водночас відмічалися нейрони з інтенсивною флюоресценцією. У цитоплазмі нейронів ІРМ розташовувався переважно дифузно (рис. 4.1).



Примітка. Стрілками вказано ІРМ до НТ.

Рисунок 4.1 – Розподіл ІРМ до НТ в нейронах АрЯ гіпоталамуса в контрольних щурів. Реакція непрямой імунофлуоресценції. Ок. х 40

У групі щурів з ЕАГ в АрЯ гіпоталамуса ІРМ до НТ характеризувався також дифузним розташуванням у нейронах. Як і в групі контролю, відмічалися клітини з більш інтенсивною флюоресценцією. У їхній цитоплазмі ІРМ був представлений щільним скупченням одиничних гранул (рис. 4.2)



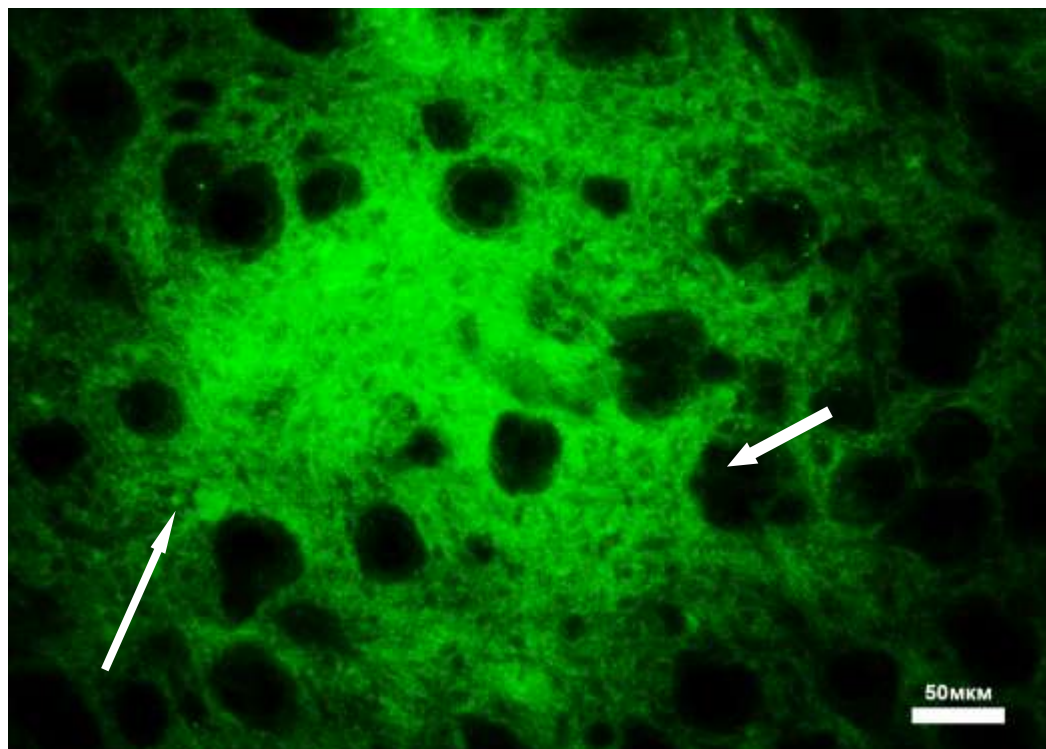
Примітка. Стрілками вказано ІРМ до НТ.

Рисунок 4.2 – Розподіл ІРМ до НТ у нейронах АрЯ гіпоталамуса в щурів з ЕАГ. Реакція непрямой імуофлуоресценції. Ок. х 40

Щодо щурів з ЕСАГ, то розподіл ІРМ до НТ у структурі ядра був подібним до групи контролю. За такої умови ІРМ був розташований дифузно в цитоплазмі нейронів, але візуально, на відміну від групи контролю, всі нейрони мали більш менш однаково інтенсивність флюоресценції. Також, в щурів з ЕСАГ були відсутні гранули з ІРМ, на відміну від щурів з ЕАГ (рис. 4.3).

У ході проведеного цифрового аналізу та статистичного дослідження показників розподілу НТ в АрЯ гіпоталамуса в щурів контрольної групи та

щурів з експериментальними АГ було встановлено, що стійке підвищення АТ супроводжується однотипними змінами експресії НТ за етіологічно різних АГ та характеризується достовірним збільшенням як вмісту, так і концентрації ІРМ у щурів з ЕАГ на 55 % ($p < 0,05$) і 63 % ($p < 0,05$); у щурів з ЕСАГ – на 10 % ($p < 0,05$) і 9 % ($p < 0,05$), відповідно (табл. 4.1).



Примітка. Стрілками вказано ІРМ до нейротензину.

Рисунок 4.3 – Розподіл ІРМ до НТ у нейронах АрЯ гіпоталамуса в щурів з ЕСАГ. Реакція непрямой імунофлуоресценції.

Ок. х 40

Таблиця 4.1 – Експресія нейротензину в АрЯ гіпоталамуса експериментальних груп ($M \pm m$)

Експериментальні групи n=6	Вміст імунореактивного матеріалу, $OD_{i\phi}$	Концентрація імунореактивного матеріалу, $OD_{i\phi}/\mu\text{км}^2$	Питома площа імунореактивного матеріалу, %
Контрольна група	160,144 \pm 3,59	14,969 \pm 0,2	53,418 \pm 0,59
ЕАГ	249,249 \pm 8,53 ¹	24,369 \pm 0,7 ¹	46,017 \pm 0,73 ¹
ЕСАГ	177,708 \pm 3,96 ²	16,347 \pm 0,3 ²	55,144 \pm 0,62

Примітка 1. (¹) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p < 0,05$) порівняно з показниками контролю.

Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників щурів з ЕАГ ($p < 0,05$) порівняно з показниками щурів групи з ЕСАГ.

У щурів з ЕАГ питома площа ІРМ до НТ достовірно була менше на 14 % ($p < 0,05$), ніж у щурів контрольної групи, водночас у тварин з ЕСАГ аналогічний показник був достовірно підвищений на 19 % ($p < 0,05$) по відношенню до контрольної групи (див. табл. 4.1).

Порівняльний аналіз показників експресії ІРМ до НТ в АрЯ гіпоталамуса в щурів з АГ показав, що найбільш високі цифри вмісту та концентрації нейрогормону були відзначені в групі щурів з ЕАГ на 40 % ($p < 0,05$) та 49 % ($p < 0,05$), відповідно, у порівнянні з групою тварин з ЕСАГ. За таких обставин, питома площа ІРМ до НТ була менше на 16 % ($p < 0,05$) (див. табл. 4.1).

Аналіз співвідношення показників експресії НТ у щурів експериментальних груп (контроль:ЕАГ:ЕСАГ) показав, що вміст ІРМ до НТ у групах щурів з АГ по відношенню до контрольної становить 1:1,55:1,1; концентрація ІРМ – 1:1,6:1,4; питома площа – 1:0,86,:1,3.

Отримані факти показали, що формування АГ, незалежно від її етіологічного фактору, призводить до суттєвого підвищення вмісту та

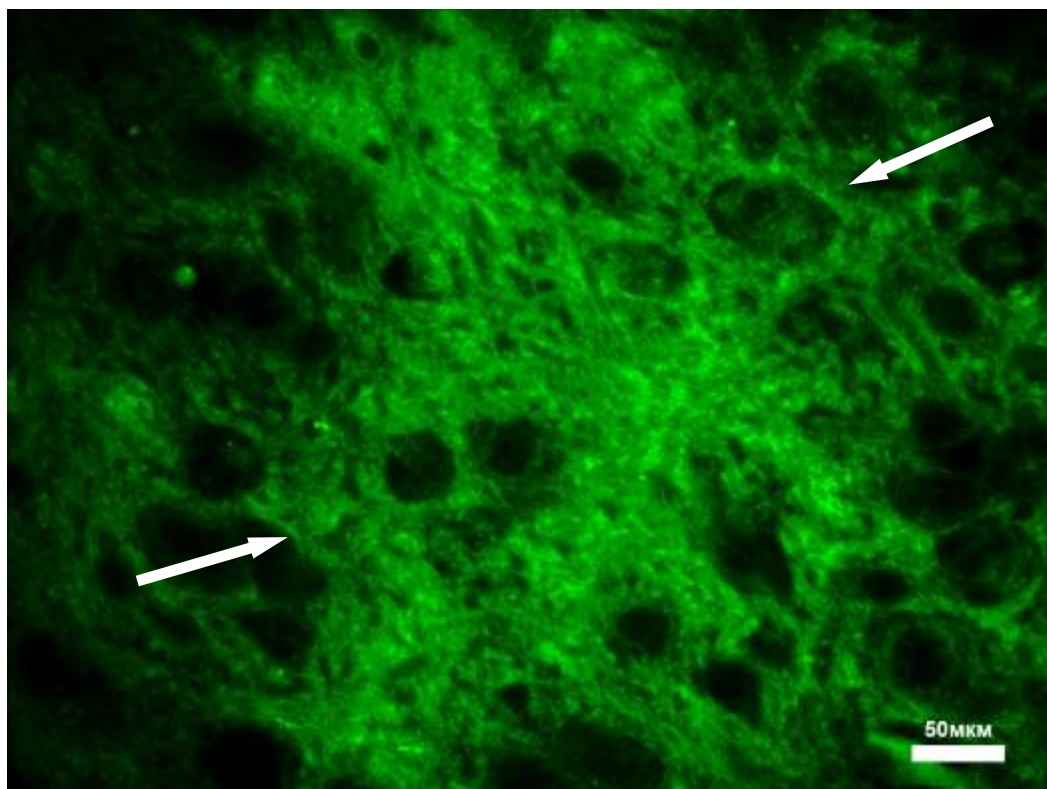
концентрації НТ у структурі АрЯ гіпоталамусу. Ступінь виразності змін мала залежність від типу моделі АГ. Так, в моделі есенціальної первинної АГ, яка розвивалась у щурів SHR (модель ЕАГ), означені показники були найвищими та перевищували показники контролю більш ніж на 50 %. Проте в групі вторинно-асоційованої з ендокринною патологією АГ (модель ЕСАГ) перевищення контрольних значень вмісту та концентрації ІРМ до НТ становило не більше 11 % (див. табл. 4.1).

4.2 Особливості вмісту та розподілу ангіотензину II в аркуатному ядрі гіпоталамуса в щурів експериментальних груп

Ангіотензин II (АГ II) являє собою октапептид, який поширений по всьому організму та чинить як гормональну дію, так і нейромодуляторну. Особливістю АГ II є те, що він не здатен здолати гематоенцефалічний бар'єр, а окремо утворюється як у ЦНС, так і в плазмі крові. Свою фізіологічну роль АГ II чинить за взаємодії зі специфічними рецепторами та відповідає за відчуття спраги, секрецію вазопресину, вазоконстрикцію, пам'ять [165]. Ряд дослідників на чолі з Coote J. показали, що ін'єкції АГ II в АрЯ гіпоталамуса щура призводять до підвищення АТ, при цьому рівень підвищення АТ залежить від концентрації введеного АГ II [165-166].

Враховуючи цей важливий факт безпосереднього впливу АГ II на АТ при позиційному його введенні в АрЯ гіпоталамусу та відсутність даних про особливості вмісту нейрогормону в структурі ядра при сформованих АГ, вважаємо необхідним та доцільним проведення дослідження вмісту АГ II в АрЯ гіпоталамусу при різних за етіологією моделях АГ.

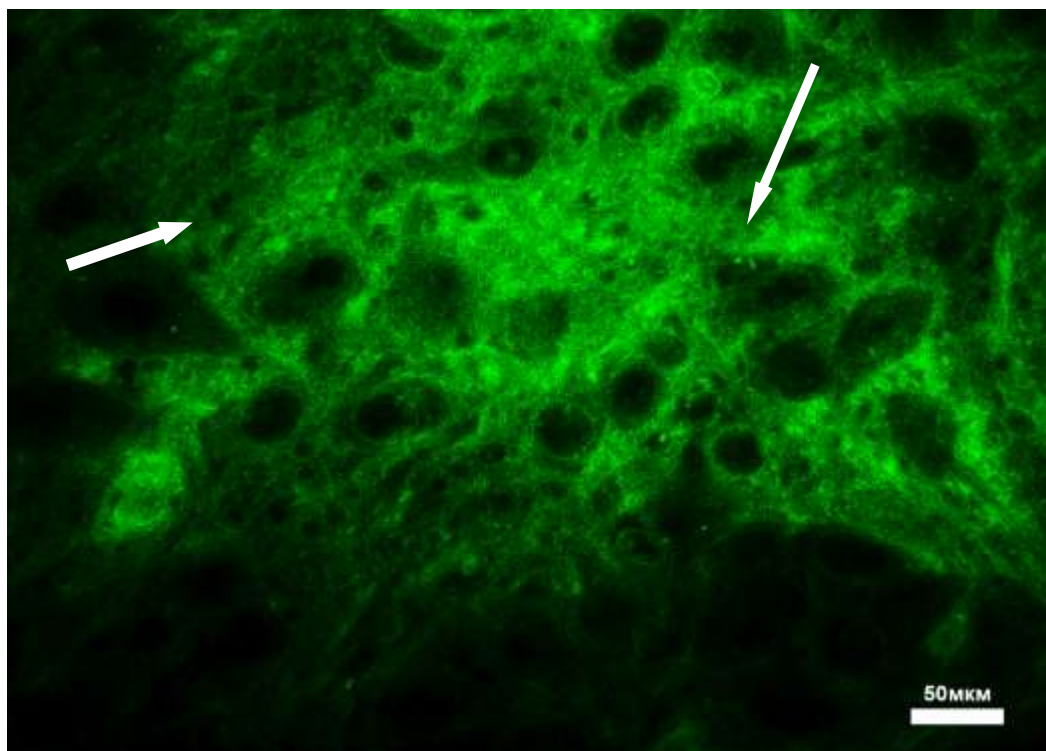
В ході проведеного дослідження зрізів гіпоталамусів щурів контрольної групи було візуально відмічено, що в АрЯ ІРМ до АГ II розташований дифузно з максимальною інтенсивною флюоресценцією біля мембран нейронів та їхніх аксонів (рис. 4.4).



Примітка. Стрілками вказано ІРМ до ангіотензину ІІ.

Рисунок 4.4 – Розподіл ІРМ до ангіотензину ІІ у нейронах АрЯ контрольних щурів. Реакція непрямої імуофлуоресценції. Ок. х 40

У щурів з ЕАГ розподіл ІРМ до АГ ІІ також характеризувався дифузним розподілом з найбільшою інтенсивністю флюоресценції біля мембран нейронів, проте, на відміну від групи контролю, в цитоплазмі нейронів з'явилися поодинокі гранули ІРМ до нейрогормону (рис. 4.5).

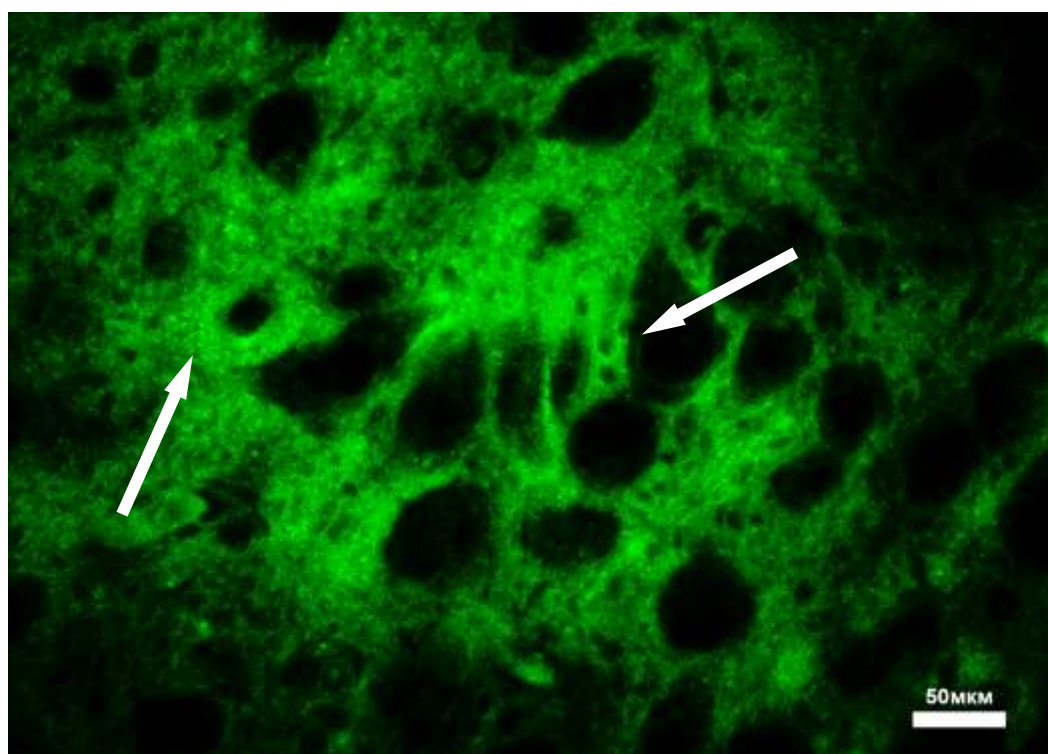


Примітка. Стрілками вказано IPM до ангіотензину II.

Рисунок 4.5 – Розподіл IPM до ангіотензину II у нейронах АрЯ у групі щурів з ЕАГ. Реакція непрямой імуофлуоресценції. Ок. х 40

У щурів з ЕСАГ IPM до АГ II визначався дифузно розподілений біля мембран нейронів, а в їхній цитоплазмі у вигляді гранул (рис. 4.6).

У ході проведеного статистичного аналізу показників розподілу та вмісту АГ II в АрЯ гіпоталамуса в щурів з ЕАГ та в щурів з ЕСАГ було встановлено, що стійке підвищення АГ супроводжується однотипними змінами експресії АГ II за етіологічно різних АГ. Характеризувався достовірним зменшенням як вмісту, так і концентрації IPM до АГ II у щурів з ЕАГ на 72 % ($p < 0,05$) і 70 % ($p < 0,05$), відповідно; у тварин з ЕСАГ – на 53 % ($p < 0,05$) та 59 % ($p < 0,05$), відповідно (табл. 4.2).



Примітка. Стрілками вказано IPM до ангіотензину II.

Рисунок 4.6 – Розподіл IPM до ангіотензину II у нейронах АрЯ в групі щурів з ЕСАГ. Реакція непрямой імуофлуоресценції. Ок. х 40

Таблиця 4.2 – Експресія ангіотензину II в АрЯ гіпоталамуса щурів експериментальних груп ($M \pm m$)

Експериментальні групи n=6	Вміст імуореактивного матеріалу, $Од_{i\phi}$	Концентрація імуореактивного матеріалу, $Од_{i\phi}/мкм^2$	Питома площа імуореактивного матеріалу, %
Контрольна група	$413,34 \pm 0,1$	$39,02 \pm 0,9$	$48,12 \pm 0,7$
ЕАГ	$117,88 \pm 4,4^1$	$12,56 \pm 0,3^1$	$46,59 \pm 0,7^1$
ЕСАГ	$181,53 \pm 5,2^{1,2}$	$16,32 \pm 0,4^{1,2}$	$48,87 \pm 0,6^2$

Примітка 1. (¹) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p < 0,05$) порівняно із показниками контролю.

Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників щурів з ЕАГ ($p < 0,05$) порівняно з показниками щурів групи з ЕСАГ.

У щурів з ЕАГ питома площа ІРМ до АГ ІІ достовірно була менше на 67 % ($p < 0,05$), ніж у щурів контрольної групи, водночас у тварин з ЕСАГ – достовірно не відрізнялася від показників контролю (див. табл. 4.2) .

Порівняльний аналіз показників експресії ІРМ до АГ ІІ в АрЯ гіпоталамуса в щурів різних за етіологією моделей АГ показав, що вміст та концентрація АГ ІІ були нижче в групі щурів з ЕАГ на 36 % ($p < 0,05$) та 25 % ($p < 0,05$), відповідно, у порівнянні з групою тварин з ЕСАГ. Тим часом, питома площа ІРМ до АГ ІІ була достовірно менше на 5 % ($p < 0,05$) (див. табл. 4.2).

Аналіз співвідношення показників експресії АГ ІІ у щурів експериментальних груп (контроль:ЕАГ:ЕСАГ) показав, що вміст ІРМ до АГ ІІ в групах щурів з АГ по відношенню до контрольної становить – 1:0,28:0,43; концентрація ІРМ – 1:0,3:0,4; питома площа – 1:0,97:1,01.

Проведене дослідження показників експресії ще одного пресорного нейропептиду АГ ІІ в АрЯ гіпоталамусу в щурів з експериментальними АГ показало значне зниження вмісту, концентрації та питомої площі у тварин з первинною есенціальною АГ групи ЕАГ, та менш суттєве зниження вмісту та концентрації у тварин групи ЕСАГ.

4.3 Особливості вмісту та розподілу мозкового натрійуретичного пептиду в аркуатному ядрі гіпоталамуса в щурів експериментальних груп

BNP – мозковий натрійуретичний пептид – один з представників сімейства натрійуретичних пептидів, що складається з 32 амінокислотних залишків. Основним місцем синтезу даного нейропептиду є серце, звідки він секретується у кровообіг, поступає переважно у нирки та ЦНС [167-169]. На сьогоднішній день доведено існування трьох видів натрійуретичного пептиду – це передсердний натрійуретичний пептид (ANP), мозковий натрійуретичний пептид (BNP) та натрійуретичний пептид типу С (CNP). Дія

натрійуретичних пептидів здійснюється за рахунок зв'язування зі специфічними рецепторами, що мають гуанілатциклазну активність. Натрійуретичні пептиди є лігандами трьох типів рецепторів: А (NPR-A), В (NPR-B) і С (NPR-C) [167-169].

Рецептори А-типу найбільш широко розповсюджені у судинах, нирках, надниркових залозах. Активація NPR-A призводить до вазорелаксації, підвищення діурезу та натрійурезу, а також пригніченню синтезу альдостерону та клітинної проліферації [167-169].

Рецептори NPR-B типу переважають у мозку, включаючи гіпофіз, і беруть участь у нейроендокринній регуляції [167-169].

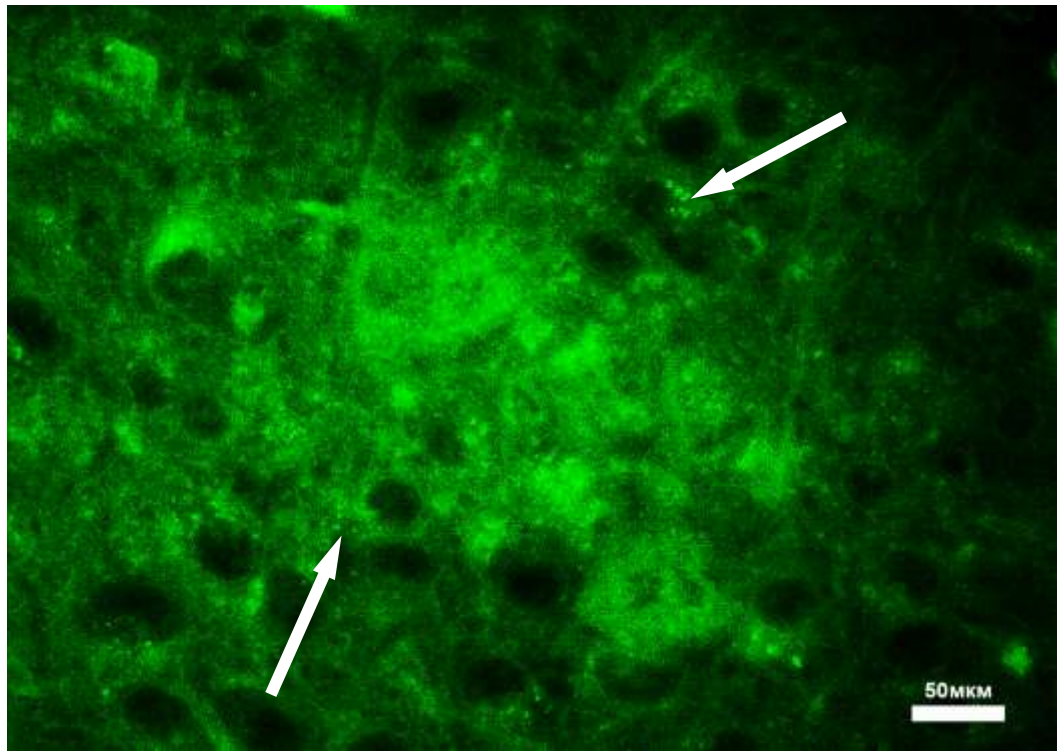
NPR-C типу широко розповсюджені в різних тканинах організму: в ендотелії судин, гладкій мускулатурі, серці, надниркових залозах та нирках. Особливістю цих рецепторів є те, що вони служать для видалення натрійуретичних пептидів з кровообігу, що було доказано експериментально на мишах, нокаутуваних за геном рецепторів С-типу (Npr3) [170].

Особливістю BNP є те, що він здатен чинити як центральну, так і периферичну дію. Потрапляючи у кровообіг, BNP викликає цілий ряд фізіологічних ефектів. Власне, в нирках він діє на рівні клубочків шляхом розширення приносячої артеріоли і одночасного звуження виносячої артеріоли, що призводить до збільшення клубочкової фільтрації. У канальцях дія BNP спрямована на зменшення реабсорбції натрію, що сприяє його виведенню, а також пригнічення синтезу реніну, АГ II і альдостерону [169]. Крім того, відомо, що BNP пригнічує проліферацію гладких м'язів судин і виявляє інгібуючий вплив на симпатичну систему серця [171].

Центральна дія BNP полягає в пригніченні синтезу вазопресину та зниженні симпатичної активності [172-173]. Багато дослідників розглядають BNP як нейротрансмітер, нейромодулятор та нейропротектор [173]. Дуже важливим фактом було знаходження BNP в окремих ядрах гіпоталамусу як в нормі, так і за різної експериментальної патології [172-173].

Враховуючи той важливий факт, що центральні ефекти BNP реалізуються через зміну функціональної активності, перш за все, нейронів ПВЯ та СОЯ ядер гіпоталамусу, впливаючи на синтез та секрецію вазопресину і регулюючи тим самим АТ [174], вважаємо важливим дослідження цього нейропептиду в структурі АрЯ гіпоталамусу – ключового координатора внутрішньогіпоталамічних міждерних взаємин.

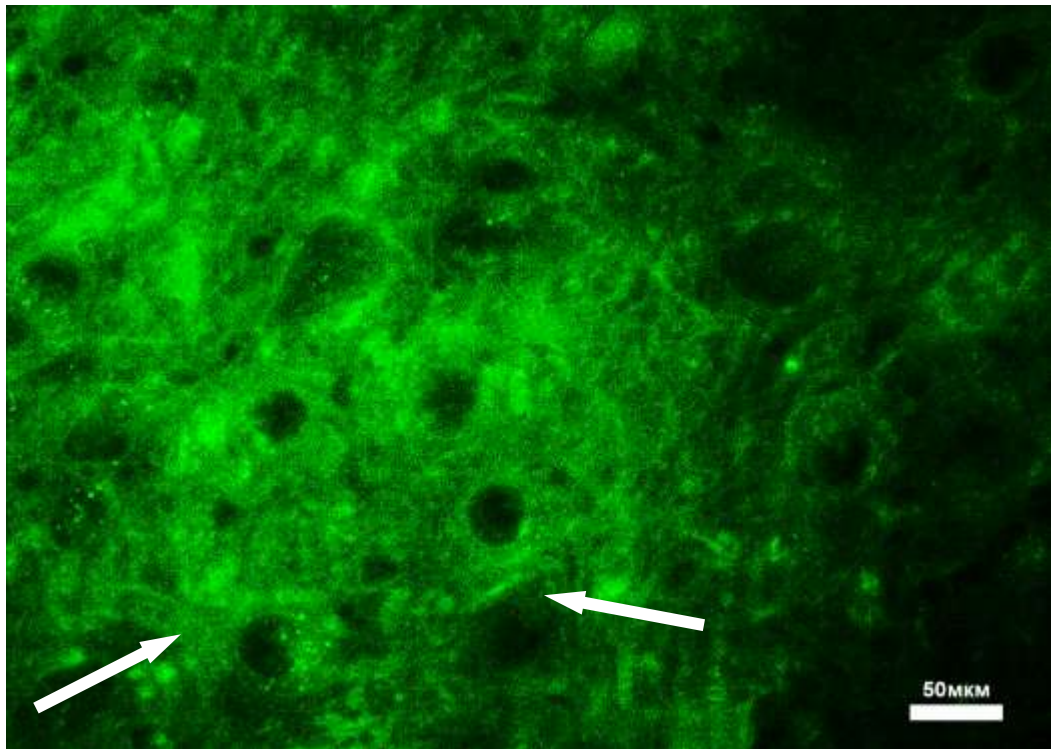
Після проведеного імунофлуоресцентного дослідження експресії BNP в АрЯ гіпоталамусу щурів контрольної групи було виявлено, що ІРМ до BNP був розподілений в структурі неоднорідно. Візуально виділялися зони з найбільш високою інтенсивністю флюоресценції, де ІРМ був у вигляді гранул (рис. 4.7).



Примітки. Стрілками вказано ІРМ до BNP.

Рисунок 4.7– Розподіл ІРМ до BNP у нейронах АрЯ контрольних щурів. Реакція непрямой імунофлуоресценції. Ок. х 40

У щурів з ЕАГ розподіл ІРМ характеризувався появою скупчень гранул ІРМ, які знаходились як у цитоплазмі нейронів, так і в їхніх аксонах (рис.4.8).

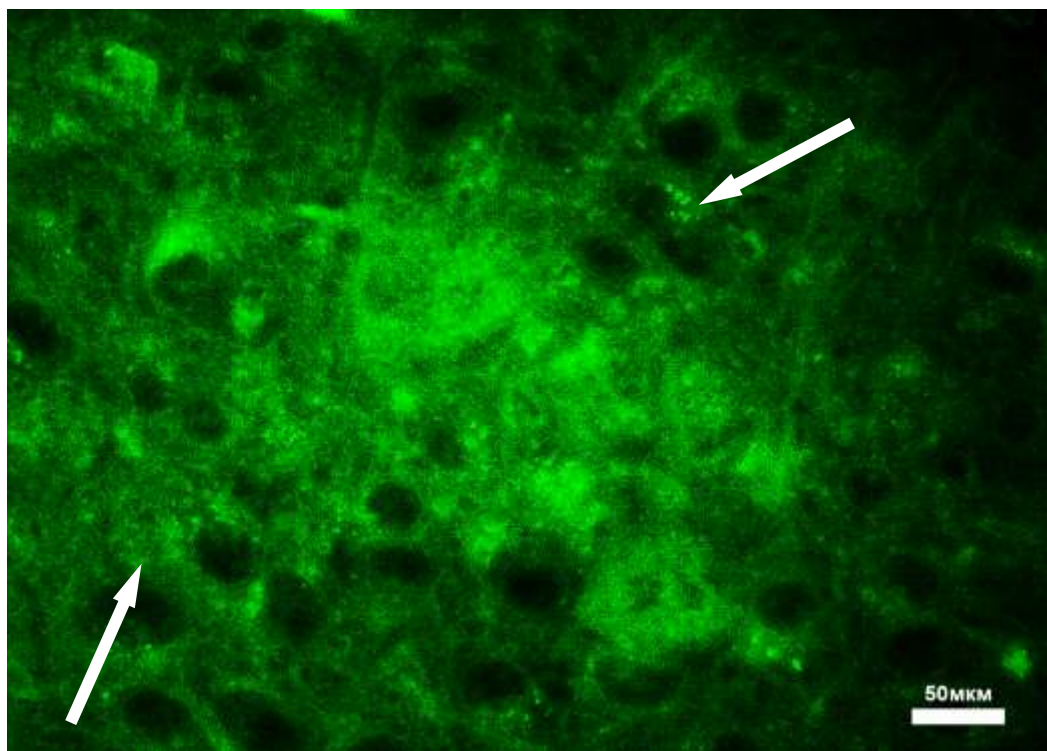


Примітки. Стрілками вказано IPM до BNP.

Рисунок 4.8– Розподіл IPM до BNP у нейронах АрЯ в групі щурів з ЕАГ. Реакція непрямой імуофлуоресценції. Ок. х 40

У щурів з ЕСАГ IPM до BNP був у вигляді гранул та розподілений більш дифузно, ніж у групі контролю. На відміну від контролю, інтенсивність флуоресценції була більш менш однаковою. Особливістю розподілу була поява поодиноких гранул IPM, які візуально виділялися в цитоплазмі нейронів (рис. 4.9).

У ході проведеного статистичного аналізу розподілу BNP в АрЯ гіпоталамуса в щурів з ЕАГ було встановлено, що стійке підвищення АТ супроводжується однотипним зменшенням експресії BNP та характеризується достовірним зменшенням усіх досліджуваних параметрів. Власне, вміст і концентрація IPM у щурів з ЕАГ зменшувалися на 19 % ($p < 0,05$) та 16 % ($p < 0,05$), відповідно. Питома площа IPM достовірно зменшилася на 11 % ($p < 0,05$) (табл. 4.3).



Примітки. Стрілками вказано IPM до BNP.

Рисунок 4.9 – Розподіл IPM до BNP у нейронах АрЯ в групі щурів з ЕСАГ. Реакція непрямой імунофлуоресценції. Ок. x 40

Таблиця 4.3 – Експресія мозкового натрійуретичного пептиду в АрЯ гіпоталамуса експериментальних груп ($M \pm m$)

Експериментальні групи n=6	Вміст імунореактивного матеріалу, $Од_{i\phi}$	Концентрація імунореактивного матеріалу, $Од_{i\phi}/мкм^2$	Питома площа імунореактивного матеріалу, %
Контрольна група	$817,5 \pm 20,95$	$71,2 \pm 1,6$	$45,7 \pm 0,47$
ЕАГ	$662,5 \pm 19,83^1$	$59,9 \pm 1,1^1$	$40,5 \pm 0,82^1$
ЕСАГ	$773,7 \pm 21,13^1$	$65,5 \pm 1,3^{1,2}$	$43,8 \pm 0,65^{1,2}$

Примітка 1. (¹) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p < 0,05$) порівняно з показниками контролю.

Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників щурів з ЕАГ ($p < 0,05$) порівняно з показниками щурів групи з ЕСАГ.

У тварин з ЕСАГ спостерігалась подібна картина. Зокрема, вміст достовірно зменшувався на 9 % ($p < 0,05$), концентрація – на 8 % ($p < 0,05$), питома площа – на 4 % ($p < 0,05$).

При порівнянні показників експресії ІРМ до ВНР між щурами з АГ було встановлено, що в щурів з ЕСАГ вміст достовірно був вищим на 16 % ($p < 0,05$), концентрація більше на 10 % ($p < 0,05$), питома площа перевищувала показник порівняння на 8 % ($p < 0,05$) (див. табл. 4.3).

Аналіз співвідношення показників експресії ВНР у щурів експериментальних груп (контроль:ЕАГ:ЕСАГ) показав, що вміст ІРМ до ВНР у групах щурів з АГ по відношенню до контрольної становить 1:0,81:0,94; концентрація ІРМ – 1:0,84:0,92; питома площа – 1:0,89:0,95.

Отримані факти свідчать, що формування АГ знижує всі досліджуванні показники експресії ВНР в АрЯ гіпоталамусу щурів обох експериментальних груп та доводить, що ступінь зниження експресії нейропептиду залежить від етіо-патогенетичного механізму АГ – найнижчі показники експресії реєструвалися в щурів з ЕАГ.

4.4 Особливості вмісту та розподілу β -ендорфіну в аркуатному ядрі гіпоталамуса в щурів експериментальних груп

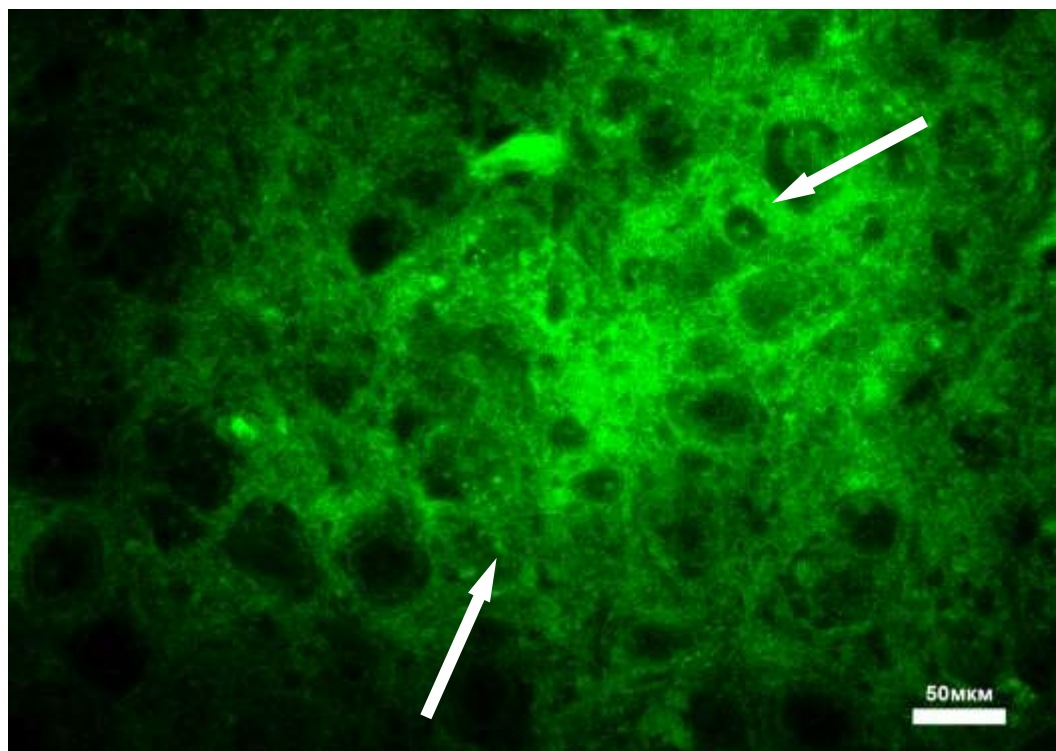
β -ендорфін складається з 31 амінокислотного залишку і належить до сімейства опіодних пептидів, яке представлено «класичними», найбільш поширеними в організмі, ендорфінами, енкефалінами і динорфінами. В організмі β -ендорфін утворюється з проопіомеланокортина, синтезованого в передній долі гіпофіза [174], але вже доведено його синтез в нейронах АрЯ та Т-лімфоцитах [175].

Свої фізіологічні ефекти β -ендорфіни реалізують, зв'язуючись з рецепторами певного типу. Усього вивчено три типи рецепторів, активація яких призводить до аналгетичного та антидепресантного ефектів. Також, за участю даних рецепторів відбувається виникнення судом та формування

фізичної залежності при хронічному зловживанні опіатами. Експериментальним шляхом було доведено, що інтрацеребральне введення β -ендорфіну призводить до тривалої та вираженої аналгезуючої дії [177]. У подальшому було доведено участь β -ендорфіну в процесах регуляції дихання, тонуусу серцево-судинної системи, харчової поведінки, рухової активності [175-177].

Враховуючи той факт, що АрЯ гіпоталамусу є ключовим координатором усіх ядерних структур, які підтримують гомеостаз організму в цілому, а також є місцем синтезу β -ендорфіну, вважаємо необхідним дослідженням вмісту цього нейропептиду в структурі ядра при різних за етіологічними факторами АГ.

Після проведеного імуофлуоресцентного дослідження експресії ІРМ до β -ендорфіну в АрЯ гіпоталамусу щурів контрольної групи було виявлено, що ІРМ розташований дифузно, відмічаються нейрони з візуально більш інтенсивною флуоресценцією у їхній цитоплазмі (рис. 4.10).

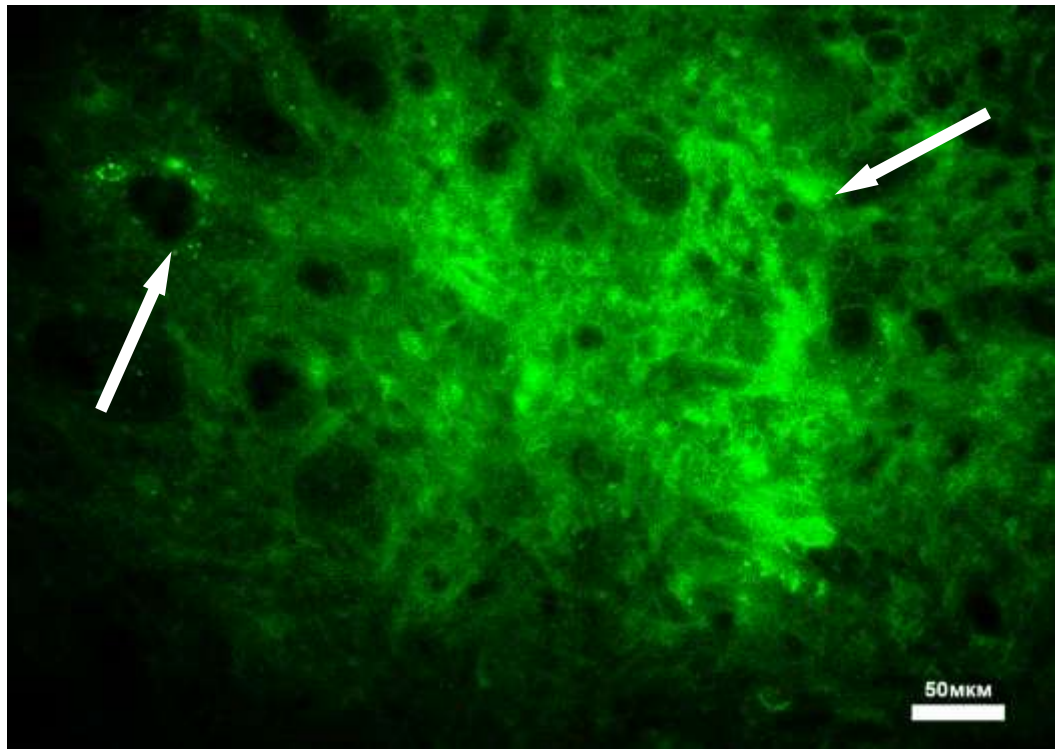


Примітка. Стрілками вказано ІРМ до β -ендорфіну.

Рисунок 4.10 – Розподіл ІРМ у нейронах АрЯ в контрольних щурів.

Реакція непрямой імуофлуоресценції. Ок. х 40

У щурів з ЕАГ ІРМ до β -ендорфіну також був дифузно розташований, але особливістю його експресії було виникнення поодиноких гранул у цитоплазмі нейронів (рис. 4.11).



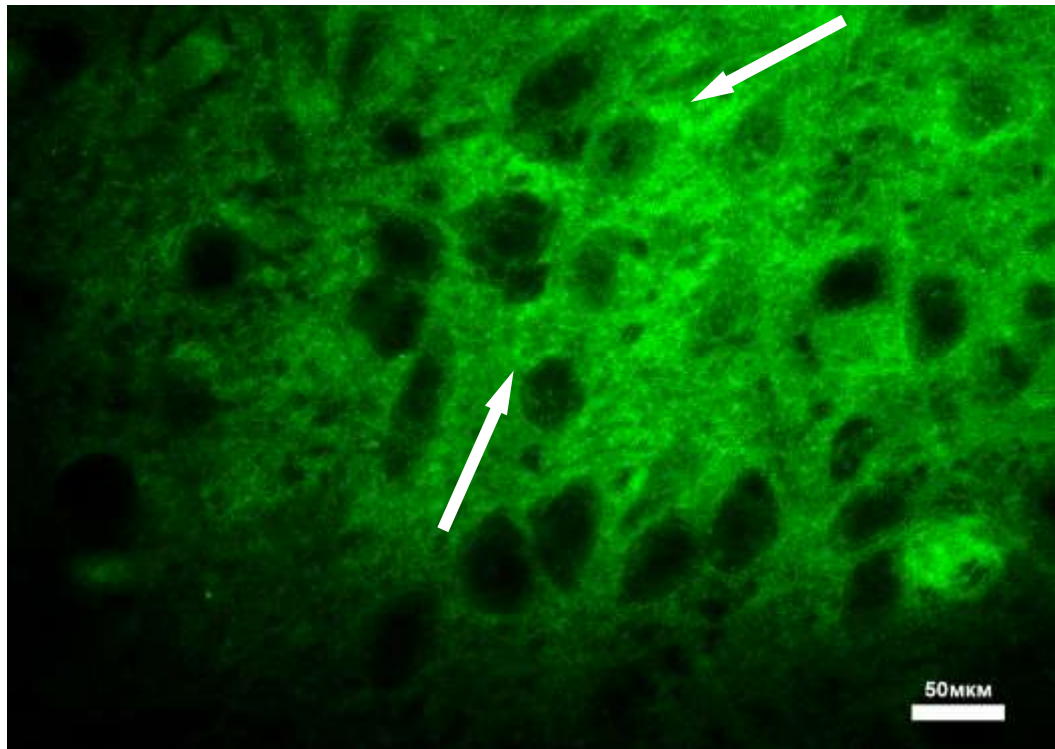
Примітка. Стрілками вказано ІРМ до β -ендорфіну.

Рисунок 4.11–Розподіл ІРМ у нейронах АрЯ у групі щурів з ЕАГ.

Реакція непрямой імуофлуоресценції. Ок. х 40

Розподіл ІРМ до β -ендорфіну в АрЯ гіпоталамусу в щурів з ЕСАГ характеризувався скупченням ІРМ біля мембрани нейронів, а також наявністю поодиноких гранул у їхній цитоплазмі (рис. 4.12).

Після проведеного статистичного аналізу розподілу β -ендорфіну в АрЯ гіпоталамусу було встановлено, що як у щурів з ЕАГ, так у щурів з ЕСАГ, параметри експресії β -ендорфіну були нижче, ніж аналогічні параметри контролю. Зокрема, в щурів з ЕАГ вміст ІРМ до β -ендорфіну зменшився достовірно на 39 % ($p < 0,05$), концентрація на 17 % ($p < 0,05$), питома площа на 22 % ($p < 0,05$) (табл. 4.4).



Примітка. Стрілками вказано ІРМ до β -ендорфіну.

Рисунок 4.12 – Розподіл ІРМ у нейронах АрЯ в шурів з ЕСАГ. Реакція непрямой імуофлуоресценції. Ок. х 40

Таблиця 4.4 – Експресія β -ендорфіну в АрЯ гіпоталамуса експериментальних груп ($M \pm m$)

Експериментальні групи n=6	Вміст імуореактивного матеріалу, $Од_{i\phi}$	Концентрація імуореактивного матеріалу, $Од_{i\phi}/мкм^2$	Питома площа імуореактивного матеріалу, %
Контрольна група	$890,1 \pm 11,83$	$68,9 \pm 0,8$	$53,2 \pm 0,57$
ЕАГ	$545,7 \pm 62,60^1$	$57,2 \pm 3,7^1$	$41,7 \pm 2,86^1$
ЕСАГ	$791,8 \pm 17,77^{1,2}$	$64,2 \pm 1,1^{1,2}$	$50,8 \pm 0,59^{1,2}$

Примітка 1. (¹) – достовірна різниця ($p < 0,05$) порівняно з показниками контролю ($p < 0,05$).

Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників шурів з ЕАГ ($p < 0,05$) порівняно з показниками шурів групи з ЕСАГ.

У шурів з ЕСАГ ці показники були достовірно нижче на 11 % ($p < 0,05$), 7 % ($p < 0,05$) та 4 % ($p < 0,05$), відповідно. У порівнянні показників експресії β -

ендорфіну в моделях із сформованою АГ було встановлено, що в щурів з ЕСАГ вміст ІРМ до β -ендорфіну був достовірно на 45 % ($p < 0,05$) вище, ніж аналогічний показник у щурів з ЕАГ. Концентрація ІРМ та питома площа також були вище в щурів з ЕСАГ на 12 % ($p < 0,05$) та 22 % ($p < 0,05$), відповідно (див. табл. 4.4).

Аналіз співвідношення показників експресії β -ендорфіну в щурів експериментальних груп (контроль:ЕАГ:ЕСАГ) показав, що вміст ІРМ до АГ ІІ в групах щурів з АГ по відношенню до контрольної групи становить – 1:0,61:0,89; концентрація ІРМ – 1:0,83:0,93; питома площа – 1:0,8:0,95 (див. табл. 4.4).

Таким чином, визначенні показники вмісту, концентрації та питомої площі розподілу β -ендорфіну в структурі АрЯ гіпоталамусу щурів груп з ЕАГ та ЕСАГ показали однотипні зміни – відбувалося їхнє зниження нижче показників контролю з найнижчими значеннями в групі щурів з ЕАГ.

4.5 Характеристика депресорно-пресорних взаємовідносин в аркуатному ядрі гіпоталамусу в щурів експериментальних груп

Враховуючи той важливий факт, що в роботі було виконано дослідження експресії в АрЯ гіпоталамусу при експериментальних АГ двох пресорних (нейротензину та ангіотензину ІІ) та двох депресорних (мозкового натрійуретичного пептиду та β -ендорфіну) нейропептидів для розуміння особливостей їхнього балансу та комплексної оцінки депресорно-пресорних взаємовідносин, виявилось необхідним проаналізувати розрахунковий коефіцієнт сумарного вмісту пресорних та депресорних нейропептидів. Розрахунковий аналіз депресорно-пресорних взаємовідносин в аркуатному ядрі гіпоталамусу в щурів експериментальних груп показав, що, незалежно від рівня АТ, у структурі ядра спостерігається переважання, більш ніж у 3 рази, вмісту депресорних нейропептидів. Формування експериментальної АГ супроводжується зниженням показників експресії як депресорних на 41,3 %

($p < 0,05$) у щурів із ЕАГ та на 9,1 % ($p < 0,05$) у щурів із ЕСАГ, так і пресорних нейрогормонів на 56,2 % ($p < 0,05$) та 59,6 % ($p < 0,05$), відповідно (табл. 4.5).

Таблиця 4.5 – Показники депресорно-пресорних взаємовідносин в аркуатному ядрі гіпоталамуса в щурів експериментальних груп ($M \pm m$)

Експериментальні групи n=6	Сумарний вміст ІРМ до ВНР та β -ендорфіну, $О_{д_{i\phi}}$	Сумарний вміст ІРМ до нейротензину та ангіотензину II, $О_{д_{i\phi}}/мкм^2$	Коефіцієнт депресорно-пресорних взаємовідносин
Контрольна група	1707,6 \pm 11,83	573,3 \pm 0,8	3
ЕАГ	1208,2 \pm 62,60 ¹	366,8 \pm 3,7 ¹	3,3
ЕСАГ	1564 \pm 17,77 ^{1,2}	359,2 \pm 1,1 ^{1,2}	4,35

Примітка 1. (¹) – достовірна різниця ($p < 0,05$) порівняно з показниками контролю ($p < 0,05$).

Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників щурів з ЕАГ ($p < 0,05$) порівняно із показниками щурів групи з ЕСАГ.

Однак, визначення розрахункового коефіцієнту депресорно-пресорних взаємовідносин показав, що, незважаючи на загальне зниження вмісту як пресорних, так і депресорних нейрогормонів, відбувалось порушення їхнього нормального співвідношення. Зокрема, якщо у щурів із нормальним тиском відмічалось 3-разове переважання депресорних нейропептидів, тимчасом формування стійкого підвищення АТ призводило до зсуву коефіцієнту в бік збільшення пресорного навантаження. Власне, в щурів із моделлю ЕАГ він становив 3,3, а в щурів із моделлю вторинної, ендокринно-асоційованої АГ, він, взагалі, збільшився до 4,35.

Резюме

Проведене комплексне імуногістохімічне дослідження показників експресії пресорних та депресорних нейропептидів у структурі АрЯ гіпоталамусу при різних за етіологією (первинною есенціальною та

вторинною, ендокринно-асоційованою) АГ дозволило вивчити особливості вмісту та розподілу в структурі АрЯ важливих регуляторів АГ – нейротензину, ангітензину II, мозкового натрійуретичного пептиду та β -ендорфіну, довести особливості депресорно-пресорних взаємовідносин, визначити етіопатогенетичні відмінності балансу пресорно/депресорних нейропептидів.

Встановлено, що формування АГ, незалежно від її етіологічного фактору, призводить до суттєвого підвищення вмісту та концентрації нейротензину в структурі АрЯ гіпоталамусу. Ступінь виразності змін має залежність від типу моделі АГ. Зокрема, в моделі есенціальної первинної АГ, яка розвивалась у щурів SHR (модель ЕАГ) означені показники були найвищими та перевищували показники контролю більш ніж на 50 %. Тимчасом, у групі вторинної, асоційованої з ендокринною патологією АГ (модель ЕСАГ), перевищення контрольних значень вмісту та концентрації ІРМ до НТ становило не більше 11 %.

Експресія ще одного пресорного нейропептиду ангіотензину II в АрЯ гіпоталамусу в щурів з експериментальними АГ, навпаки, знижувалась, власне, вміст і концентрація у тварин з ЕАГ були нижчими на 72 % та 70 %, у тварин з ЕСАГ – на 53 % та 59 %, відповідно.

Було виявлено, що АГ призводить до зниження експресії обох досліджуваних депресорних нейропептидів в АрЯ гіпоталамусу. При цьому у щурів з ЕАГ вміст, концентрація та питома площа ІРМ до VNP ставали вірогідно менше показників контролю на 19 %, 16 % та 11 %, відповідно; тимчасом ІРМ до β -ендорфіну показав зниження вмісту на 39 %, концентрації на 17 %, питомої площі на 22 %.

Окремо необхідно зазначити, що більш суттєві відмінності як підвищення рівня нейротензину, так і зниження АГ II, VNP та β -ендорфіну були більш виразними в щурів з ЕАГ.

Таким чином, можна зробити висновок, що формування експериментальної АГ, незалежно від етіо-патогенетичних механізмів її

розвитку, супроводжується збільшення експресії нейротензину на фоні зниження показників експресії обох депресорних неропептидів BNP і β -ендорфіну та пресорного нейрогормону АГ II. При цьому, загальний вміст як пресорних, так і депресорних нейропептидів, значно зменшується. Однак, незважаючи на загальне зниження їхнього вмісту, відбувається порушення нормального співвідношення. Отже, якщо в щурів із нормальним тиском характерне 3-разове переважання депресорних нейропептидів в АрЯ, то формування стійкого підвищення АГ призводить до зсуву коефіцієнту в бік збільшення пресорного навантаження та підвищення коефіцієнту в щурів із первинною есенціальною АГ до 3,3 та вторинною, ендокринно-асоційованою, до 4,35.

Матеріали розділу відображені в 4 статтях та 5 наукових тезах [178-186].

РОЗДІЛ 5

МОРФО-ДЕНСИТОМЕТРИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕЙРОНІВ АРКУАТНОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСУ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ЩУРІВ З АРТЕРІАЛЬНОЮ ГІПЕРТЕНЗІЄЮ

Використовуючи метод гістохімічного дослідження морфо-денситометричних параметрів ядер нейронів АрЯ гіпоталамусу, було визначено їхні морфометричні та денситометричні характеристики, а саме, визначена середня площа ядер, вміст та концентрація в них гетерогенної РНК. Окрім того, використовуючи програми Image J та Statistica 10.0 при аналізі масиву даних лінійних характеристик ядер нейронів, було проведено структурно-популяційний аналіз чисельності клітин кожного окремого суб'ядра (вентромедіального, дорсомедіального та вентролатерального) аркуатного ядра гіпоталамусу за площею їхніх ядер. Слід зазначити, що були проаналізовані особливості змін досліджуваних параметрів ядер нейронів АрЯ гіпоталамусу при етіологічно різних моделях АГ.

Використання класичного гістохімічного методу в мікроскопії для дослідження морфо-функціонального стану структур мозку, незважаючи на широке розповсюдження більш сучасних іммуноцитохімічних, молекулярно-генетичних та радіоімунологічних методів, залишається достатньо інформативним. Більш того, у поєднанні із програмами, що надають кількісну характеристику визначеним параметрам, стає високо ревалентним.

Вже давно було встановлено, що у відповідь на стимуляцію нейрон може змінювати свої розміри та тинкторіальні властивості. Для активованих нейронів характерним є накопичення гетерогенної РНК та білків. Отже, підвищення функціональної активності нервової системи буде проявлятися цитохімічно перебудовою пластичного та енергетичного обмінів нейронів, збільшенням розмірів клітин та їхніх структур, підвищенням концентрації і вмісту РНК [187]. Відповідно, збільшення площі ядер нейронів у поєднанні зі

збільшенням вмісту РНК можна розглядати як підвищення функціональної активності структури, разом з тим, зменшення цих показників, навпаки, будуть свідчити про її пригнічення. Однак, необхідно відмітити, що структура АрЯ неоднорідна, нейрони, що входять до її складу, знаходяться у різних фазах функціональної активності. До того ж, кількість клітин, що одночасно активні або пригнічені, залежить від топографічної приналежності відповідному суб'ядру (дорсомедіальному (дм-АрЯ), вентромедіальному (вм-АрЯ) чи вентролатеральному (вл-АрЯ) [86]), локальних нейро-трофічних процесів та функціонального стану організму в цілому (рис. 5.1).

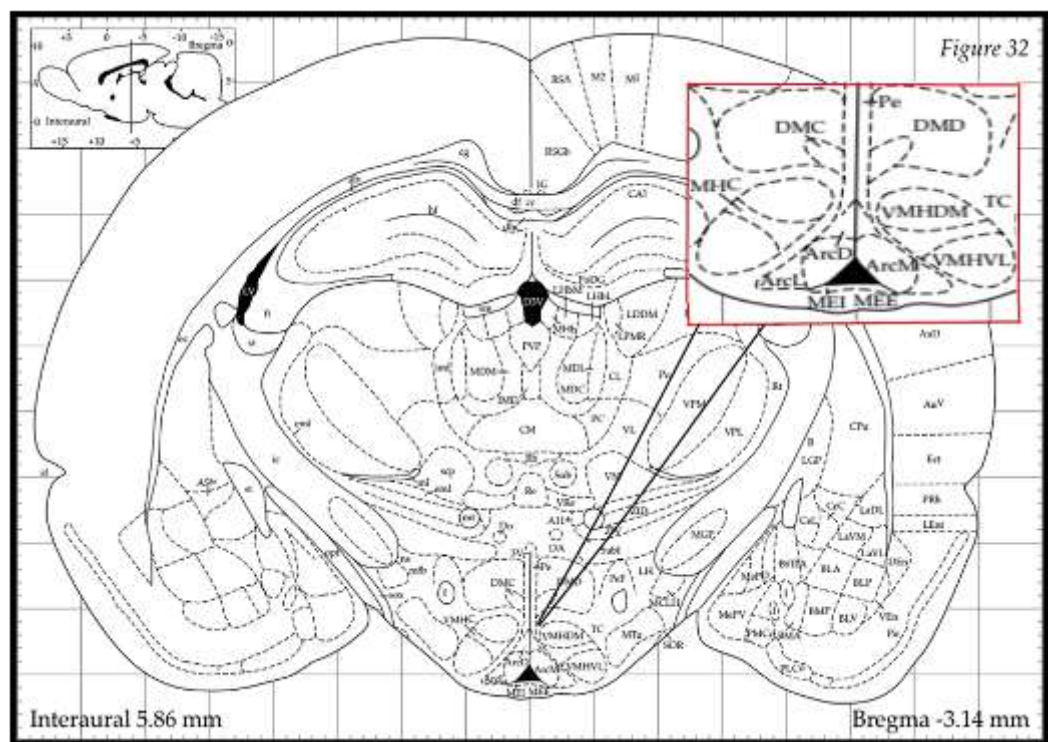


Рисунок 5.1 – Локалізація суб'ядер аркуатного ядра гіпоталамуса [135]

Щодо питання неоднорідної морфо-функціональної активності нейронів окремих суб'ядер АрЯ гіпоталамусу при експериментальній патології, слід відмітити обмаль фактів. Майже відсутні дані про комплексну характеристику активності популяції нейронів, в залежності від локалізації, типу патології, синтетичної активності клітин та наявності комплексу нейропептидів, що синтезуються або надходять до відповідного суб'ядра.

Саме ці параметри були покладені до принципу розподілу АрЯ на парні суб'ядра. Це, по-перше, особливості топографічного розташування нейронів по обидві сторони третього шлуночку (дм-АрЯ розташовано нижче та дорсально від *commisura cerebri anterior*, вм-АрЯ розташовується між суб'ядрами дм-АрЯ та вл-АрЯ; вл-АрЯ розташовано дорсально та латерально від вм-АрЯ – див. рис. 5.1) [86, 97]. По друге, це характер синтезованих у них нейропептидів (нейрони дм-АрЯ синтезують дофамін, ГАМК, галанін [108-109]; у вм-АрЯ – соматостатин та нейротензин [111-112]; у вл-АрЯ виявлені соматоліберін, галанін, ГАМК, ацетілхолін, тіроліберін, дінорфін, нейротензін, проопіомеланокортін, субстанція Р, АКТГ, β -ендорфін, α -МСГ, γ -МСГ. У всіх трьох суб'ядрах АрЯ ідентифіковані NPY/AgRP-синтезуючі нейрони [108-109, 111-112, 118].

Враховуючи особливості розташування та синтезу комплексу нейропептидів у суб'ядрах АрЯ, велику кількість визначених нейрогормонів і складність дослідження кожного окремого, для отримання загальної та об'єктивної оцінки морфо-функціонального стану нейронів АрЯ гіпоталамусу вважаємо доцільним визначення морфо-денситометричних параметрів ядер нейронів АрЯ із структурним каріометричним аналізом популяції клітин у кожному окремому суб'ядрі.

5.1 Морфо-денситометричні показники ядер нейронів дорсомедіального суб'ядра АрЯ гіпоталамуса в щурів експериментальних груп

Особливістю дм-АрЯ суб'ядра гіпоталамусу є наявність великої кількості еферентних проєкцій до вентромедіального та паравентрикулярного ядер гіпоталамусу. Рецепторний апарат характеризується наявністю високої щільності рецепторів до лептину та естрадіолу [188]. Саме ці його властивості обумовлюють високу значущість

дм-АрЯ в регуляції адапційних процесів, стрес-реакції та харчової поведінки.

У ході візуалізації забарвлених за Ейнарсоном [134] зрізів у регіоні АрЯ гіпоталамусу звертало на себе увагу дрібне розташування нейронів із добре окресленими ядрами та ядерцями (рис. 5.2).

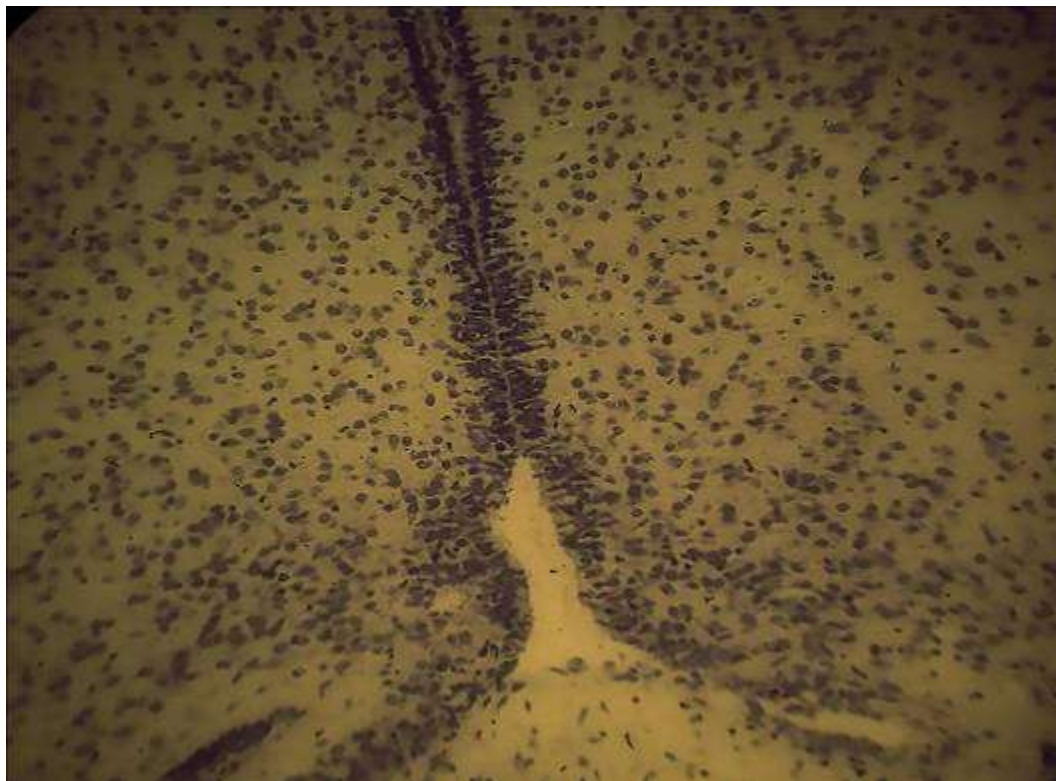


Рисунок 5.2 – Нейрони дм-АрЯ гіпоталамусу. Забарвлення галоціанин-хромовими галунами за Ейнарсоном. Ок. х 20

Проведений цифровий аналіз морфометричних показників площі ядер нейронів дм-АрЯ показав, що формування АГ призводить до достовірних змін в останніх. Було визначено, що ці зміни залежали від етіопатогенезу АГ. Зокрема, в щурів з ЕАГ відмічалось достовірне збільшення площі ядер нейронів на 5 % ($p < 0,05$) по відношенню до контрольної групи. В той час як у щурів з ЕСАГ, навпаки, площа ядер нейронів достовірно зменшилась на 8 % ($p < 0,05$) (табл.5.1).

Таблиця 5.1 – Морфо-денситометричні показники ядер нейронів дорсомедіального суб'ядра АрЯ в щурів експериментальних груп ($M \pm m$)

Показники	Контроль, n=10	ЕСАГ, n=10	ЕАГ, n=10
Площа ядер нейронів, мкм ²	58,42±0,91	54,24±0,81 ¹	61,16±1,24 ^{1,2}
Вміст РНК, Од	294,32±5,07	225,09±3,28 ¹	309,21±7,79 ^{1,2}
Концентрація РНК, Од/мкм ²	0,51±0,008	0,41±0,005 ¹	0,46±0,008 ^{1,2}

Примітка 1. (¹) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p < 0,05$) порівняно з показниками контролю.

Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників щурів з ЕАГ ($p < 0,05$) порівняно з показниками щурів групи з ЕСАГ.

За порівняння цифрового показника площі ядер нейронів у щурів із змодельованими АГ було встановлено достовірно більш високе її значення в щурів з ЕАГ на 12 % ($p < 0,05$) по відношенню до щурів з ЕСАГ (див. табл. 5.1).

При аналізі денситометричних показників було встановлено, що значення вмісту гетерогенної РНК у ядрах нейронів АрЯ гіпоталамусу достовірно відрізнялися від показників контролю та мали свою особливість у кожній експериментальній моделі. Зокрема, в щурів з ЕАГ вміст гетерогенної РНК підвищувався на 5 % ($p < 0,05$) по відношенню до контрольної групи. У щурів з ЕСАГ, навпроти, вміст гетерогенної РНК зменшувався на 24 % ($p < 0,05$) (див. табл. 5.1).

Порівняно з контролем було встановлено, що формування АГ, незалежно від патогенетичного механізму, призводило до односпрямованих змін концентрації гетерогенної РНК та характеризувалося більш низькими значеннями в щурів з ЕАГ на 10 % ($p < 0,05$), у щурів з ЕСАГ на 20 % ($p < 0,05$). Проте за порівняння аналогічних показників серед груп із сформованою АГ було встановлено, що концентрація гетерогенної РНК у щурів з ЕАГ була вищою на 12 % ($p < 0,05$) по відношенню до щурів з ЕСАГ (див. табл. 5.1).

Таким чином, проведений аналіз показав, що формування АГ суттєво змінює морфо-денситометричні характеристики ядер нейронів дм-АрЯ гіпоталамусу. Зміни не однотипні та залежать від етіо-патогенетичних особливостей сформованої АГ. При есенціальній АГ у щурів лінії SHR встановлено найвищі показники середньої площі ядер нейронів та вмісту в них гетерогенної РНК, тимчасом як у щурів ЕСАГ із змодельованою вторинною, ендокринно-асоційованою АГ, ці показники, навпаки, були нижче значень контролю. Необхідно відмітити, що стійке підвищення АТ сприяло зниженню концентрації в ядрах нейронів гетерогенної РНК в обох моделях.

5.2 Морфо-денситометричні показники ядер нейронів вентромедіального суб'ядра АрЯ гіпоталамуса в щурів експериментальних груп

Особливістю будови вентромедіального суб'ядра АрЯ гіпоталамуса є невисока кількість нейронів на фоні великого відсотку в ньому спеціалізованих клітин таніцитів, що локалізуються переважно біля стінки III шлуночку та виконують, окрім бар'єрної й лікворопродукуючої функції, локальні паракринну, гомеостатичну, нейротрофічну та ендокринну модулюючу дію [87-88]. Саме завдяки цьому через вм-АрЯ здійснюється транспорт гормонів як із спинномозкової рідини до гіпофізарної системи, так і зворотно [87-88]. Рецепторний апарат вм-АрЯ характеризується наявністю рецепторів до лептину, глюкокортикоїдів, глюкози, ангіотензину II першого підтипу [106-107]. Враховуючи вищезазначені особливості цього суб'ядра, більшість дослідників розглядають його як важливий зв'язуючий компонент не тільки суб'ядер дм-АрЯ та вл-АрЯ, а й припускають ключову комунікативну функцію вм-АрЯ майже з усіма ядрами та суб'ядрами гіпоталамусу [97-104].

В ході проведеного морфометричного дослідження площі ядер нейронів вм-АрЯ було встановлено достовірне її зменшення в щурів з ЕАГ на 14 % ($p < 0,05$), у порівнянні із контрольною групою, натомість, у щурів з ЕСАГ достовірних змін не відзначалось (табл. 5.2).

Таблиця 5.2 – Морфо-денситометричні показники ядер нейронів вентромедіального суб'ядра АрЯ у щурів експериментальних груп ($M \pm m$)

Показники	Контроль, n=10	ЕСАГ, n=10	ЕАГ, n=10
Площа ядер нейронів, мкм ²	66,33±0,82	67,34±0,99	57,29±0,89 ^{1,2}
Вміст РНК Од	304,85±4,51	321,64±6,94 ¹	248±4,18 ^{1,2}
Концентрація РНК, Од/мкм ²	0,46±0,005	0,47±0,007 ¹	0,43±0,006 ^{1,2}

Примітка 1. (1) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p < 0,05$) порівняно з показниками контролю.

Примітка 2. (2) – достовірна різниця показників щурів з ЕАГ ($p < 0,05$) порівняно з показниками щурів групи з ЕСАГ.

При порівнянні показників площі ядер нейронів вм-АрЯ в щурів із різними за етіопатогенезом АГ було встановлено, що у тварин з ЕАГ вона була меншою на 15 % ($p < 0,05$), ніж в групі з ЕСАГ (див. табл. 5.2).

В ході денситометричного дослідження було встановлено, що в щурів з ЕСАГ, порівняно з контролем, вміст гетерогенної РНК достовірно збільшився на 5 % ($p < 0,05$), проте в щурів з ЕАГ, навпаки, її вміст зменшився на 19 % ($p < 0,05$) (див табл.5.2).

Порівнюючи цей показник у групах з експериментальними АГ, було встановлено, що щури з ЕАГ мали найнижчі значення вмісту гетерогенної РНК, яке становило 77 % від вмісту РНК у щурів з ЕСАГ (див.табл.5.2).

У експериментальних групах аналіз показників концентрації РНК в ядрах нейронів вм-АрЯ показав, що найнижчим він був у щурів з ЕАГ, а в групі щурів з ЕСАГ значення достовірно не відрізнялося від показника контролю. Слід відмітити, що в щурів з ЕАГ по відношенню до контрольної

групи концентрація РНК була меншою на 6 % ($p < 0,05$), а по відношенню до щурів з ЕСАГ на 9 % ($p < 0,05$) (див.табл.5.2).

Проведений аналіз морфо-денситометричних параметрів нейронів вл-АрЯ суб'ядра гіпоталамусу показав, що сформована АГ призводить до змін досліджуваних параметрів ядер. Однак слід відмітити, що зміни не однотипні, їх характеристики залежать від етіо-патогенетичних механізмів формування АГ. Власне, при ЕАГ спостерігається зменшення площі ядер нейронів, зниження вмісту та концентрації у них РНК, натомість за ЕСАГ зміни протилежні – відбувається підвищення концентрації РНК в ядрах нейронів на фоні незмінених показників вмісту РНК та площі ядер.

5.3 Морфо-денситометричні показники ядер нейронів вентролатерального суб'ядра АрЯ гіпоталамусу в щурів експериментальних груп

Особливістю нейронів вл-АрЯ є велика кількість проєкцій до серединного підвищення (СП), через нього проходить значна кількість нервових волокон від ПВЯ до СП, які містять холецистокінін, вазопресин, кортиколиберін [86, 97, 119, 123]. Саме ці властивості дають змогу стверджувати, що нейрони вл-АрЯ суб'ядра гіпоталамусу включені до формування стрес-реакції, а їх активність буде пов'язана з розвитком адаптаційних механізмів за порушень гомеостазу.

Проведений аналіз морфометричного показника площі ядер нейронів вл-АрЯ, показав що, формування АГ призводить до достовірних змін, які залежать від її етіології. Так, у щурів з ЕСАГ відмічалось збільшення площі нейронів по відношенню до контрольної групи на 19 % ($p < 0,05$). Тимчасом у щурів з ЕАГ, навпаки, спостерігалось зменшення показників площі, у порівнянні з контрольною групою, на 15 % ($p < 0,05$) (табл.5.3).

Таблиця 5.3 – Морфо-денситометричні показники нейронів вентролатерального суб'ядра АрЯ в щурів експериментальних груп ($M \pm m$)

Показник	Контроль, n=10	ЕСАГ, n=10	ЕАГ, n=10
Площа ядер нейронів, мкм ²	64,67±0,89	77,19±1,22 ¹	55,32±1,27 ^{1,2}
Вміст РНК, Од	326,56 ±5,79	358,1±7,32 ¹	238,66±5,96 ^{1,2}
Концентрація РНК, Од/мкм ²	0,5 ± 0,007	0,46±0,005 ¹	0,43±0,006 ^{1,2}

Примітка 1. (¹) – достовірна різниця показників експериментальних груп ($p < 0,05$) порівняно з показниками контролю.

Примітка 2. (²) – достовірна різниця показників щурів з ЕАГ ($p < 0,05$) порівняно з показниками щурів групи з ЕСАГ.

При порівнянні показника площі ядер нейронів серед щурів зі сформованою АГ було встановлено, що у тварин з ЕАГ вона була меншою на 29 % ($p < 0,05$), ніж у щурів з ЕСАГ (див.табл.5.3).

При аналізі денситометричних показників вмісту та концентрації гетерогенної РНК в ядрах нейронів також було встановлено залежність змін від етіопатогенезу АГ. Зокрема, у щурів з ЕСАГ спостерігалось збільшення вмісту гетерогенної РНК на 10 % ($p < 0,05$) по відношенню до контрольної групи, тимчасом як у щурів з ЕАГ спостерігалось зменшення гетерогенної РНК на 27 % ($p < 0,05$) (див.табл.5.3).

Порівняльний аналіз вмісту РНК в ядрах нейронів щурів з різною етіологією та патогенезом моделей АГ продемонстрував, що показник вмісту гетерогенної РНК був достовірно нижчим на 34 % ($p < 0,05$) у щурів з ЕАГ, ніж у щурів з ЕСАГ (див.табл.5.3).

Аналіз показника концентрації РНК у щурів зі сформованою АГ показав однотипні зміни, які характеризувалися її зменшенням у тварин з ЕАГ на 14 % ($p < 0,05$) та на 8 % ($p < 0,05$) у щурів з ЕСАГ по відношенню до контролю (див.табл.5.3).

Порівнюючи показник концентрації РНК серед щурів зі сформованою АГ, було встановлено, що у тварин з ЕАГ він менше на 7 % ($p < 0,05$) по відношенню до щурів з ЕСАГ (див.табл.5.3).

В результаті проведеного цифрового аналізу морфо-денситометричних показників ядер нейронів вл-АрЯ суб'ядра гіпоталамусу при різних за етіологією та патогенезом експериментальних моделях АГ було визначено, що характер їх змін залежить від патогенетичних механізмів формування стійкого підвищення АТ. Власне, у щурів з ЕАГ було відмічено суттєве зниження всіх досліджуваних показників – площі ядра, вмісту та концентрації у ньому гетерогенної РНК, а при ЕСАГ, навпаки, площа ядер нейронів та вміст гетерогенної РНК у них збільшувалися на фоні зниження концентрації РНК в ядрах нейронів.

5.4 Каріометричний аналіз ядер нейронів суб'ядер АрЯ гіпоталамусу в щурів експериментальних груп за їхньою площею

Каріометричний аналіз ядер нейронів фактично характеризує особливості морфо-функціональної перебудови кожного окремого суб'ядра АрЯ гіпоталамусу, що розвивається в разі надмірного впливу та порушення гомеостазу організму. Отже, сьогодні вже добре відомо, що причиною запуску структурних перебудов регуляторних центрів мозку є дія фактору, що взаємодіє з організмом та складовими його системами і елементами. Між іншим, діючий фактор, який виводить систему з рівноваги, – це досить широке поняття, яке включає в себе будь-які несприятливі, неадекватні, незвичайні, надлишкові для даної системи впливи зовнішніх факторів або істотно мінливих умов внутрішнього середовища організму. Результатом цих впливів стають морфо-функціональні перебудови серед нейрональної популяції у регуляторних суб'ядрах, як важливий компонент компенсаторно-приспосувальних змін, спрямованих на перебудову метаболічних процесів, міжнейрональних взаємин та напряду аксонального транспорту.

Проведений в дослідженні аналіз морфометричних показників ядер нейронів суб'ядер АрЯ гіпоталамуса дозволив встановити особливості та достовірні відмінності цього параметру в залежності від етіопатогенетичного чинника розвитку АГ.

На першому етапі було проаналізовано особливості каріометричних характеристик нейронів у щурів контрольної групи із нормальним АГ. При цьому було встановлено, що в них в усіх досліджуваних суб'ядрах переважали нейрони площею 51-70 мкм². У дм-АрЯ вони склали 74 %, у вл-АрЯ суб'ядри – 78 %, у вл-АрЯ – 76 %. Окрім встановленої залежності, розподіл популяцій нейронів мав і свої топографічні особливості. Так, у дм-АрЯ суб'ядри 18,5 % нейронів мали площу ядра 41-50 мкм², а 7,5 % складали нейрони із великими ядрами площею 71-90 мкм². У вл-АрЯ, окрім нейронів з дрібними ядрами площею 41-50 мкм² у кількості 12 %, з'явилися нейрони з дуже дрібними ядрами (31-40 мкм²) та великими (71-80 мкм²) по 5 %. У структурі вл-АрЯ особливістю розподілу популяції нейронів була наявність незначної кількості нейронів із дрібними ядрами (41-50 мкм²) - тільки 2 %, але поява клітин із великими ядрами площею 71-90 мкм² – 21 %, та з дуже великими ядрами (91-100 мкм²) – 1 % (табл. 5.4).

Другий етап проведення каріометричного аналізу популяцій нейронів у структурах суб'ядер АрЯ гіпоталамусу в щурів з експериментальними АГ показав, що співвідношення клітин за площею ядер мали суттєві відмінності не тільки від характеристик контрольної групи, були доведені принципові особливості, що залежали від етіопатогенезу моделі АГ.

Таблиця 5.4 – Показники каріометричного аналізу ядер нейронів суб'ядер АрЯ гіпоталамуса

Експериментальні групи n=10	% нейронів за площею мкм ²								
	20-31	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100	101-110
Контрольна група	дм-АрЯ гіпоталамуса								
			18,5	41	33	4,5	3		
	вм-АрЯ гіпоталамуса								
		5	12	54	24	5			
	вл-АрЯ гіпоталамуса								
			2	40	36	12	9	1	
ЕСАГ	дм-АрЯ гіпоталамуса								
		3	11,5	13	29	24	16	3,5	
	вм-АрЯ гіпоталамуса								
		5	18	40	27	8	2		
	вл-АрЯ гіпоталамуса								
	2	12	21	25	23	14	3		
	дм-АрЯ гіпоталамуса								
ЕАГ		7	<u>24,5</u>	<u>43</u>	<u>21,5</u>	2	1	1	
	вм-АрЯ гіпоталамуса								
			6	<u>17</u>	<u>36</u>	<u>27</u>	<u>10</u>	4	
	вл-АрЯ гіпоталамуса								
			3	6	<u>21</u>	<u>26</u>	<u>26</u>	<u>14</u>	4

Зокрема, в щурів з ЕСАГ було встановлено, що популяція нейронів дм-АрЯ нерідна за площею їхніх ядер та представлена у дуже широкому діапазоні. Нейронів із площею ядер 51-70 мкм², що були більш представлені в контролі, було значно менше та склали тільки 42 %. При цьому виявилось багато клітин із дрібними 31-50 мкм² (14,5 %) та великими 71-90 (40 %)

ядрами нейронів. Звертав увагу факт появи нейронів з дуже великими ядрами площею 91-100 мкм² (3,5 %) (див. табл. 5.4).

У вл-АрЯ в щурів з ЕСАГ виявлено збільшення відсотку нейронів з дрібними ядрами площею 31–50 мкм², на їх частку припало 23 %, проти 17 % у контролі. При цьому відсоток класично, як у контролі, представлених нейронів із площею ядер 51-70 мкм² склав 67 % проти 78 %. Відсоток нейронів із великими ядрами (71-80 мкм²) збільшився з 5 %, у контролі, до 8 %, до того ж з'явилися клітини із дуже великими ядрами (81-90 мкм²) – 2 % (див. табл. 5.4).

У вл-АрЯ щурів з ЕСАГ також було встановлено наявність у значній кількості нейронів із дрібними ядрами площею 31–50 мкм² (33 %), за рахунок чого відбулося зниження кількості класично представленої популяції клітин з ядрами площею 51–70 мкм², які зменшилися до 48 % проти 76 % у контролі. Необхідно відмітити важливу особливість – це поява нейронів з дуже дрібними ядрами площею 20-30 мкм², на яких припало 2 %, та зниження відсотку нейронів із великими ядрами до 3 %, проти 10 % у контролі (див. табл.5.4).

Порівняльний аналіз показника площі ядер нейронів у групі щурів з ЕАГ у структурі дм-АрЯ суб'ядра також показав структурні відмінності від показників контрольної групи, а саме: відсоток нейронів площею 51-70 мкм², які в контролі склали 74 %, знизився до 66,5 %, в більшості за рахунок появи клітин з дрібними ядрами площею 31–50 мкм², що становили 31,5 %. При цьому відсоток нейронів із великими ядрами також знизився з 7,5 % до 4 % (див. табл.5.4).

У вл-АрЯ щурів з ЕАГ популяція нейронів за площею їхніх ядер показала суттєве розширення діапазону означеного показника, оскільки було встановлено зниження відсотку нейронів з площею ядра 51-70 мкм², що склало 53 % проти 76 % у контролі. Також, слід відмітити значне збільшення частки нейронів із великими ядрами 71-90 мкм² до 37 % проти 5 % у контролі

та появу нейронів з дуже великими ядрами площею 90-100 мкм², вони склали 4 % (див. табл.5.4).

У вл-АрЯ щурів з ЕАГ популяція нейронів виявилася неоднорідною та показала найширший діапазон клітин за площею їхніх ядер. Так, нейронів з площею ядра 51-70 мкм², переважно якими було представлене вл-АрЯ контрольної групи, склало лише 27 %, тимчасом як нейрони з великими ядрами площею 71-90 мкм² склали 52 %. Також, слід відмітити появу нейронів з дуже великими ядрами, площа яких була 91-100 мкм², на їх частку доводилось 14 %. Важливою особливістю означеної популяції нейронів у структурі суб'ядра стало виявлення клітин із найбільшими ядрами площею 101-110 мкм² – 4 % (див.табл.5.4).

Порівнюючи показники площі ядер нейронів серед показників груп тварин з експериментальною АГ, було встановлено декілька особливостей.

Зокрема, в щурів з ЕСАГ у дм-АрЯ, на відміну від щурів з ЕАГ, популяція нейронів відрізнялася, по-перше: наявністю клітин з великими (71-90 мкм²) та дуже великими ядрами (91-110 мкм²), їхній відсоток склав за ЕСАГ 40 % та 3,5 %, відповідно, проти за ЕАГ 3 % та 1 %, відповідно. По-друге, частка нейронів із дрібними ядрами була більшою в щурів з ЕАГ, та становила 24,5 % (41-50 мкм²) і 7 % (31-40 мкм²), а у щурів з ЕСАГ – 11,5 % (41-50 мкм²) та 3 % (31-40 мкм²) (див. табл. 5.4).

У структурі вл-АрЯ гіпоталамуса популяційні особливості клітин показали, що за ЕСАГ, на відміну від ЕАГ, відмічається більша частка клітин із дрібними ядрами. Так, нейронів з ядрами 31-40 мкм² було 5 %, 41-50 мкм² – 18 % у ЕСАГ, тоді як за ЕАГ тільки 6 % нейронів були з ядрами площею 41-50 мкм², а клітини з ядрами 31-40 мкм² взагалі не зустрічалися. Відповідно, модель з ЕАГ показала наявність нейронів з великими та дуже великими ядрами 40 % та 4 %, відповідно. ЕСАГ, навпаки, характеризувалася низькою часткою великих нейронів (81-90 мкм²) та відсутністю клітин з дуже великими ядрами (див. табл. 5.4).

Нейрони вл-АрЯ гіпоталамуса при сформованій АГ показали, що етіологічний фактор та, відповідно, патогенетичний механізм формування АГ, по-різному впливають на популяційні взаємини в структурі суб'ядра. Так, за ЕСАГ вл-АрЯ тільки на 48 % складалось із нейронів площею 51-70 мкм², в той час як у щурів з ЕАГ їхня частка була ще нижчою та становила 27 %. За ЕСАГ популяція нейронів показала зміщення діапазону клітин за площею в бік дрібно-ядерних, тоді як за ЕАГ частка нейронів із дрібними ядрами суттєво знижувалася, а популяція клітин ставала більш представленою нейронами з великими та дуже великими ядрами (див. табл.5.4).

Таким чином, каріометричний аналіз популяцій нейронів у кожному окремому суб'ядрі АрЯ гіпоталамусу дозволив виявити цілий комплекс важливих особливостей та закономірностей, що залежали від етіології сформованої експериментальної патології та механізмі її розвитку.

Резюме

Проведені гістохімічні дослідження дозволили вивчити морфометричні та денситометричні характеристики ядер нейронів АрЯ гіпоталамуса як у щурів з нормальним АТ, так і в щурів з експериментальною АГ. Проведений каріометричний аналіз дав змогу порівняти та проаналізувати особливості змін досліджуваних параметрів ядер нейронів, та дати цілісну характеристику популяції нейронів у кожному окремому суб'ядрі АрЯ при експериментальній патології в залежності від етіо-патогенетичних механізмів її розвитку.

В результаті дослідження було визначено, що в щурів з ЕСАГ площа ядер нейронів ставала меншою, ніж у щурів контрольної групи. Проте у щурів з ЕАГ, навпаки, цей показник збільшувався. Таку ж спрямованість мали і показники вмісту та концентрації гетерогенної РНК. А саме, в щурів з ЕСАГ визначалось зменшення вмісту та концентрації гетерогенної РНК, в той час як у щурів з ЕАГ аналогічні показники підвищувалися по

відношенню до контрольної групи. Порівнюючи морфо-денситометричні показники серед щурів зі сформованою АГ, було встановлено, що площа ядер нейронів, вміст та концентрація гетерогеної РНК вище в щурів з ЕАГ.

Аналіз показників площі ядер нейронів, вмісту та концентрації у них гетерогенної РНК по суб'ядрах показав, що в щурів з ЕСАГ збільшується площа ядер нейронів вл-АрЯ, а у щурів з ЕАГ, навпаки, зменшується по відношенню до контрольної групи. Показники вмісту та концентрації гетерогенної РНК також були вищими в щурів з ЕСАГ, ніж у щурів контрольної групи. Щодо щурів з ЕАГ, то аналогічні показники були нижчими у порівнянні з контрольною групою. Порівнюючи показники площі ядер нейронів, вмісту та концентрації гетерогенної РНК, було встановлено, що найнижчі показники відмічалися в щурів з ЕАГ.

Було встановлено, що формування експериментальної АГ призводить до односпрямованих змін у нейронах вл-АрЯ. Так, у щурів з ЕСАГ відмічається збільшення площі ядер нейронів, в той час як у щурів з ЕАГ спостерігається її зменшення по відношенню до контрольної групи. Щодо показників вмісту та концентрації гетерогенної РНК, то щурів з ЕСАГ відмічалось їх збільшення, а у щурів з ЕАГ - їхнє зменшення, у порівнянні з групою контролю. Серед груп зі сформованою АГ найвищі показники площі ядер нейронів, вмісту та концентрації гетерогенної РНК були в щурів з ЕСАГ.

У дм-суб'ядрі АрЯ при есенціальній АГ площа ядер нейронів та вміст у них гетерогенної РНК перевищують значення групи контролю в середньому на 5 %, тоді як при ЕСАГ моделі спостерігається зворотна динаміка – площа ядер нейронів зменшуються на 8 %, а вміст у них гетерогенної РНК – на 24 %

Проведений в дослідженні структурно-популяційний аналіз морфометричного показнику площі ядер нейронів окремих суб'ядер АрЯ гіпоталамуса щурів контрольної групи дозволив встановити морфоструктурні характеристики їхньої нейрональної клітинної популяції. Було визначено, що в усіх досліджуваних суб'ядрах (дм-АрЯ, вл-АрЯ та вл-АрЯ)

переважають нейрони площею 51-70 мкм², що у середньому становить 74-78 %. При цьому відмічені топографічні особливості нейрональної популяції: у дм-АрЯ суб'ядрі 18,5 % нейронів мають площу ядер 41-50 мкм² та 7,5 % складають нейрони з великими ядрами площею 71-90 мкм²; у вм-АрЯ чисельність нейронів з дрібними ядрами площею 41-50 мкм² становить 12 %, але з'являються нейрони з дуже дрібними ядрами (31-40 мкм²) та великими (71-80 мкм²) по 5 %; у вл-АрЯ відсоток нейронів з дрібними ядрами (41-50 мкм²) становить тільки 2 %, але виявляються клітини з великими ядрами площею 71-90 мкм² – 21 % та з дуже великими ядрами (91-100 мкм²) – 1 %.

У результаті порівняльного структурного аналізу показнику площі нейронів у суб'ядрах АрЯ гіпоталамусу щурів з експериментальними АГ були виявлені важливі особливості. Вони показали, що стійке підвищення АТ призводить до популяційних змін розподілу нейронів за їх морфоструктурним станом, який має загальні особливості, що притаманні обом моделям, але присутні патогенетичні відмінності, які відрізняються та залежать від етіології формування АГ.

Визначені загальні особливості популяції нейронів при сформованій АГ як у щурів з ЕСАТ, так і ЕАГ, що характеризуються зменшенням чисельності класично представлених за площею ядер нейронів, появою в окремих суб'ядрах нейронів із дуже дрібними або дуже великими ядрами, через це – розширення каріометричного діапазону.

Згідно результатів порівняльного аналізу показників площі нейронів у щурів обох груп із сформованою АГ, встановлено особливості досліджуваного показника, що залежать від етіологічного фактору та патогенезу експериментальної патології. Доведено різноспрямованість змін каріометричного показника в популяції нейронів суб'ядер АрЯ, при цьому у дм-АрЯ щурів з ЕСАГ розширення каріометричного діапазону відбулося за рахунок появи клітин із великими та дуже великими ядрами нейронів 71-100 мкм² (43,5 %), тоді як у групі ЕАГ – за рахунок клітин із дрібними ядрами 31-50 мкм² (31,5 %). Вм-АрЯ суб'ядро в групі з ЕСАГ показало зростання

відсотку нейронів із дрібними ядрами 30-50 мкм² (23,5 %), а у ЕАГ, навпаки, виявили збільшення клітин із великими ядрами 71-100 мкм² (41 %). Різностямовані зміни в популяції нейронів були також притаманні вл-АрЯ суб'ядру, при цьому в шурів з ЕСАГ каріометричний діапазон зсунувся в бік нейронів із дрібними та дуже дрібними ядрами 20-50 мкм² (35 %), в той час як у групі шурів з ЕАГ виявилися зворотні особливості – суттєво збільшилась популяція нейронів із великими та дуже великими ядрами 71-110 мкм² (70 %).

Матеріали розділу відображені в 1 статті та 1 наукових тезах [189-190].

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проведенні дослідження з вивчення патогенетичних особливостей морфо-функціонального стану нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу при АГ різного генезу дозволили встановити, що формування стійкого підвищення АТ, незалежно від етіологічного чиннику та механізмів розвитку, призводить до однотипних змін вмісту нейропептидів, експресії мРНК ізоформ NOS, її ізоформного профілю та концентрації кінцевих метаболітів NO, але показує етіозалежні особливості морфо-денситометричних параметрів ядер нейронів та їх структурно-популяційних взаємин в вентромедіальному, вентролатеральному та дорсомедіальному суб'ядрах аркуатного ядра гіпоталамусу.

Для реалізації поставленої мети та розв'язання завдань було застосовано комплекс сучасних методів, що включали в себе: патофізіологічний – моделювання експериментальної АГ (есенціальної, щури лінії SHR, та ендокринно-сольової), що є прототипами клінічних нозологічних форм гіпертонічної хвороби (первинної та вторинної, ендокринно-асоційованої), імуногістохімічний – визначення вмісту та концентрації ІРМ до досліджуваних ізоформ NOS та нейропептидів, молекулярно-генетичний – визначення експресії мРНК ізоформ NOS, імуноферментний – визначення рівня нітротирозину в плазмі щурів, біохімічний – визначення концентрації нітритів у плазмі крові щурів та гомогенатах мозку, морфо-денситометричний – визначення площі ядер нейронів, визначення в них вмісту та концентрації гетерогенної РНК, методи кореляційного та статистичного аналізу.

У роботі було використано дві класичні патофізіологічні моделі АГ, це есенціальна АГ та ендокринно-сольова АГ, яка є аналогом симптоматичної АГ, асоційованої з ендокринними порушеннями.

На першому етапі було проведено комплексне дослідження стану системи монооксиду азоту АрЯ гіпоталамуса в щурів експериментальних груп, яке включало визначення особливостей експресії генів ізоформ ферменту за вмістом мРНК нейрональної, індукцйбельної та ендотеліальної форм ензиму в гомогенатах медіобазального гіпоталамуса, характером ізоформного профілю ферменту NOS безпосередньо в зрізах АрЯ та кількісних показниках кінцевих метаболітів NO нітритів (у гомогенатах мозку та плазмі крові) й нітротирозину (у плазмі крові щурів).

Так, проведене імунофлуоресцентне дослідження вмісту ІРМ до ізоформ NOS показало, що в щурів контрольної групи за вмістом та концентрацією найбільш представленою була eNOS (рис. 6.1).

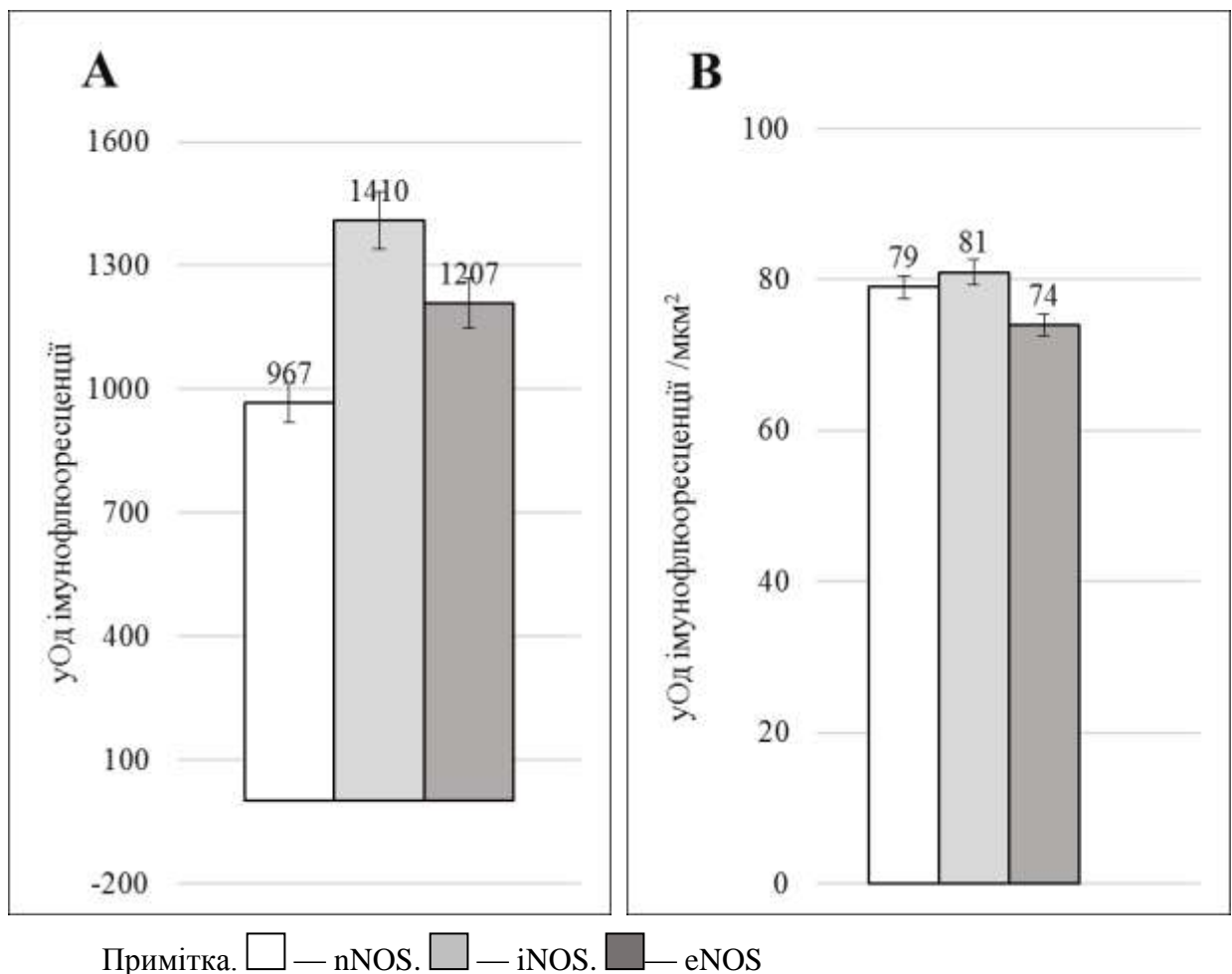
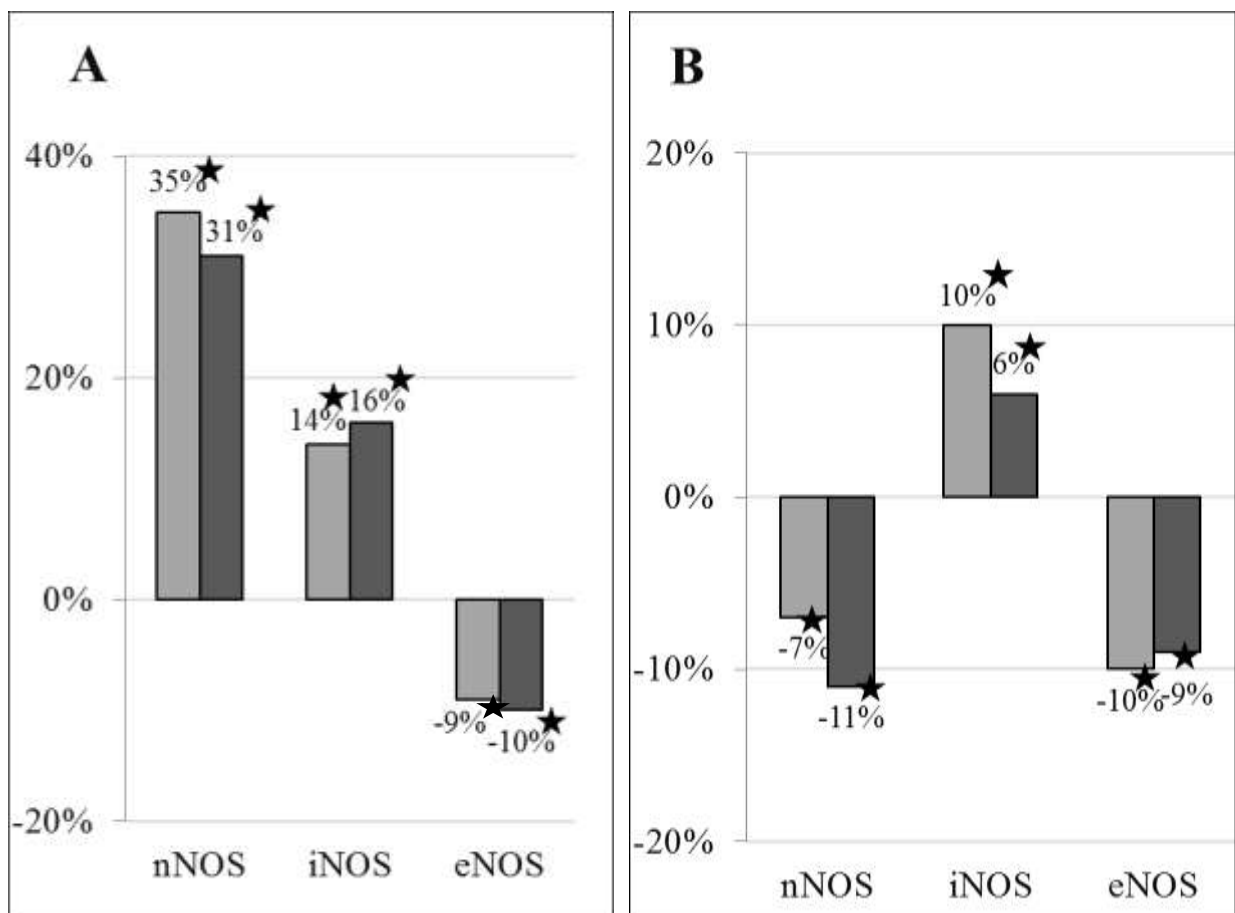


Рисунок 6.1 – Вміст (А) та концентрація (В) імунореактивного матеріалу до ізоформ NOS у нейронах АрЯ гіпоталамусу щурів контрольної групи

Водночас, проведений аналіз кількісних характеристик вмісту ізоформ NOS у щурів зі сформованою АГ показав, що її розвиток, незалежно від типу моделі, призводить до однотипних змін характеру ізоформного профілю ферменту. При цьому було відмічено збільшення вмісту IPM як до nNOS, так і до iNOS, проте відбувалося зменшення вмісту eNOS. Також слід зазначити, що сформована АГ призводила до значного збільшення вмісту iNOS, значення якої перевищували показники eNOS. Порівнюючи показники вмісту IPM до ізоформ NOS у щурів із сформованою АГ, було встановлено, що у групі тварин з ЕСАГ переважає вміст nNOS, а у щурів з ЕАГ – iNOS (рис.6.2).



Примітка 1. За 100 % прийняті показники контрольної групи.

Примітка 2. □ — показники щурів з ЕАГ. ■ — показники щурів з ЕСАГ.

Примітка 3. ★ достовірні відмінності показників по відношенню до контрольної групи $P < 0.05$.

Рисунок 6.2 – Вміст (А) та концентрація (В) імунореактивного матеріалу до ізоформ NOS у нейронах АрЯ гіпоталамусу щурів з

експериментальною артеріальною гіпертензією по відношенню до показників контрольної групи

Для більш детального вивчення стану системи монооксиду азоту було проведено дослідження експресії мРНК ізоформ NOS у гомогенатах медіобазального гіпоталамуса експериментальних щурів. Отримані дані свідчили, що розвиток АГ призводив до підвищення експресії мРНК конститутивних форм NOS в обох моделях. Проте рівень мРНК іNOS збільшився тільки в щурів з ЕАГ, а в групі з ЕСАГ, навпаки, зменшився (рис. 6.3).

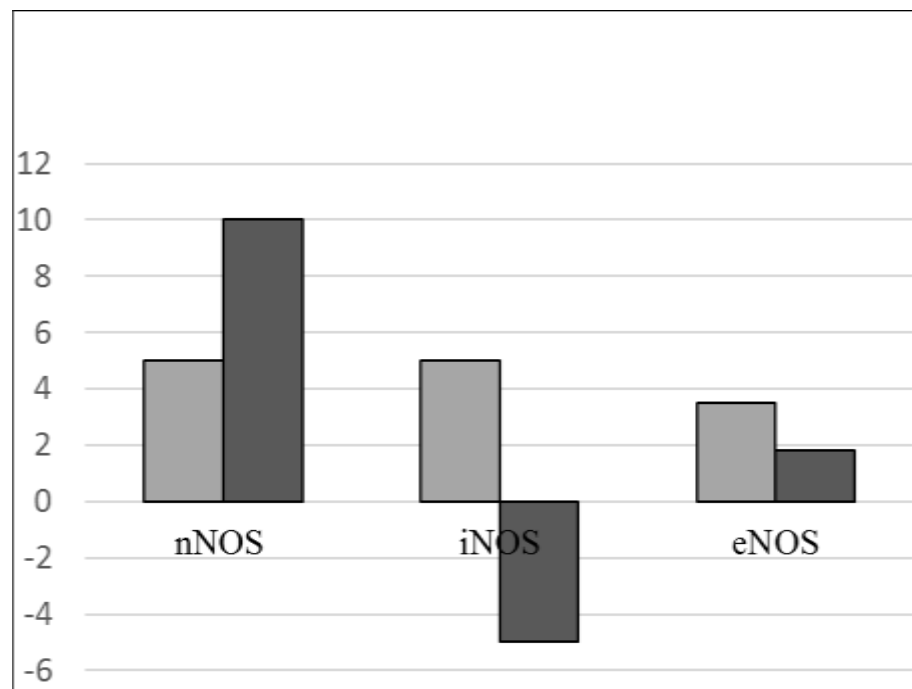
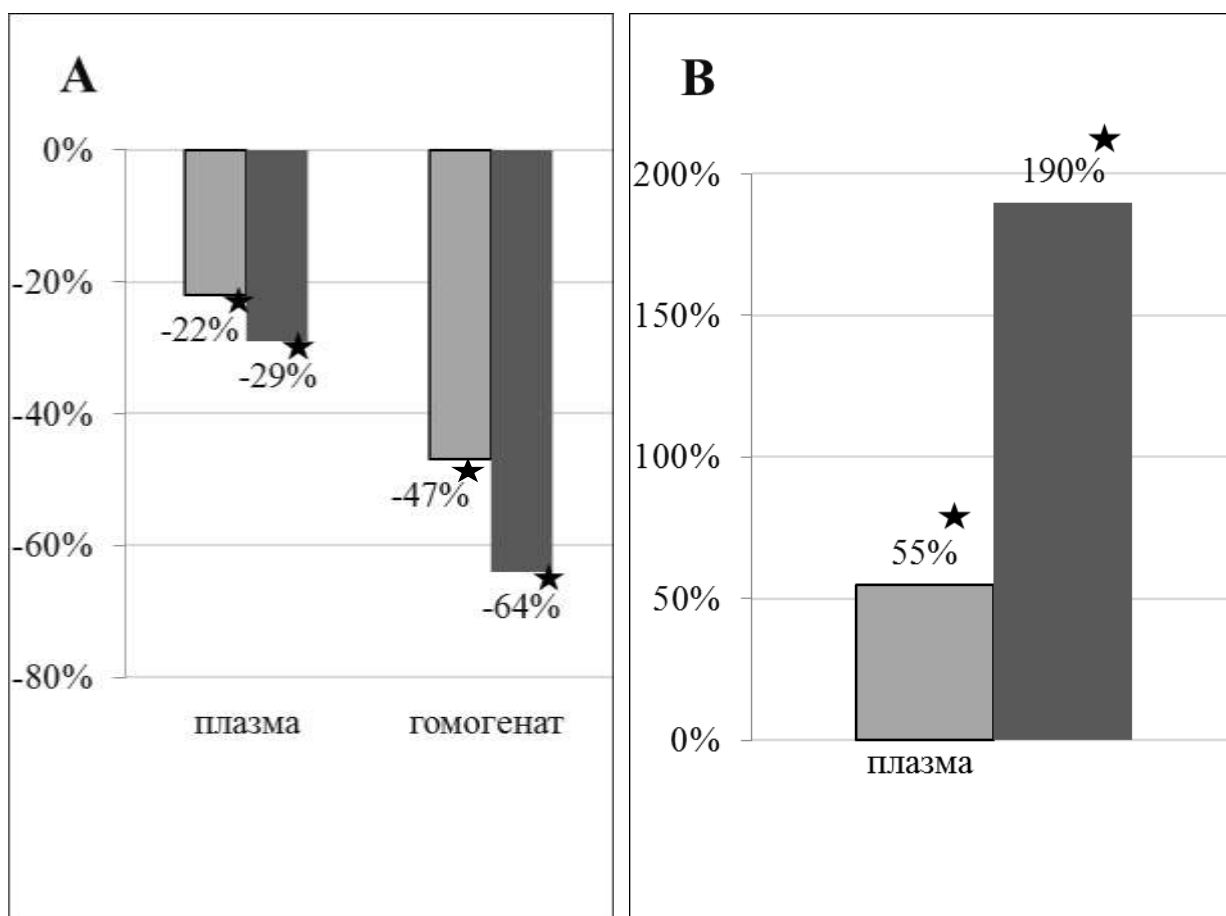


Рис.6.3 – Показники експресії мРНК nNOS, iNOS та eNOS у медіобазальному гіпоталамусі в щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією

На наступному етапі дослідження стану локальної системи монооксиду було проведено дослідження рівня кінцевих метаболітів NO – нітритів та нітротирозину. Слід зазначити, що визначення концентрації нітритів проводилося як безпосередньо у гомогенатах медіобазального гіпоталамусу, що характеризувало, в більшості, стан локальної системи NO, так і в плазмі крові щурів для оцінки її системних проявів. Натомість, вміст нітротирозину

визначали в плазмі крові тварин, що дало змогу оцінити інтенсифікацію вільнорадикальних процесів та спрямованість вектору метаболізму системи монооксиду азоту.

Аналіз показників стабільних метаболітів NO показав, що вміст нітритів при АГ був менше значень контролю як у гомогенатах медіобазального гіпоталамусу, так і в плазмі крові, на фоні підвищеної концентрації нітротирозину в плазмі крові (рис.6.4)



Примітка 1. — показники щурів з ЕАГ. — показники щурів з ЕСАГ.

Примітка 2. — достовірні відмінності показників по відношенню до контрольної групи $P < 0.05$.

Рисунок 6.4 —Рівень нітритів (А) та нітротирозину (В) в щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією по відношенню до показників контрольної групи

Таким чином, проведене дослідження стану системи монооксиду азоту показало, що формування АГ у структурі АрЯ гіпоталамуса призводить до складних та різноспрямованих змін ізоформного профілю ферменту NOS. Характер балансу ізоформ показав однотипні зміни вмісту усіх трьох ізоформ ферменту NOS як при есенціальній, так і при ендокринно-сольовій АГ. Було встановлено зниження вмісту eNOS в структурі АрЯ на тлі достовірного збільшення nNOS та iNOS (див. рис. 6.2).

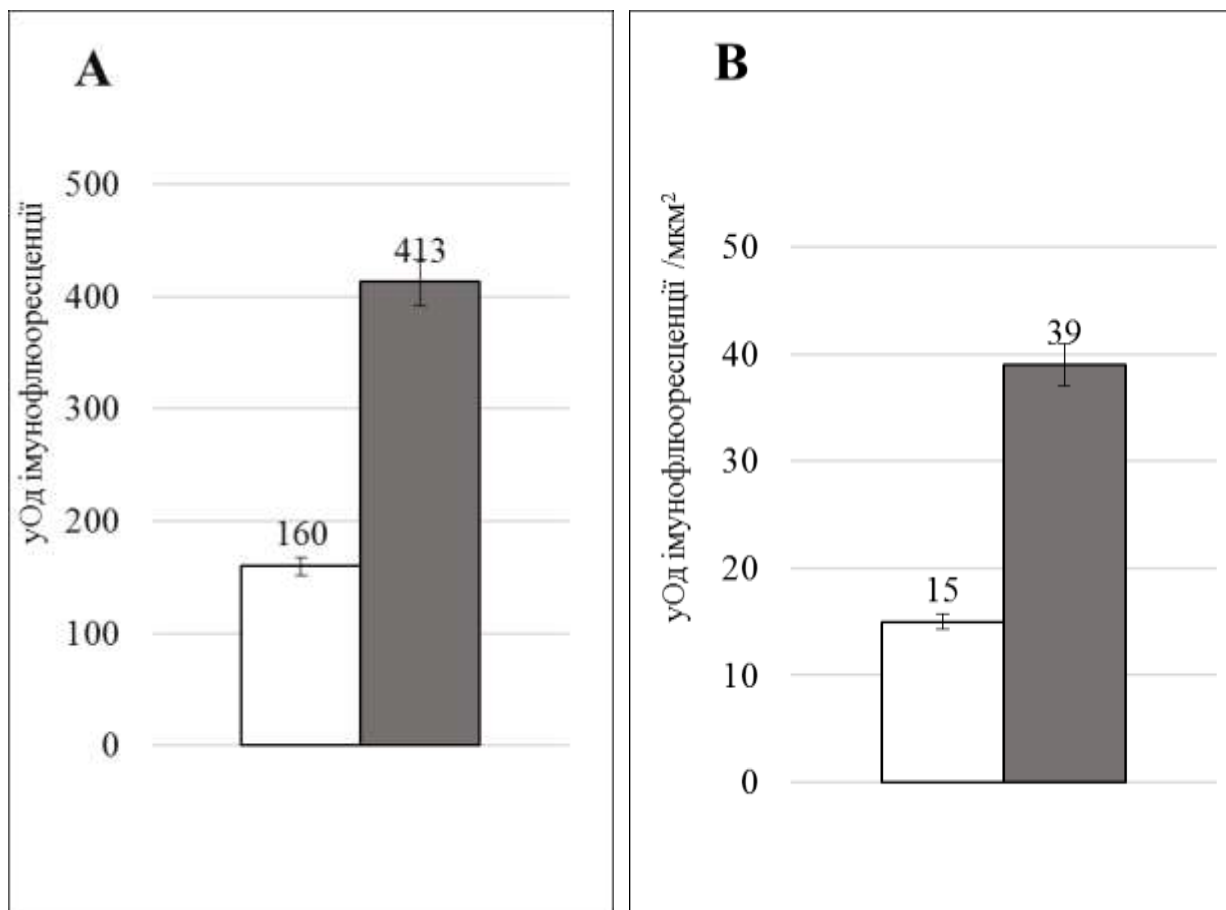
Виявлені особливості ізоформного профілю при АГ можна пояснити як з точки зору характеру їхньої внутрішньоклітинної компартменталізації, ролі в регуляції нейротрофічної та захисної функції, так і змінами експресії генів ізоформ при стійкому підвищенні АТ [191]. Щодо питання про баланс вмісту конститутивних форм NOS, який при АГ характеризувався зниженням eNOS, але підвищенням nNOS, можна припустити, що встановлені зміни можуть бути пов'язані з цілою низкою чинників. Так, в експерименті було встановлено, що при пригніченні активності nNOS відбувається збільшення концентрації вазопресину, тоді як зворотна дія призведе до його зниження і, відповідно, зменшення об'єму циркулюючої крові та загального опору судин [192]. Тому, описаний ефект можна розглядати як важливий елемент корекції підвищеного АТ. У свою чергу, зниження вмісту eNOS більшість дослідників пов'язують як з пригніченням експресії генів, так і з впливом ендогенних інгібіторів, таких як асиметричний диметиларгінін, вміст якого різко зростає в крові при серцево-судинних захворюваннях [193]. Висока вразливість дії інгібіторів саме eNOS пов'язана з особливостями її субклітинної локалізації. Було встановлено, що гранули ферменту розташовані переважно в мембрані клітини, апараті Гольджі, ядрі та мітохондріях [194]. На відміну від неї, nNOS представлена в цитоплазмі, сарколемі та ендоплазматичному ретикулумі клітини [195]. Водночас, встановлений факт підвищеного вмісту iNOS ще раз підтверджує результати численних дослідників, у роботах яких було доведено, що NO з джерела iNOS бере участь у запаленні та окислювальному стресі, а гіпертонічна хвороба як у суб'єктів з ожирінням,

так і при інших серцево-судинних захворюваннях, обов'язково включає запальний процес. Більш того, є повідомлення про початкове аномально підвищену експресію iNOS при АГ [195]. Однак, є й альтернативні версії підвищеної експресії iNOS, які припускають, що вона може грати фізіологічну захисну роль за допомогою модуляції продукції циклооксигенази і тромборегуляторних ейкозаноїдів [196].

Таким чином, дослідження стану локально системи монооксиду азоту при сформованій АГ показало однотипні зміни досліджуваних параметрів при етіологічно різних експериментальних моделях, що можна розглядати як суттєвий механізм зміни функціональної активності важливого регуляторного центру гіпоталамусу – аркуатного ядра.

Наступним етапом нашої роботи було встановлення особливості вмісту пресорних та депресорних нейропептидів. Необхідно зазначити, що перевагою проведеного власного дослідження було попереднє, за 2-3 доби, *in vivo* інтрацеребровентрікулярне введення колхіцину, що сприяло накопиченню ІРМ нейрогормонів у нейронах гіпоталамусу, безпосередня ідентифікація їх в структурі АрЯ, виключення з дослідження прилеглих структур гіпоталамусу, в яких можуть синтезуватися або накопичуватися нейрогормони, за рахунок виділення « зони інтересу-маски » при обчисленні кількісних показників.

За результатами імуногістохімічного дослідження було встановлено, що в шурів контрольної групи в АрЯ серед пресорних нейропептидів переважає АГ II, вміст та концентрація якого більше, ніж НТ у 2,5 рази (рис.6.5).

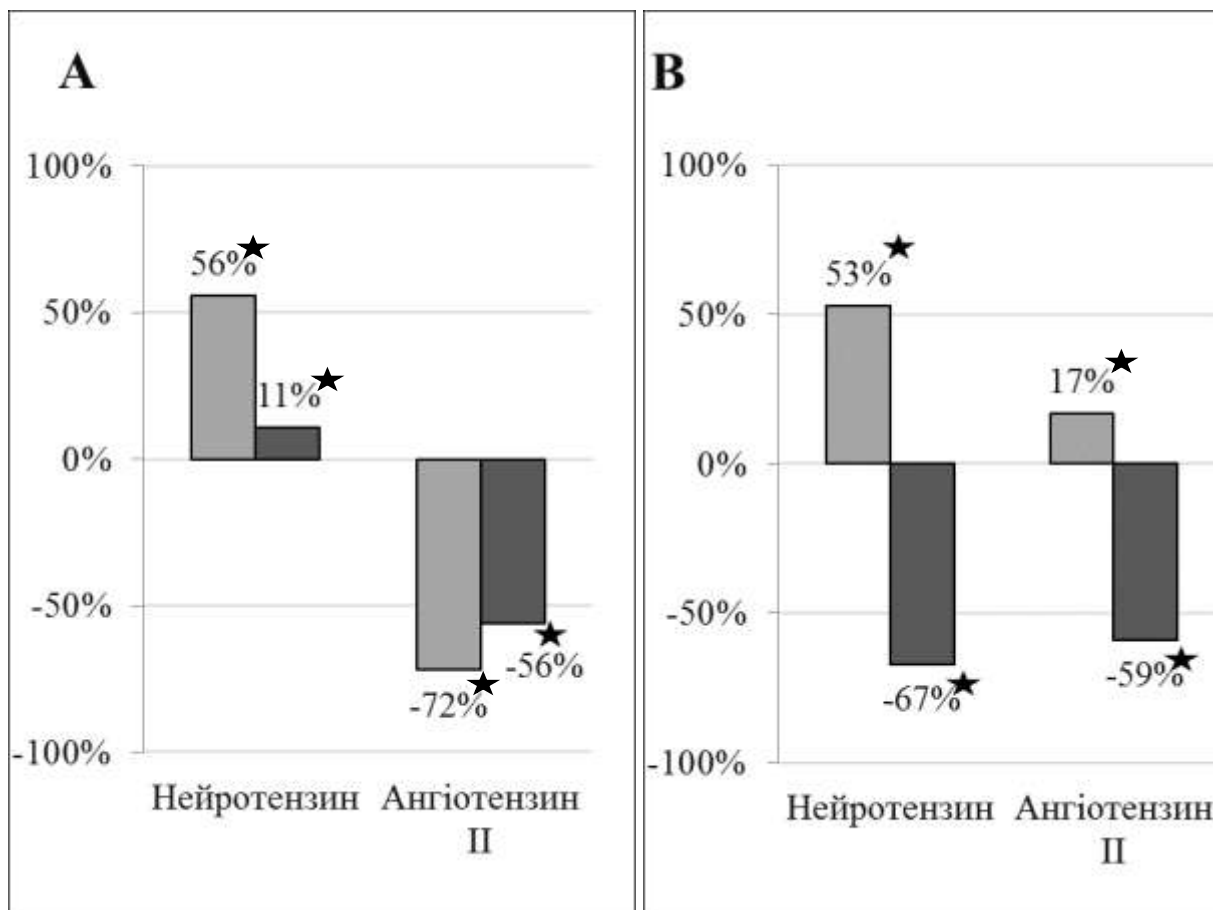


Примітка 1. □ — вміст та концентрація нейротензину.

Примітка 2. ■ — вміст та концентрація ангіотензину II.

Рис.6.5 – Вміст (А) та концентрація (В) пресорних нейропептидів (нейротензину та ангіотензину II) в АрЯ гіпоталамусу щурів контрольної групи

Аналізуючи показники вмісту та концентрації пресорних нейропептидів у щурів із АГ було встановлено, що формування АГ показує однотипні зміни при етіологічно відмінних моделях, однак по-різному впливає на кількісні параметри пресорних нейропептидів. Так, при есенціальній АГ НТ в АрЯ збільшувався, тоді як АГ II – навпаки, знижувався. При ЕСАГ відмічалось збільшення вмісту НТ, але зменшення його концентрації на фоні зменшення обох показників АГ II (рис 6.6)



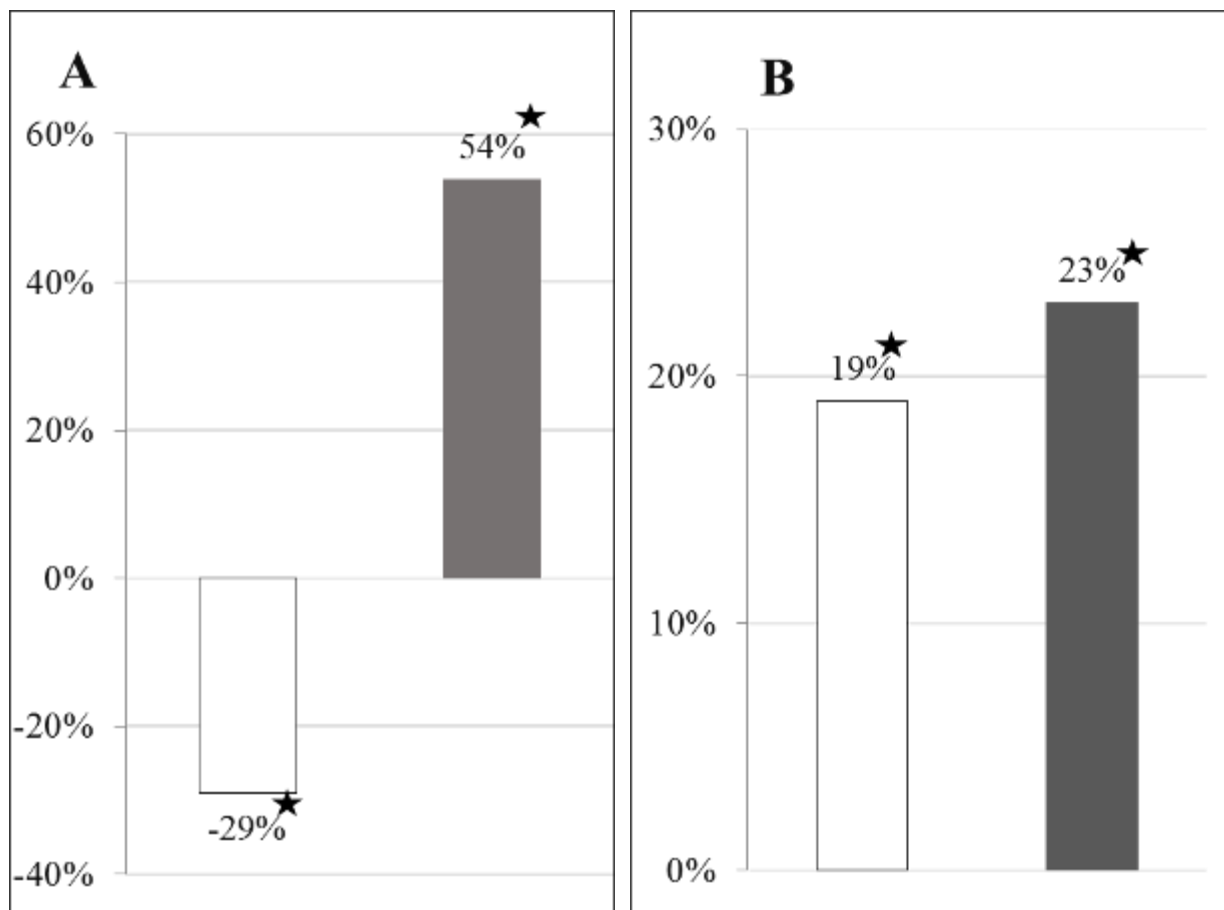
Примітка 1. За 100 % прийняті показники контрольної групи.

Примітка 2. ■ — показники щурів з ЕАГ. ■ — показники щурів з ЕСАГ.

Примітка 3. ★ достовірні відмінності показників по відношенню до контрольної групи $P < 0.05$.

Рис.6.6 – Вміст (А) та концентрація (В) пресорних нейропептидів (нейротензину та ангіотензину II) в АрЯ гіпоталамусу у щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією

При міжмодельному порівнянні показників експресії НТ та АГ II у АрЯ гіпоталамусу в щурів з АГ встановлено, що відмінності залежать від етіопатогенезу моделі, зокрема, в щурів з ЕСАГ, порівняно з ЕАГ, вміст НТ був нижчий на третину, але концентрація була вищою на 19 %. Вміст та концентрація АГ II були також вище в щурів з ЕСАГ на 54 % та 23 %, відповідно (рис 6.7).



Примітка 1. За 100 % прийняті показники групи щурів з ЕАГ.

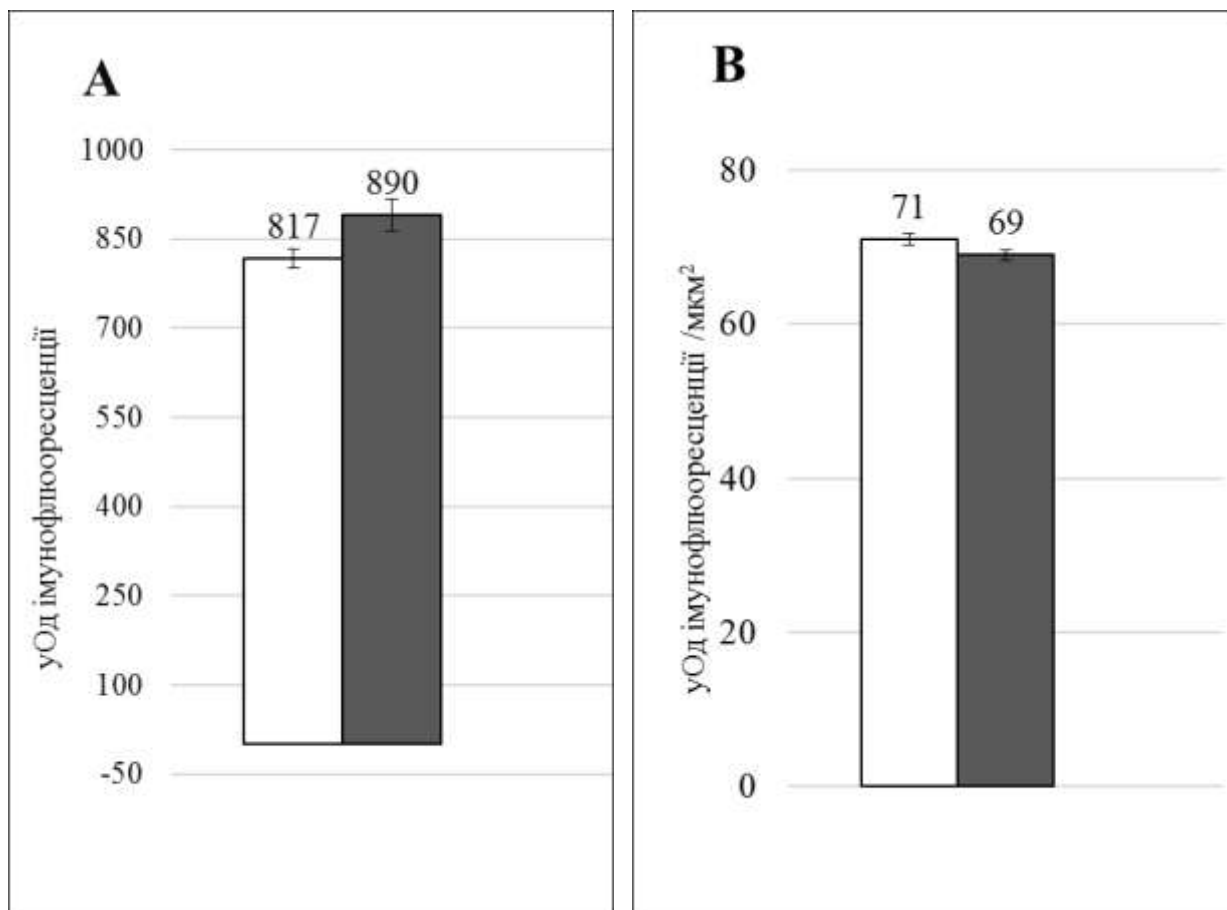
Примітка 2. □ — вміст та концентрація нейротензину.

Примітка 3. ■ — вміст та концентрація ангіотензину II.

Примітка 4. ★ достовірні відмінності показників по відношенню до щурів з ЕАГ
 $P < 0.05$.

Рис.6.7 – Співвідношення вмісту (А) та концентрації (В) нейротензину та ангіотензину II у щурів з експериментальними артеріальними гіпертензіями

Аналізуючи показники вмісту та концентрації депресорних нейропептидів було встановлено, що в щурів контрольної групи переважав вміст β -ендорфіну над BNP, проте концентрація β -ендорфіну, навпаки, була нижчою (рис.6.8).

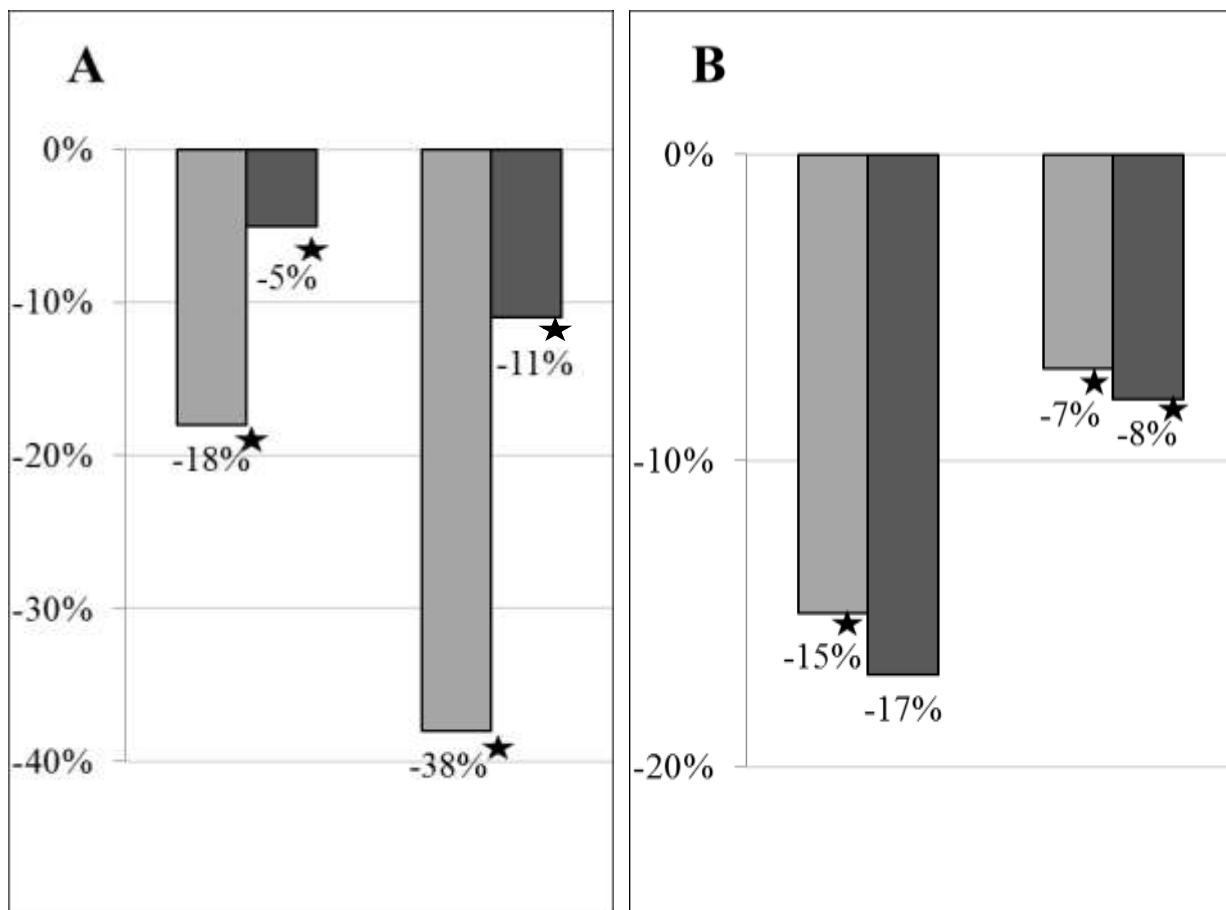


Примітка 1. □ — вміст та концентрація BNP.

Примітка 2. ■ — вміст та концентрація β-ендорфіну.

Рис.6.8 – Вміст (А) та концентрація (В) депресорних нейропептидів (BNP та β-ендорфіну) у щурів контрольної групи

У щурів зі сформованою АГ відмічалися односпрямовані зміни вмісту депресорних нейропептидів, які характеризувалися зниженням вмісту BNP та β-ендорфіну в щурів обох моделей (рис. 6.9).



Примітка 1. За 100 % прийняті показники групи контролю.

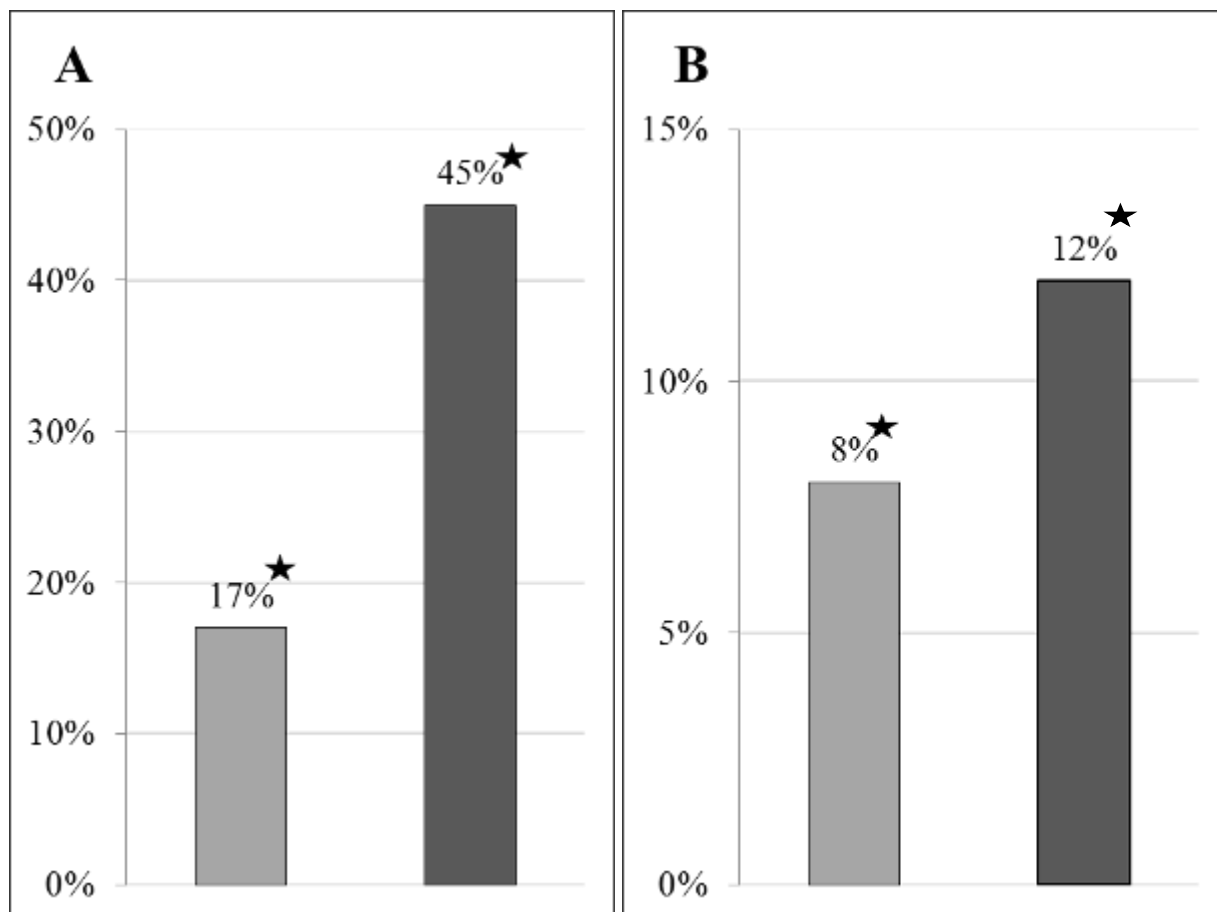
Примітка 2. □ — вміст та концентрація BNP.

Примітка 3. ■ — вміст та концентрація β-ендорфіну.

Примітка 4. ★ достовірні відмінності показників по відношенню до щурів з ЕАГ $P < 0.05$.

Рис.6.9 – Співвідношення вмісту (А) та концентрації (В) депресорних нейропептидів (BNP та β-ендорфіну) у щурів з експериментальною артеріальною гіпертензією по відношенню до показників контрольної групи

Порівнюючи показники вмісту та концентрації депресорних нейропептидів у щурів з експериментальними моделями АГ, встановлено, що вміст та концентрація BNP та β-ендорфіну переважали в щурів з ЕСАГ (рис.6.10).



Примітка 1. За 100 % прийняті показники групи щурів з ЕАГ.

Примітка 2. □ — вміст та концентрація BNP.

Примітка 3. ■ — вміст та концентрація β-ендорфіну.

Примітка 4. ★ достовірні відмінності показників по відношенню до щурів з ЕАГ $P < 0.05$.

Рис.6.10 – Співвідношення вмісту (А) та концентрації (В) BNP та β-ендорфіну в щурів з експериментальними артеріальними гіпертензіями

Отримані в ході проведеного дослідження результати вмісту та концентрації ІРМ до нейротензину в АрЯ гіпоталамуса в щурів з АГ піднімають цілий ряд питань, що потребує більш глибокого аналізу. Сьогодні немає однозначної думки про концентрацію внутрішньогіпоталамічного НТ, його роль та значення при етіологічно різних АГ. Більш того, навіть у вже досить добре вивченій лінії щурів з ЕАГ різні дослідники показують діаметрально протилежні результати вмісту НТ та висувають різні гіпотези

його ролі в розвитку та прогресуванні АГ [197]. Зокрема, в проведеному в 80-90-х роках дослідженні групою вчених Shulkes A. та співавт. було встановлено, що розподіл НТ у мозку щурів лінії SHR та нормотензивних щурів лінії Вістар-Кіото було подібним, його найвища концентрація відзначалася (55-75 пмоль/г) в гіпоталамусі. Однак, у порівнянні з нормотензивними щурами, тварини SHR мали значно нижчий рівень НТ у гіпоталамусі (-17 %), довгастому мозку (-18 %), гіпофізі (-52 %) та спинному мозку (-44 %). Отримані результати автори пояснюють передбачуваною роллю НТ в якості нейротрансмітера та його серцево-судинними ефектами після центрального та периферичного введення. Вони вважають, що знижені рівні цього пептиду можуть мати регуляторне значення при більш високому кров'яному тиску щурів лінії SHR [197-198].

Необхідно враховувати, що кількісні показники, які характеризують експресію та локалізацію того чи іншого нейрогормону в структурах мозку, залежать від методу його виявлення, стану тварин на момент дослідження (наркотизовані або в свідомості), топографічної приналежності до певних ядерних структур мозку та їхньої функції, швидкістю аксонального транспорту, синтезу та накопиченню в нейронах нейрогормона. У роботі вищезазначених авторів вивчення місцевих концентрацій НТ у мозкових структурах здійснювалося за допомогою екстракції нейрогормона з гомогенатів гіпоталамуса, гіпофіза, мозочка і стовбура мозку, а потім його відновленням та ідентифікацією радіоімуноаналізом [198].

Ще одним доказом про участь НТ у регуляції АТ були результати експериментальних досліджень, проведених Rioux D та його колегами, які показали, що інтрацереброваскулярні ін'єкції НТ призводять до помітної гіпотонії в анестезованих щурів [199].

Встановлений факт зменшення питомої площі імунореактивності до НТ в АрЯ гіпоталамуса в щурів з ЕАГ характеризує морфологічну особливість клітинних популяцій гіпоталамуса, про що неодноразово свідчили інші дослідники [200]. Зокрема, в нещодавніх морфологічних дослідженнях було

показано, що кількість нейрональних клітин у декількох ядрах гіпоталамуса знижено в щурів лінії SHR у порівнянні із нормотензивними щурами. Якщо зменшення кількості клітин є звичайним явищем для щурів лінії SHR (модель ЕАГ), то це може пояснити істотне збільшення як концентрації, так і вмісту місцевих рівнів НТ в АрЯ гіпоталамуса, у порівнянні з показниками щурів з ЕСАГ.

Таким чином, встановлений факт підвищення експресії НТ у АрЯ гіпоталамуса при стійкому підвищенні АТ, однотипність змін його вмісту при етіологічно різних АГ свідчить про замученість цього нейропептиду в регуляцію АТ.

Щодо іншого пресорного нейропептиду – АГ II, то імуногістохімічне дослідження нейронів АрЯ гіпоталамусу дозволило встановити його наявність у структурі, що підіймає питання джерела його надходження до гіпоталамусу. Доведено, що його утворення - це каскадний ферментативний процес, під час якого ангіотензиноген, синтезований астроцитами, секретується до міжклітинної рідини [201]. Після цього, під впливом ангіотензин-перетворюючого ферменту (АПФ), який широко поширений по всьому головному мозку з найбільшою концентрацією в *organum subfornicale* та *eminentia medialis*, ангіотензиноген у міжклітинній рідині перетворюється на ангіотензин II [201]. Локально утворений ангіотензин II взаємодіє зі специфічними рецепторами та чинить свою фізіологічну дію: регулює АТ, водно-сольовий обмін, стимулює секрецію вазопресину, АКТГ [202]. На даний час відомо три типи рецепторів: АТ1, АТ2 та АТ4. Активація рецепторів АТ1, які знаходяться у паравентрикулярному, супраоптичному, вентромедіальному, вентролатеральному та аркуатному ядрах гіпоталамусу, призводить до підвищення АТ, збільшення секреції вазопресину, виникнення спраги та симпатикотонії [201]. Також є припущення, що рецептор АТ2 є антагоністом рецептору АТ1, але їх концентрація в структурах, що відповідають за регуляцію АТ, суттєво нижча [201]. Саме з цим, на нашу думку, пов'язаний низький рівень АГ II при сформованій АГ у щурів

експериментальних груп. Необхідно відмітити, що фізіологічна регуляція вмісту АГ II може здійснюватися кількома механізмами, а саме за рахунок зниження синтезу астроцитами ангіотензиногену, пригнічення активності ангіотензин-перетворюючого ферменту та зміни балансу рецепторів АТ1 та АТ2. Ймовірно, в АрЯ гіпоталамусу при стабільно сформованій АГ зниження рівня нейрогормону носить захисний характер, спрямований на компенсацію негативних ефектів АГ II. Це повинно сприяти зниженню рівня натрію, зменшенню ОЦК та нормалізації системного АТ [201].

Виходячи з вищесказаного, можна припустити, що саме рівень АГ II в структурі АрЯ гіпоталамусу необхідно розглядати як важливий патогенетичний регулятор системного АТ. Більш того, за нормальних умов, без сформованої патології, збільшення або зменшення його концентрації локально в ядрі є вектором системних проявів АГ II – підвищення або зниження АТ. Тоді як при стійкому збільшенні АТ знижені концентрації свідчать про включення механізмів компенсації, які спрямовані на нормалізацію АТ.

Підтвердженням цієї думки стали роботи Hideki I., де було показано, що ін'єкції АГ II нормотензивним щурам лінії Wistar в АрЯ гіпоталамусу призводять до підвищення АТ, а введення антагоністів АТ1 рецепторів сприяє його зниженню [203-204]. Аналогічну клінічну картину спостерігали й інші дослідники, які працювали з щурами, що мали спадкову стрес-індуковану АГ. У молодих щурів цієї лінії був виявлений високий рівень мРНК ангіотензиногену та рецептору АТ1, що й обумовило нейрогенну, генетично детерміновану АГ. Проте, інтрацеребровентрикулярне введення блокатору АТ1, по-перше, призводило до зниження АТ у цих щурів, а по-друге, до зменшення рівню мРНК ангіотензиногену в гіпоталамусі [204].

Ще одним важливим фактом, встановленим в роботі, було визначення відмінностей показників експресії АГ II при етіологічно різних АГ – більш низькі його концентрації спостерігались у щурів з ЕАГ, ніж у щурів з ЕСАГ. Для пояснення встановленої відмінності необхідно враховувати

етіопатогенетичні особливості обох моделей АГ. Так, експериментальна модель вторинної, ендокринно-асоційованої АГ (ЕСАГ) [141] відтворювалась за рахунок підвищення рівня кортикостероїдів, порушення їхнього добового циркадіанного ритму та формування гіпернатріємії. Саме сформована гіпернатріємія, через примусове випаювання гіпертонічного розчину NaCl та введення преднізолону, який має альдостеронову активність, призводять до значного збільшення ОЦК. Крім того, багаторазове введення кортикостероїду чинить стимулюючий вплив на синтез ангіотензиногену в мозку, що було експериментально доведено [205].

На відміну у щурів з ЕАГ, за даними багатьох дослідників, у патогенезі формування АГ ключову роль відіграє симпатикотонія, яка протягом тривалого часу не супроводжується суттєвими змінами активності ренін-ангіотензин-альдостеронової системи [206]. Вважаємо, що саме ці етіопатогенетичні особливості сприяли більш високому вмісту АГ II в АрЯ гіпоталамуса в щурів з ЕСАГ, на відміну від показників щурів з ЕАГ.

Вивчення вмісту та концентрації депресорних нейропептидів у структурі АрЯ гіпоталамусу в щурів контрольної групи показало факт переважання β -ендорфіну над вмістом BNP, що, ймовірно, обумовлене не стільки посиленням синтезу гормону, скільки залученням більшої кількості нейронів. Підтвердженням цьому була більш висока питома площа β -ендорфіну на 16 %, порівняно з площею BNP.

Отримані в ході проведеного дослідження неоднозначні результати стосовно вмісту та балансу в АрЯ гіпоталамусу депресорних нейропептидів β -ендорфіну та BNP необхідно зв'язати з їхньою фізіологічною дією та роллю в прогресуванні серцево-судинних захворювань. Так, відомо, що BNP у нирках діє на рівні клубочків шляхом розширення приносячої артеріоли і одночасного звуження виносячої артеріоли, що призводить до збільшення клубочкової фільтрації. В каналцях дія BNP спрямована на зменшення реабсорбції натрію, що сприяє його виведенню, а також пригнічення синтезу реніну, АГ II і альдостерону [207]. В одному з досліджень при

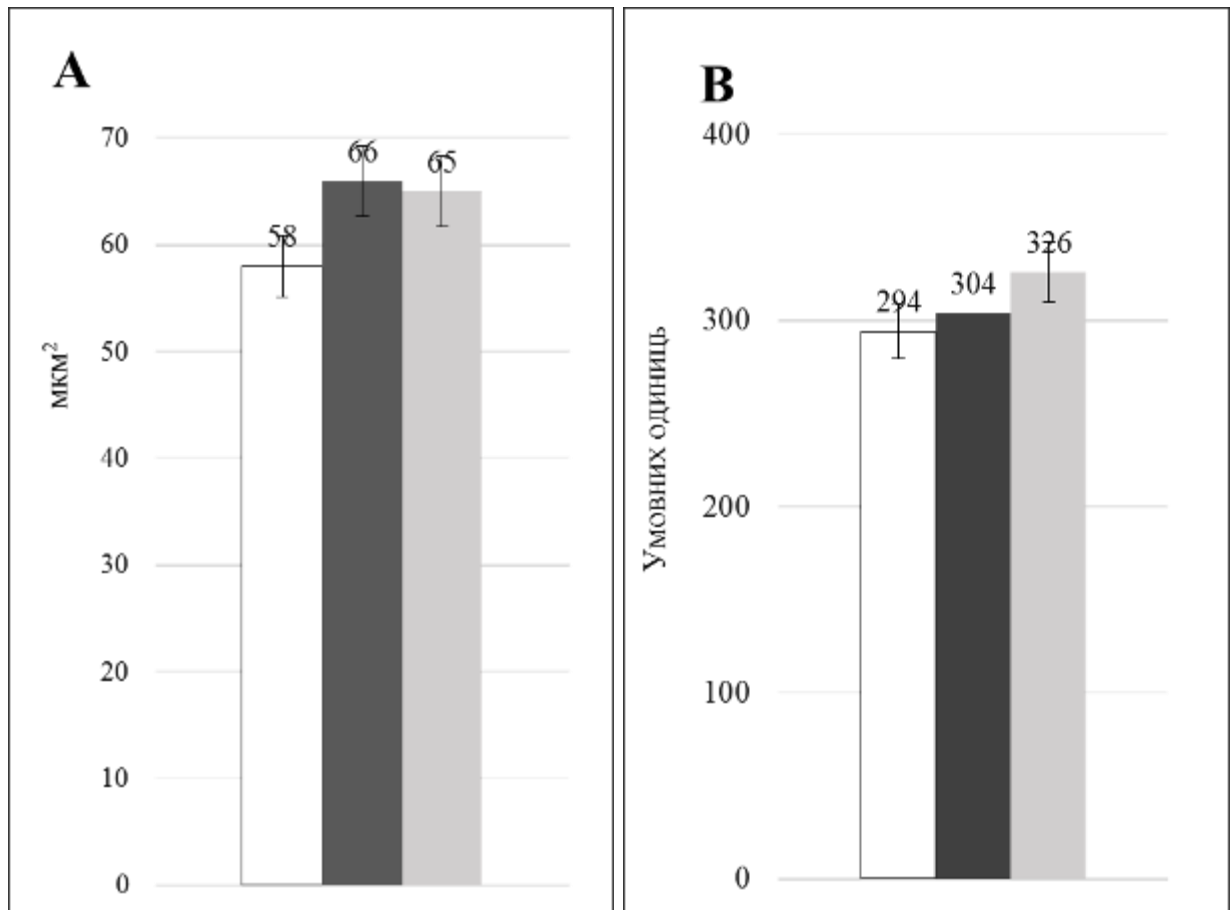
внутрішньовенному введенні BNP щурам з підвищеним тиском було відзначено значне зниження кров'яного тиску [208]. Проте доведено, що при серцевій недостатності та кардіосклерозі спостерігається прогресивне зниження вмісту BNP [209]. До того ж, сьогодні вміст BNP в сироватці крові пацієнтів використовують як прогностичний маркер серцево-судинної недостатності, а його зниження - в якості критерію декомпенсації патологічного процесу [210].

Натомість, β -ендорфін є найбільш поширеним в організмі ендорфіном. На сьогоднішній день доведено, що β -ендорфін синтезується не тільки в нейронах АрЯ, встановлений його синтез у передній долі гіпофіза, підкіркових ядрах головного мозку та Т-лімфоцитах [211-215]. Експериментально доведено, що інтрацеребральне введення β -ендорфіну призводить до тривалої і виразної анальгезуючої дії [216], в подальшому було доведено його участь у процесах регуляції дихання, тонуусу серцево-судинної системи, харчової поведінки, рухової активності [217-220].

Виходячи з цього, є припущення, що саме зниження синтезу та секреції депресорних нейрогормонів у центральному контурі регуляції АТ порушує не тільки баланс гіпоталамічних «депресорів», але й призведе до розгальмування пресорних систем.

Останнім етапом нашої роботи було вивчення морфо-функціонального стану та структурно-популяційних взаємин нейронів АрЯ гіпоталамуса.

Аналізуючи морфо-денситометричні показники ядер нейронів окремих суб'ядер АрЯ, було встановлено, що найбільшу площу ядер мають нейрони вентромедіального та вентролатерального суб'ядер. Вміст гетерогенної РНК також був найвищим у цих ядрах. Проте слід відмітити, що концентрація РНК була найвищою в дорсомедіальному суб'ядрі АрЯ (рис .6.11).






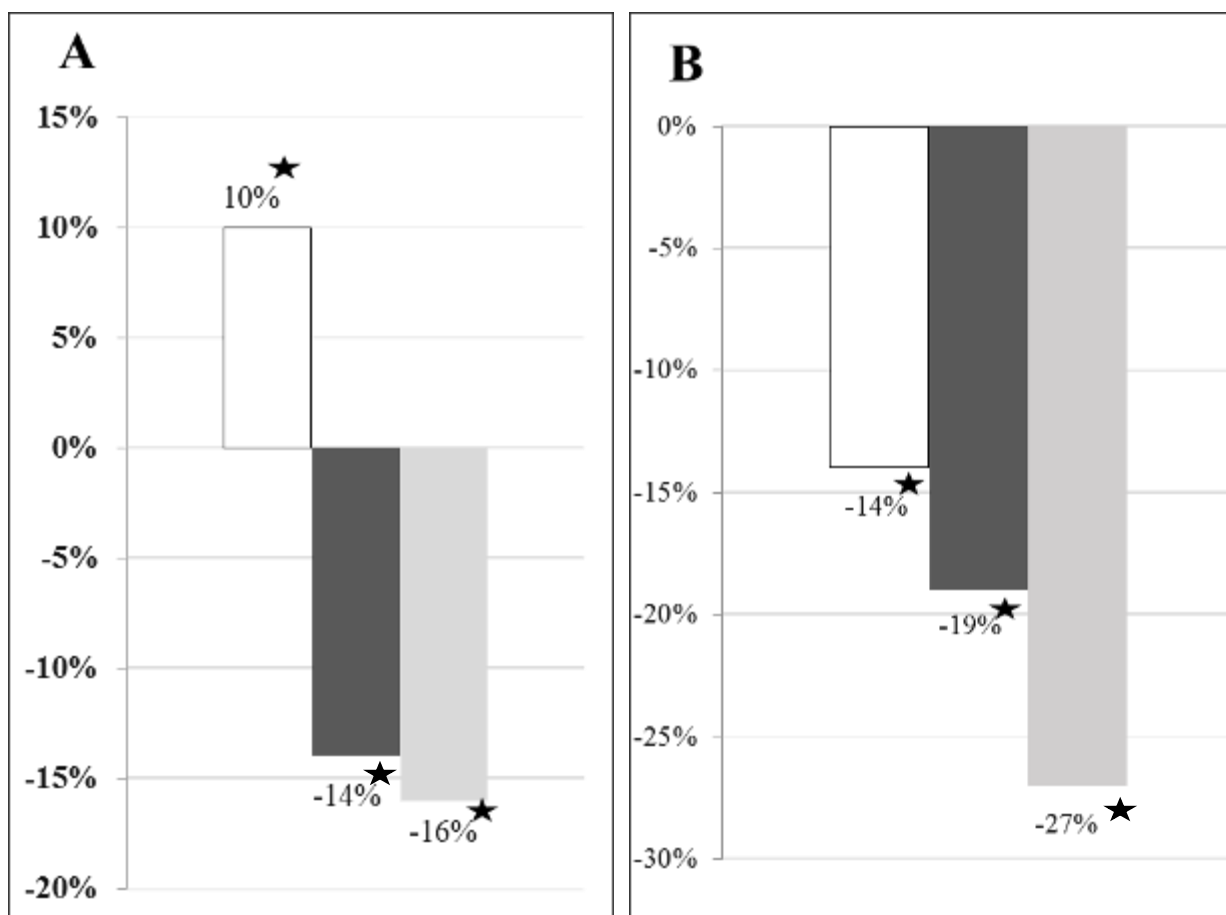
- Примітка 1.  — показники ядер нейронів дм-АрЯ суб'ядра.
 Примітка 2.  — показники ядер нейронів вм-АрЯ суб'ядра.
 Примітка 3.  — показники ядер нейронів вл-АрЯ суб'ядра.

Рис.6.11 — Площа ядер нейронів суб'ядер АрЯ (А) та вміст у них гетерогенної РНК (В) у щурів контрольної групи

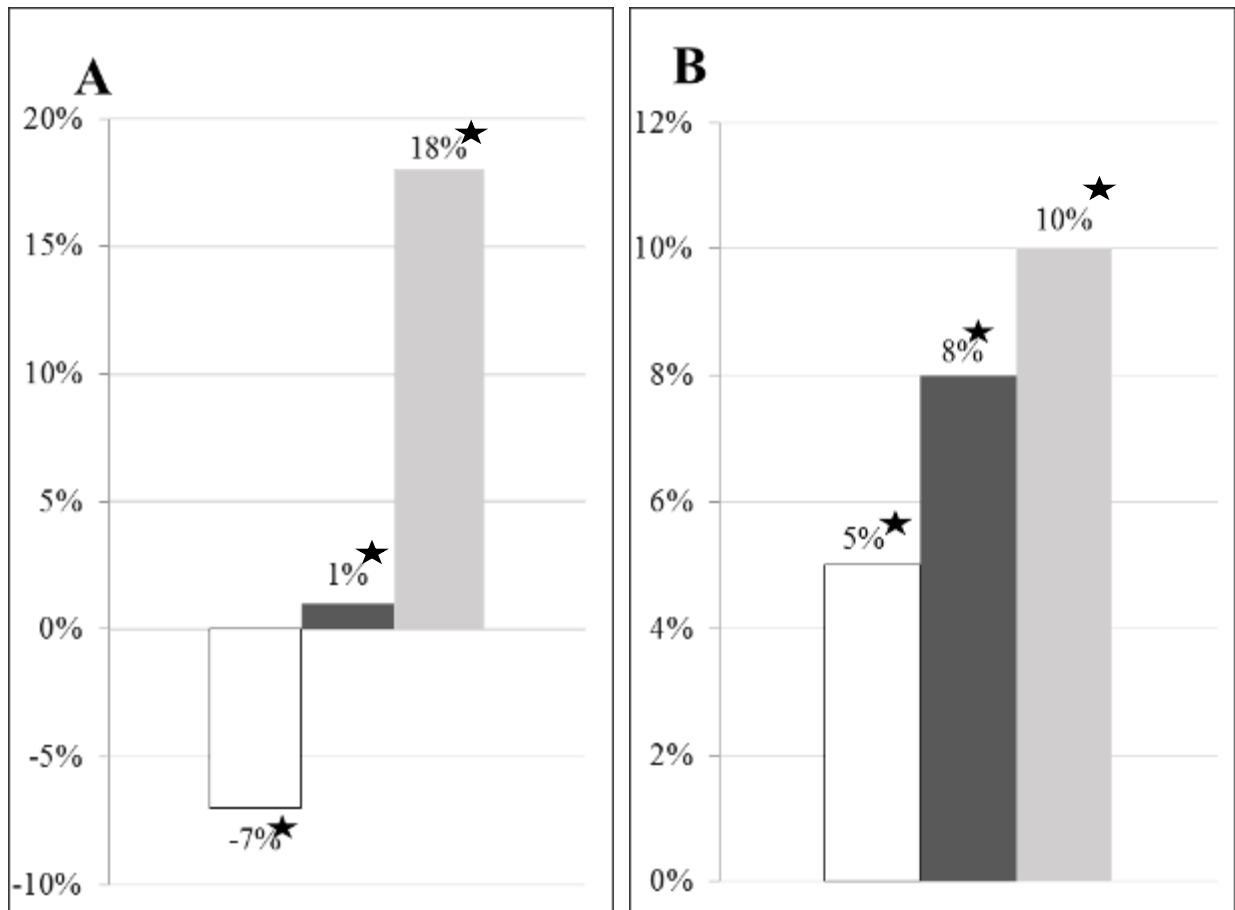
Формування есенціальної АГ у щурів лінії SHR призводить до змін морфо-денситометричних показників. Відмічається підвищення площі ядер нейронів у дм-АрЯ та її зниження у вм-АрЯ та вл-АрЯ суб'ядрах. При цьому відмічається зменшення вмісту та концентрації гетерогенної РНК в усіх трьох суб'ядрах (рис. 6.12).



Примітка 1. За 100 % прийняті показники групи контролю.
 Примітка 2. □ — показники ядер нейронів дм-АрЯ суб'ядра.
 Примітка 3. ■ — показники ядер нейронів вм-АрЯ суб'ядра.
 Примітка 4. ▒ — показники ядер нейронів вл-АрЯ суб'ядра.
 Примітка 5. ★ достовірні відмінності показників по відношенню до контрольної групи $P < 0.05$.

Рис.6.12 – Площа ядер нейронів суб'ядер АрЯ (А) та вміст у них гетерогенної РНК (В) у щурів з есенціальною артеріальною гіпертензією

У щурів з ЕСАГ була відмічена зворотна динаміка. Визначено зменшення площі ядер нейронів дм-АрЯ, водночас у вм-АрЯ та вл-АрЯ суб'ядрах каріометричний показник, навпаки, збільшувався. При цьому вміст гетерогенної РНК перевищував показник контролю в усіх трьох суб'ядрах, а її концентрація, навпаки, ставала меншою (рис. 6.13).



Примітка 1. За 100 % прийняті показники групи контролю.
 Примітка 2. □ — показники ядер нейронів дм-АрЯ суб'ядра.
 Примітка 3. ■ — показники ядер нейронів вм-АрЯ суб'ядра.
 Примітка 4. ▒ — показники ядер нейронів вл-АрЯ суб'ядра.
 Примітка 5. ★ достовірні відмінності показників по відношенню до контрольної групи $P < 0.05$.

Рис.6.13 – Площа ядер нейронів суб'ядер АрЯ (А) та вміст у них гетерогенної РНК (В) у щурів з ендокринно-сольовою артеріальною гіпертензією

Ще одним методом дослідження став каріометричний аналіз популяції нейронів за середньою площею їхніх ядер, який показав, що в щурів контрольної групи в усіх досліджуваних суб'ядрах переважали нейрони площею 51-70 μm^2 . У дм-АрЯ вони склали 74-78 %, у вм-АрЯ суб'ядра – 78 %, у вл-АрЯ – 76 %. Тоді як при сформованій АГ як у щурів із ЕСАГ, так і ЕАГ, визначені загальні особливості популяції нейронів характеризувалися зменшенням чисельності класично представлених за площею ядер нейронів,

появою в окремих суб'ядрах нейронів із дуже дрібними або дуже великими ядрами, що призвело до розширення каріометричного діапазону.

Також була визначена різноспрямованість змін каріометричного показника в популяції нейронів суб'ядер АрЯ, при цьому у дм-АрЯ суб'ядрі щурів з ЕСАГ розширення каріометричного діапазону відбулося за рахунок появи клітин із великими та дуже великими ядрами нейронів площею 71-100 мкм² (43,5 %), тоді як в групі ЕАГ – за рахунок клітин із дрібними ядрами площею 31-50 мкм² (31,5 %). Вм-АрЯ суб'ядро в групі з ЕСАГ показало зростання відсотку нейронів із дрібними ядрами площею 30-50 мкм² (23,5 %), а у ЕАГ, навпаки, виявили збільшення клітин із великими ядрами 71-100 мкм² (41 %). Різноспрямовані зміни в популяції нейронів були також притаманні вл-АрЯ суб'ядру, при цьому в щурів із ЕСАГ кластерний діапазон зсунувся в бік нейронів із дрібними та дуже дрібними ядрами 20-50 мкм² (35 %), в той час як у групі щурів з ЕАГ виявилися зворотні особливості – суттєво збільшилась популяція нейронів із великими та дуже великими ядрами 71-110 мкм² (70 %).

Проведені дослідження показали, що формування стійкого підвищення АГ супроводжується зниженням морфо-денситометричних характеристик ядер нейронів АрЯ гіпоталамуса. Особливо слід зазначити, що каріометричні показники мали певні залежності від виду моделі, її етіології та патогенетичних механізмів формування. Так, якщо при моделі есенціальної АГ у щурів з ЕАГ відзначалася вірогідно більша площа ядер нейронів АрЯ, то при моделюванні вторинної, ендокринно-асоційованої АГ, площа ядер, навпаки, ставала менше. В цьому випадку можна припустити, що особливість площі ядер нейронів у щурів з ЕАГ має генетичну природу. Зокрема, дослідження, які були проведені в 70-80-х роках минулого століття, показали, що в експериментальних щурів із різними вродженими патологіями спостерігалися анатомічні та структурні особливості мозку [221]. В роботах Nelson D.O. та Boulant J.A було показано, що в щурів лінії SHR, у порівнянні з нормотензивними щурами, зазначалося значне зниження маси мозку (-

10,6 %) та його обсягу (-11,8 %). Комп'ютеризований морфометричний аналіз тіл нейронів показав також суттєві відмінності між цими групами тварин. Нейрони з перивентрикулярної області, медіального та латерального преоптичного ядра та нейрони вентромедіального гіпоталамуса показали значно збільшену площу тіл нейронів в щурів лінії SHR у порівнянні з нормотензивними щурами. Ними ж було показано, що нейрони в паравентрикулярних та аркуатних ядрах гіпоталамуса були значно менше в щурів SHR, у порівнянні з нормотензивними щурами. Тільки нейрони супраоптичного ядра, латерального та переднього гіпоталамуса мали еквівалентні розміри нормотензивних тварин. До того ж, автори зазначили, що щільність клітин у перивентрикулярному, преоптичному та аркуатному ядрах, а також у вентромедіальному та передньому гіпоталамусі була нижча в щурів SHR [222].

Отримані дані дали можливість припустити, що поряд з морфометричними відмінностями в окремих структурах гіпоталамуса через зменшення ваги та об'єму мозку відбуваються порушення серцево-судинної та ендокринної регуляції, що пов'язані з нейрогенною гіпертензією.

Логічно припустити, що знижена функціональна та синтетична активність нейронів АрЯ характеризується не тільки зниженням експресії вивчених нейропептидів, але й, можливо, у них є й інші особливості. Так, в цілому ряді робіт було показано, що в щурів SHR (модель ЕАГ) у гіпоталамусі встановлено зниження вмісту вазопресину в 2,1 та окситоцину в 1,5 рази, але підвищення вмісту вазопресину в задній долі гіпофіза та вмісту тРНК вазопресину в супраоптичних ядрах гіпоталамуса в 1,8 рази [223].

Всі ці факти підтверджують припущення, що встановлені морфоденситометричні особливості ядер нейронів АрЯ гіпоталамусу в щурів з ЕАГ носять первинний характер та обумовлені генетичними особливостями. Ймовірно, саме вони стають вагомими чинниками формування АГ та інших множинних порушень, притаманних цій лінії тварин.

Досліджувані показники морфоденситометричних характеристик ядер нейронів АрЯ гіпоталамусу другої експериментальної моделі АГ щурів з ендокринно-сольовою гіпертензією показали дещо подібні відмінності, як у моделі з есенціальною АГ. Але в цьому випадку необхідно відмітити, що у патогенезі формування цих змін знаходяться зовсім інші механізми. Сьогодні доведено факт, що тривале введення глюкокортикоїдів формує нейрозапалення, яке опосередковане нуклеотид-зв'язуючим доменом олігомерізації - (NOD)-подібний рецепторний білок (NLRP1). Саме NLRP1 грає важливу роль у багатьох неврологічних захворюваннях, таких як хвороби Паркінсона та Альцгеймера. В роботах Beytut E. та Zhang W.H. було показано, що хронічний вплив глюкокортикоїдів посилює запалення головного мозку через запальну систему NLRP1 та викликає нейродегенерацію. Інші дослідники показали, що гострий вплив високих доз глюкокортикоїдів може збільшувати базальний рівень активних форм кисню, змінюючи захисну здатність проти окисних ферментних систем, особливо селен-глутатіонпероксидази (Se-GSH-Px), каталази та рівня редуційованого глутатіона в мозку [223-224].

Саме ці факти підтверджують встановлений у роботі факт зменшення морфоденситометричних характеристик ядер нейронів АрЯ гіпоталамусу при ЕСАГ, які можуть бути пов'язані з пошкодженням нейронів синтетичним аналогом глюкокортикоїдів – преднізолоном, що тривало вводили щурам для моделювання вторинної АГ. При цьому, в раніше проведених дослідженнях було показано зниження також синтетичних процесів в структурі АрЯ гіпоталамусу. Це супроводжувалося зменшенням вмісту АГ II, β -ендорфіну та BNP [225-226].

Таким чином, результат дослідження показав, що однотипні зміни морфоденситометричних характеристик нейронів АрЯ гіпоталамусу при АГ, різних за етіологією, мають відмінні патогенетичні механізми формування.

Загальний результат проведеного комплексного дослідження патогенетичних особливостей морфо-функціонального стану нейронів

аркуатного ядра гіпоталамусу при АГ в залежності від етіології та патогенезу її розвитку показав, що формування стійкого підвищення АТ, незалежно від етіологічного чиннику та механізмів розвитку, призводить до однотипних змін вмісту нейропептидів, експресії мРНК ізоформ NOS, її ізоформного профілю та концентрації кінцевих метаболітів NO, але показує етіозалежні особливості морфо-денситометричних параметрів ядер нейронів та їхніх структурно-популяційних взаємин у вентромедіальному, вентролатеральному та дорсомедіальному суб'ядрах аркуатного ядра гіпоталамуса.

ВИСНОВКИ

Згідно світової статистики серед осіб хворих на артеріальну гіпертензію 57 % чоловіків та 47 % жінок працездатного віку отримують інвалідність через ушкодження органів мішеней, що призводить до ранньої непрацездатності та інвалідізації. Рання специфічна профілактика, діагностика та патогенетично обґрунтоване лікування артеріальної гіпертензії суттєво знижують негативні наслідки хвороби. Тому вивчення особливостей патогенетичних ланок виникнення та формування артеріальної гіпертензії є актуальною проблемою сучасною патофізіології, що дозволить підвищити ефективність лікування, обґрунтувати нові підходи до цільового інтегрованого принципу профілактики та діагностики хвороби. У дисертаційній роботі вирішена важлива наукова проблема щодо з'ясування ролі структур мозку, а саме АрЯ гіпоталамусу, стану регуляторної системи монооксиду азоту, характеру балансу пресорно-депресорних нейропептидів та морфо-функціонального стану нейронів, при експериментальній артеріальній гіпертензії в залежності від етіології та патогенезу її розвитку.

1. В АрЯ ядрі гіпоталамусу у щурів контрольної групи більш представленою за вмістом є eNOS. Формування артеріальної гіпертензії не залежно від етіологічного чиннику та механізмів розвитку призводить до стимуляції відповідних генів конститутивних ізоформ у медіобазальному гіпоталамусі та характеризується підвищеним рівнем мРНК nNOS та eNOS, але зниженням мРНК iNOS. Імуногістохімічне дослідження вмісту ізоформ ферменту NOS показує зворотну динаміку – характерно підвищення вмісту nNOS в обох групах з АГ більш ніж на третину, iNOS на 13-15 %, на фоні зменшеного вмісту eNOS при есенціальній артеріальній гіпертензії на 6 % та при ендокринно-сольовій моделі артеріальної гіпертензії на 8 %. Вміст нітритів показує нижчі значення контролю, як у гомогенатах медіобазального гіпоталамусу (есенціальна на 43 %, ендокринно-сольова на 34 %), так і у

плазмі крові (есенціальна на 22 %, ендокринно-сольова на 29 %) на фоні підвищеної концентрації нітротирозину у плазмі крові щурів обох експериментальних груп (есенціальна на 52 %, ендокринно-сольова майже у 3 рази).

2. У щурів зі сформованою артеріальною гіпертензією не залежно від етіології та патогенезу її формування спостерігаються однотипні зміни вмісту пресорних та депресорних нейропептидів в АрЯ гіпоталамусу, які характеризуються зменшенням рівня мозкового натрійуретичного пептиду, β -ендорфіну та ангіотензину II із достовірним збільшення нейротензину; але кількісні показники та особливості їх балансу мають залежність від етіо-патогенетичних механізмів – при ендокринно-сольовій артеріальній гіпертензії спостерігається значене переважання вмісту депресорних нейропептидів у 4,3 рази, тоді як при есенціальній подібно контролю майже у три рази.

3. Відмінними рисами морфо-денситометричних показників ядер нейронів суб'ядер АрЯ гіпоталамусу у щурів із ендокринно-сольовій артеріальній гіпертензії порівняно із моделлю есенціальної артеріальної гіпертензії є протилежні характеристики порівняно з контрольними значеннями: у щурів із моделлю ендокринно-сольової артеріальної гіпертензії менші значення площі ядер та вмісту РНК на 8 % та 24 % відповідно, при ЕАГ – обидва показника більше на 5 %. У вентромедіальному суб'ядрі АрЯ в групі щурів із есенціальною артеріальною гіпертензією всі досліджувані показники нижче значень контролю, тоді як при ендокринно-сольовій тільки вміст РНК переважає на 5 %. Морфо-денситометричні характеристики ядер нейронів вентролатерального суб'ядра АрЯ у щурів із ендокринно-сольовою моделлю перевищують значення контролю на 19 % площа та на 10 % – вміст, у щурів із есенціальною артеріальною гіпертензією зворотна картина – площа ядер менше на 15 %, вміст РНК – на 27 %.

4. Морфо-денситометричні характеристики ядер нейронів суб'ядер АрЯ гіпоталамусу відрізняються в експериментальних групах та мають зворотну залежність. При есенціальній артеріальній гіпертензії у дорсомедіальному суб'ядрі АрЯ площа ядер та вміст у них гетерогенної РНК перевищують значення групи з ендокринно-сольовою моделлю на 12 % та 37 % відповідно. Однак, у вентромедіальному та вентролатеральному суб'ядрах АрЯ в групі з есенціальною моделлю навпаки, площа ядер нейронів та вміст у них РНК нижче показників групи тварин із ендокринно-сольовою артеріальною гіпертензією.

5. У контрольних щурів в усіх досліджуваних суб'ядрах АрЯ гіпоталамусу (дорсомедіальному, вентромедіальному та вентролатеральному) переважають нейрони площею 51-70 мкм² (74-78 %), але є окремі топографічні особливості нейрональної популяції. Артеріальна гіпертензія сприяє структурній популяційній перебудові у суб'ядрах АрЯ гіпоталамусу щурів, що мають загальні особливості притаманні обом моделям, але присутні патогенетичні відмінності, які відрізняються та залежать від етіології формування патології.

6. Загальні особливості перебудови популяції нейронів при сформованій артеріальній гіпертензії, як у щурів із ендокринно-сольовою так і есенціальною моделями артеріальної гіпертензії, характеризуються зменшенням чисельності класично представлених за площею ядер нейронів, появою в окремих суб'ядрах нейронів із дуже дрібними або дуже великими ядрами, через це – розширенням каріометричного діапазону. Етіо-патогенетичні особливості показують різноспрямованість змін каріометричного показника у популяції нейронів суб'ядер АрЯ: у дорсомедіальному суб'ядрі АрЯ щурів з ендокринно-сольовою моделлю відмічена поява клітин із великими та дуже великими ядрами нейронів, а в групі з есенціальною – із дрібними ядрами. Вентромедіальне суб'ядро АрЯ у групі з ендокринно-сольовою артеріальною гіпертензією показує зростання відсотку нейронів із дрібними ядрами, а у щурів із есенціальною

артеріальною гіпертензією, навпаки, характерно збільшення клітин із великими ядрами. У вентролатеральному суб'ядрі АрЯ у щурів із моделлю ендокринно-сольової артеріальної гіпертензії каріометричний діапазон зсувається у бік нейронів із дрібними та дуже дрібними ядрами, а в групі щурів з есенціальною артеріальною гіпертензією зворотні особливості – суттєво збільшена популяція нейронів із великими та дуже великими ядрами, що склали 70 %.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Jordan J. Pathophysiology of hypertension: what are our current concepts? *Der Internist*. 2015. Vol. 56 (3). P. 219–223.
2. Герасимова А. С., Олейников В. Э. Артериальная гипертензия, ассоциированная с метаболическим синдромом: особенности течения и поражения органов–мишеней (обзор литературы). *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*. 2008. №3. С. 88–101.
3. Blood pressure–lowering treatment based on cardiovascular risk: a meta–analysis of individual patient data. Sundström J, Arima H et al. *The Lancet*. 2014. Vol. 384. P. 591–598.
4. Mozaffarian D., Benjamin E. J. Heart disease and stroke statistics–2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2015. Vol. 131, № 4. P. 29–322.
5. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lim S. S., Vos T, Flaxman A. D., Danaei G. *Lancet*. 2012. Vol. 380(9859). P. 2224–2260
6. Гогин Е. Е., Сененко А. Н., Тюрин Е. И. Артериальные гипертензии / 2–е изд. перераб. и доп. Ленинград: *Медицина*. № 2. 1983. С. 272 .
7. Агранович Н. В., Анопченко А. С., Кнышова С. А., Пилипович Л. А. Организация и проведение групп здоровья для лиц пожилого и старческого возраста – важный элемент, способствующий продлению активного долголетия. *Современные проблемы науки и образования*. 2015. № 3. С.1–1.
8. Mills K. T., Bundy J. D., Kelly T. N. et al. Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A Systematic Analysis of Population-Based Studies From 90 Countries. *Circulation*. 2016. Vol. 134(6). P. 441–450.
9. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control / Editors: Shanthi Mendis, Pekka Puska and Bo Norrving. Geneva: World Health Organization. 2011. 155p.

10. Горбась І. М., Смирнова О. О., Кваша І. П., Дорогой А. П. Оцінка ефективності «Програми профілактики і лікування артеріальної гіпертензії в Україні» за даними епідеміологічних досліджень. *Артеріальна гіпертензія*. 2010. № 6(14). С. 51–67.

11. Дорогой А. П. Термін виконання «Програми профілактики і лікування артеріальної гіпертензії в Україні» закінчився, проблеми залишилися. Що далі? *Артеріальна гіпертензія*. 2011. № 3(17). С. 29–36.

12. Скворцова В. И. Артериальная гипертония и цереброваскулярные нарушения. «Системные гипертензии», приложение Consilium Medicum / Изд-во Медиа Медика. 2005. № 2. С. 3–9.

13. Клинико–генетические аспекты формирования артериальной гипертензии в 75 условиях действия хронического стресса. Луцкий И. С., Зяблицев С. В., Луцкий Е. И., Кишеня М. С., Чернобровцев П. А. *Фундаментальные исследования*. 2014. Т. 10. С. 1753–1758.

14. Goldblatt H., Kahn J. R., Hanzal R. F. Studies on Experimental Hypertension. *J. Exp. Med.* 1939. Vol. 69. P. 649–674.

15. Brenner H. R., Baer L., Sealey J. E., Ledingham J. G., Laragh J. H. The influence of potassium administration and potassium deprivation on plasma renin in normal and hypertensive subjects. *Journal of Clinical Investigation*. 1970. P. 2128–2138.

16. Bergmann N., Gyntelberg F., Faber J. The appraisal of chronic stress and the development of the metabolic syndrome: a systematic review of prospective cohort studies. *Endocrine Connections*. 2014. Vol. 3(2). P. R55–R80.

17. Chronic stress, glucocorticoid receptor resistance, inflammation, and disease risk. Cohen S., Janicki–Deverts D., Doyle W. J. et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. Vol. 109(16). P. 5995–5999.

18. Hypertension. The clinical management of primary hypertension in adults. Clinical guideline 127: Methods, evidence, and recommendations. Commissioned by the National Institute for Health and Clinical Excellence. 2011. Vol. 150(14). P. 490.

19. Parati G, Esler M. The human sympathetic nervous system: its relevance in hypertension and heart failure. *European heart journal*. 2012. Vol. 33. P. 1058–1066.
20. Backé E. M, Seidler A., Latza U., Rossnagel K., Schumann B. The role of psychosocial stress at work for the development of cardiovascular diseases: a systematic review. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 2012. Vol. 85(1). P. 67–79.
21. Постнов Ю. В., Орлов С. Н. Первичная гипертензия как патология клеточных мембран. Москва: *Медицина*. №2. 1987. С.192 .
22. Акопян А. С., Корякин М. В. Артериальная гипертензия и заболевания почек: фактор врача и фактор социума. *Качественная клиническая практика*. 2008. № 3. С. 116–126.
23. Brown J. J., Davies D. L., Lever A. F., Robertson J. I. S. Plasma renin concentration in human hypertension 1: Relationship between renin, sodium and potassium. *British Medical Journal*. 1965. Vol. 2(5454). P. 144–148.
24. Bruno R. M., Ghiadoni L., Seravalle G., Dell'Oro R., Taddei S., Grassi G. Sympathetic regulation of vascular function in health and disease. *Frontiers in Physiology*. 2012. Vol. 3. Art. 284. P. 1–15.
25. Ghiadoni L., Taddei S., Virdis A. Hypertension and endothelial dysfunction: therapeutic approach. *Current vascular pharmacology*. 2012. Vol. 10(1). P. 42–60.
26. Bird I. M. Endothelial nitric oxide synthase activation and nitric oxide function: new light through old windows. *Journal of Endocrinology*. 2011. Vol. 210(3). P. 239–241.
27. Crowley S. D. The cooperative roles of inflammation and oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Antioxidants & redox signaling*. 2014. Vol. 20(1). P. 102–120.
28. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*. 2012. Vol. 33 (7). P. 829–837.

29. Kim Y. W., West X. Z., Byzova T. V. Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Journal of molecular medicine*. 2013. Vol. 91(3). P. 323–328.
30. Inflammation, immunity, and hypertension. Harrison D. G., Guzik T. G., Lob H. et al. *Hypertension*. 2011. Vol. 57(2). P. 132–140.
31. Inflammation and hypertension: the interplay of interleukin–6, dietary sodium, and the renin–angiotensin system in humans. Chamarthi B., Williams G. H., Ricchiuti V. et al. *American journal of hypertension*. 2011. Vol. 24(10). P. 1143–1148.
32. Analysis of renin–angiotensinaldosteron system gene polymorphisms in resistant hypertension. Freitas S. R., Cabello P. H., Moura–Neto R. S. et al. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 2007. Vol. 40, № 3. P. 309–316.
33. Morris R. C. Jr, Schmidlin O., Sebastian A., Tanaka M., Kurtz T. W. Vasodysfunction that involves renal vasodysfunction, not abnormally increased renal retention of sodium, accounts for the initiation of salt–induced hypertension. *Circulation*. 2016. Vol. 133. P. 881–893.
34. Hall J. E. Renal dysfunction, rather than nonrenal vascular dysfunction, mediates salt–induced hypertension. *Circulation*. 2016. Vol. 133. P. 894–906.
35. Engin A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. *Advance in experimental medicine and biology*. 2017. Vol. 960 P. 1–17
36. Management of high blood pressure in children and adolescents: Recommendations of the European Society of Hypertension. Lurbe E., Cifkova R. et al. *J. Of Hypertens*. 2009. Vol. 27. P. 1719–1742.
37. A switch in the mechanism of hypertension in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. Bailey M. A., Paterson J. M., Hadoke P. W. et al. *J Am Soc Nephrol*. 2008. Vol. 19. P. 47–58.
38. Evidence-Based Guideline for the Management of High Blood Pressure in Adults: Report From the Panel Members Appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). James P. A., Oparil S., Carter B. L. et al. *JAMA*. 2014. Vol. 311(5). P. 507–520.

39. Systematic review: diagnostic procedures to differentiate unilateral from bilateral adrenal abnormality in primary aldosteronism. Kempers M. J., Lenders J. W., van Outheusden L. et al. *Ann Intern Med.* 2009. Vol. 151(5). P. 329–37.
40. Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an endocrine society clinical practice guideline. Funder J. W., Carey R. M., Fardella C. et al. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008. Vol. 93(9). P. 3266–3281.
41. Eurostat. Eurostat Statistics. – Luxembourg : *Statistical Office of the European Commission*, 2012.
42. Vilela L. A. P., Almeida M. Q. Diagnosis and management of primary aldosteronism. *Archives of endocrinology and metabolism.* 2017. Vol. 61(2) P. 305–312.
43. Approach to the surgical management of primary aldosteronism. M. Iacobone, M. Citton, G. Viel et al. *Gland Surgery.* 2015. Vol. 4. P. 69–81.
44. Young W. Primary aldosteronism: renaissance of syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf.).* 2007. Vol. 66. P. 607–618.
45. Dick S. M., Queiroz M., Bernardi B. L. et al. Update in diagnosis and management of primary aldosteronism. *Clinical chemistry and laboratory medicine.* 2018. Vol. 56(3). P. 360–372.
46. Characterization of a novel gain of function glucocorticoid receptor knockin mouse. J. Zhang, R. Ge, C. Matte–Martone et al. *J Biol Chem.* 2009. Vol. 284(10). P. 6249–6259.
47. Hypertension in obese type 2 diabetes patients is associated with increases in insulin resistance and IL–6 cytokine levels: potential targets for an efficient preventive intervention. L. Lukic, N. M. Lalic, N. Rajkovic et al. *International journal of environmental research and public health.* 2014. Vol. 11(4). P. 3586–3598.
48. West I. C. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med.* 2000. Vol.17. P. 171–180.

49. Ghimire K., Altmann H. M., Straub A. C., Isenberg J. S. Nitric oxide: what's new to NO? *American journal of physiology. Cell Physiology*. 2017. Vol. 312(3). P. 254–262.
50. Henning E. C., Warach S., Spatz M. Hypertension–induced vascular remodeling contributes to reduced cerebral perfusion and the development of spontaneous stroke in aged SHRSP rats. *J. Cerebr. Blood F. Met.* Vol. 30. P. 827–836
51. Okamoto K., Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Circulation J.* 1963. Vol. 27. P. 282–293.
52. Engelmann G. L., Vitullo J. C., Gerrity R. G. Morphometric analysis of cardiac hypertrophy during development, maturation, and senescence in spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res.* 1987. Vol. 60. P. 487–494.
53. Pathogenetic similarity of strokes in stroke–prone spontaneously hypertensive rats and humans. Yamori Y., Horie R., Handa H. et al. *Stroke* 1976. Vol. 7. P. 46–55.
54. Okamoto K., Yamori Y., Nagaoka A. Establishment of stroke–prone spontaneously hypertensive rats (SHR). *Circ. Res.* 1974. Vol. 34/35. P. 143–153.
55. Goldblatt H., Lynch J., Hanzal R. F., Summerville W. W. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J. Exp. Med.* 1934. Vol. 59. P. 347–379.
55. Renin, aldosterone body fluid volumes and the baroreceptor reflex in the development and reversal of Goldblatt hypertension in conscious dogs. Liard J. F., Cowley A. W. Jr, McCaa R. E. et al. *Circ. Res.* 1974. Vol. 34. P. 549–560.
56. Suzuki H., Saruta T., Ferrario C. M., Brosnihan K. B. Characterization of neurohormonal changes following the production of the benign and malignant phases of two–kidney, two–clip Goldblatt hypertension. *Jpn. Heart J.* 1987. Vol. 28. P. 413–426.
57. Role of tissue renin in the pathophysiology of hypertension in TGR (mREN2) 27 rats. M. Bader, Y. Zhao, M. Sander et al. *Hypertension*. 1992. Vol. 19. P. 681–686.

58. Garwitz E. T., Jones A. W. Aldosterone infusion into the rat and dose-dependent changes in blood pressure and arterial ionic transport. *Hypertension*. 1982. Vol. 4. P. 374–381.
59. Podocyte injury underlies the glomerulopathy of Dahl salt-hypertensive rats and is reversed by aldosterone blocker. M. Nagase, S. Shibata, S. Yoshida et al. *Hypertension*. 2006. Vol. 47. P. 1084–1093.
60. Guyton A. C. Blood pressure control—special role of the kidneys and body fluids. *Science* 1991. Vol. 252. P. 1813–1816.
61. Thrasher T. N. Unloading arterial baroreceptors causes neurogenic hypertension. *Am. J. Physiol.* 2002. Reg. I. Vol. 282. P. R1044–R1053.
62. Krieger E. M. Neurogenic hypertension in the rat. *Circ. Res.* 1964. Vol. 15 P. 511–521.
63. Trindade Jr A. S., Moreira E. D., Silva G. J. J., Krieger E. M. Evidence that blood pressure remains under the control of arterial baroreceptors in renal hypertensive rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2009. Vol. 42. P. 954–957.
64. Thrasher T. N. Unloading arterial baroreceptors causes neurogenic hypertension. *Am. J. Physiol.* 2002. Reg. I. Vol. 282. P. R1044–R1053.
65. Role of vasopressin in salt-induced hypertension in baroreceptor-denervated uninephrectomized rabbits. M. Ryuzaki, H. Suzuki, K. Kumagai et al. *Hypertension*. 1991. Vol. 17. P. 1085–1091.
66. Ramchandra R., Barrett C. J., Malpas S. C. Chronic blockade of nitric oxide does not produce hypertension in baroreceptor denervated rabbits. *Hypertension*. 2003. Vol. 42. P. 974–977.
67. DiBona G. F., Jones S. Y. Dynamic analysis of renal nerve activity responses to baroreceptor denervation in hypertensive rats. *Hypertension*. 2001. Vol. 37. P. 1153–1163.
68. Liu M. Y., Li N., Li W. A., Khan H. Association between psychosocial stress and hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Neurosurgical research*. 2017. Vol. 39(6). P. 573–580.

69. Papanek P. E., Wood C. E., Fregly M. J. Role of the sympathetic nervous system in cold-induced hypertension in rats. *J. Appl. Physiol.* 1991. Vol. 71. P. 300–306.
70. Biancardi V. C., Bergamaschi C. T., Lopes O. U., Campos R. R. Sympathetic activation in rats with L-NAME-induced hypertension. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2007. Vol. 40. P. 401–408.
71. Psychosocial stress can induce chronic hypertension in normotensive strains of rats. J. P. Henry, Y. Y. Liu, W. E. Nadra et al. *Hypertension.* 1993. Vol. 21. P. 714–723.
72. Barrett C. J., Guild S. J., Ramchandra R., Malpas S. C. Baroreceptor denervation prevents sympathoinhibition during angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension.* 2005. Vol. 46. P. 168–1721.
73. Lambert E. A., Schlaich M. P. Reduced sympathoneural responses to the cold pressor test in individuals with essential hypertension and in those genetically predisposed to hypertension. No support for the «pressor reactor» hypothesis of hypertension development. *Am J Hypertens.* 2004. Vol. 17(10). P. 863–868.
74. Doris P. A. Genetics of hypertension: an assessment of progress in the spontaneously hypertensive rat. *Physiological genomics.* 2017. Vol. 49(11). P. 601–617.
75. A brain leptin–renin angiotensin system interaction in the regulation of sympathetic nerve activity. A. M. Hilzendeger, D. A. Morgan, L. Brooks et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012. Vol. 303. P. 197–206.
76. Ricardo J. A., Koh E. T. Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypo– thalamus, amygdala and other forebrain structures in the rat. *Bruin Res.* 1978. Vol. 153. P. 1–26.
77. Hamer M., Steptoe A. Association between physical fitness, parasympathetic control, and proinflammatory responses to mental stress. *Psychosomatic Medicine.* 2007. Vol. 69(7). P.660–666.

78. Turton W. E., Ciriello J., Calaresu F. R. Changes in forebrain hexokinase activity after aortic baroreceptor denervation. *Am J Physiol.* 1986. Vol. 251 (2pt 2). P. 274–281.

79. Columbo J. A., Whitmoyer D. I., Sawyer C. H. Local changes in multiple unit activity induced by electrochemical means in preoptic and hypothalamic areas in the female rat. *Brain Res.* 1974. Vol. 71(1). P. 35-45.

80. Solano-Flores L. P., Rosas-Arellano M. P., Ciriello J. Fos induction in central structures after afferent renal nerve stimulation. *Brain Res.* 1997. Vol. 753. P. 102–119.

81. Release of catechols from the adrenal medulla: Activation of the sympathetic vasodilator nerves to the skeletal muscles in the cat by hypothalamic stimulation. R. Grant, P. Lindgren, A. Rosen, B. Uvnas. *Acta Physiol Scand.* 1958. Vol. 43. P. 135–154.

82. Christ J. F. Derivation and boundaries of the hypothalamus, with atlas of hypothalamic grisea. In *The Hypothalamus* / Edited by W Haymaker, E Anderson, and WJH Nauta. Springfield: Charles C. Thomas. 1969. P. 13–60.

83. Pfeiffer A., Feuerstein G., Zerbe R.L. Mu–receptors mediate opioid cardiovascular effects at anterior hypothalamic sites through sympath–adrenomedullary and parasympathetic pathways. *Endocrinology.* 1983. Vol. 113, № 3. P. 929– 938.

84. Huang M. H., Wolf S. G., Armour J. A. Ventricular arrhythmias induced by chemically modified intrinsic cardiac neurons. *Cardiovasc. Res.* 1994. Vol. 28, №5. P.636–642.

85. James R. G. G., Arnold J. M. O., Allen J. D. The effects of heart rate, myocardial ischemia and vagal stimulation on the threshold for ventricular fibrillation. *Circulation.* 1977. Vol. 55(2). P.311–317.

86. Chronwall B. M. Anatomy and physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus. *Peptides.* 1985. Vol 6(2). P. 1–11.

87. Langlet F. Tanycytes: a gateway to the metabolic hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 2014. Vol. 26. P. 753–760.

88. O'Shea R. D., Gundlach A. L. Preproneuropeptide Y messenger ribonucleic acid in the hypothalamic arcuate nucleus of the rat is increased by food deprivation or dehydration. *J Neuroendocrinol.* 1991. Vol. 3. P. 11–14.

89. Neuropeptide Y projections from arcuate nucleus to parvocellular division of paraventricular nucleus: specific relation to the ingestion of carbohydrate. M. Jhanwar-Uniyal, B. Beck, Y. S. Jhanwar et al. *Brain Res.* 1993. Vol. 631. P. 97–106.

90. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. M. A. Cowley, J. L. Smart, M. Rubinstein et al. *Nature.* 2001. Vol. 411. P. 480–484.

91. Legradi G., Lechan R. M. The arcuate nucleus is the major source for neuropeptide Y–innervation of the thyrotropin–releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology.* 1998. Vol. 139. P. 3262–3270.

92. Chronwall B. Anatomy and physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus. *Peptides.* 1985. Vol. 6. P. 1–11.

93. Saphier D., Feldman S. Electrophysiologic evidence for connections between the supraoptic and arcuate/ventromedial nuclei in the rat. *Exp. Neurol.* 1986. Vol. 92. № 3. P. 563–570.

94. Peruzzo B., Pastor, F. E, Blazquez, J. L. Polarized endocytosis and transcytosis in the hypothalamic tanycytes of therat. *Cell Tissue Res.* 2004. Vol. 2. P. 147–164.

95. Nakamura T., Bhatt S., Sapru H. N. Cardiovascular responses to hypothalamic arcuate nucleus stimulation in the rat: role of sympathetic and vagal efferents. *Hypertension.* 2009. Vol. 54. P. 1369–1375.

96. Hypothalamic Paraventricular and Arcuate Nuclei Contribute to Elevated Sympathetic Nerve Activity in Pregnant Rats: Roles of Neuropeptide Y and α -Melanocyte–Stimulating Hormone. Z. Shi, P. A. Cassaglia, L. C. Gotthardt, V. L. Brooks. *Hypertension.* 2015. Vol. 66. P. 1191–1198.

97. Subtypes Y1 and Y2 of the neuropeptide Y receptor are respectively expressed in pro-opiomelanocortin- and neuropeptide-Y-containing neurons of the rat hypothalamic arcuate nucleus. C. Broberger, M. Landry, H. Wong et al. *Neuroendocrinology*. 1997. Vol. 66. P. 393–408.

98. Csiffary A., Gorcs T. J., Palcovits M. Neuropeptide Y innervation of ACTH-immunoreactive neurons in the arcuate nucleus of rats: a correlated light and electron microscopic double immunolabeling study. *Brain Reserch*. 1990. Vol. 506. P. 215–222.

99. Brain innate immunity regulates hypothalamic arcuate neuronal activity and feeding behavior. W. L. Reis, C. X. Yi, Y. Gao, M. H. Tschöp, J. E. Stern. *Endocrinology*. 2015. Vol. 156. P. 1303–1315.

100. Brody M. J., O'Neill T. P., Porter J. P. Role of paraventricular and arcuate nuclei in cardiovascular regulation / In: Magro A, Osswald W, Reis D, Vanhoutte P, eds. *Central and Peripheral Mechanisms of Cardiovascular Regulation*. New York, NY: *Plenum Publishing Corporation*. 1986. P. 443–464.

101. Lehman M. N., Coolen L. M., Goodman R. L. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*. 2010. Vol. 151. P. 3479–3489.

102. Synaptic interactions between ghrelin- and neuropeptide Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus. J. L. Guan, Q. P. Wang, H. Kageyama et al. *Peptides*. 2003. Vol. 24. P. 1921–1928.

103. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. C. F. Elias, C. Lee, J. Kelly et al. *Neuron*. 1998. Vol. 21. P. 1375–1385.

104. Insulin acts in the arcuate nucleus to increase lumbar sympathetic nerve activity and baroreflex function in rats. P. A. Cassaglia, S. M. Hermes, S. A. Aicher, V. L. Brooks. *J Physiol*. 2011. Vol. 589 (pt7). P. 1643–1662.

105. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. M. A. Cowley, J. L. Smart, M. Rubinstein et al. *Nature*. 2001. Vol. 411. P. 480–484.

106. Wu Q., Boyle M. P., Palmiter R. D. Loss of GABAergic signaling by AgRP neurons to the parabrachial nucleus leads to starvation. *Cell*. 2009. Vol. 137. P.1225–1234.
107. Hypothalamic mTORC1 signaling controls sympathetic nerve activity and arterial pressure and mediates leptin effects. S. M. Harlan, D. F. Guo, D. A. Morgan et al. *Cell Metab*. 2013. Vol. 17. P. 599– 606.
108. Gruber K. A., Callahan M. F. ACTH-(4–10) through gamma-MSH: evidence for a new class of central autonomic nervous system-regulating peptides. *Am J Physiol*. 1989. Vol. 257 (4 pt 2). P. R681–R694.
109. Melanocortin antagonists define two distinct pathways of cardiovascular control by alpha- and gamma-melanocyte-stimulating hormones. S. J. Li, K. Varga, P. Archer et al. *J Neurosci*. 1996. Vol. 16. P. 5182–5188.
110. An excitatory paraventricular nucleus to AgRP neuron circuit that drives hunger. M. J. Krashes, B. P. Shah, J. C. Madara et al. *Nature*. 2014. Vol. 507. P. 238–242.
111. Stocker S. D., Gordon K. W. Glutamate receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus contribute to insulin-induced sympathoexcitation. *J Neurophysiol*. 2015. Vol. 113. P. 1302–1309.
112. Mastrianni J. A., Palkovits M., Kunos G. Activation of brainstem endorphinergic neurons causes cardiovascular depression and facilitates baroreflex bradycardia. *Neuroscience*. 1989. Vol. 33. P. 559–566.
113. Chronwall B. Anatomy and Physiology of the Neuroendocrine Arcuate Nucleus. *Peptides*. 1985. Vol. 6, №. 2. P. 1–11.
114. Garlow S. J., Boone E., Kinke B. Genetic Analysis of the Hypothalamic Neurotensin System. *Neuropsychopharmacology*. 2006. Vol. 31.P. 535–543.
115. TRAP-seq defines markers for novel populations of hypothalamic and brainstem LepRb neurons. M. B. Allison, C. M. Patterson, M. J. Krashes et al. *Mol Metab*. 2015, Vol. 4. P. 299–309.
116. Blockade of endogenous angiotensin-(1–7) in hypothalamic paraventricular nucleus attenuates high salt-induced sympathoexcitation and

hypertension. X. J. Yu, Y. W. Miao, H. B. Li et al. *Neurosci Bull.* 2019. Vol. 35. P. 47–56.

117. Rahmouni K., Morgan D. A. Hypothalamic arcuate nucleus mediates the sympathetic and arterial pressure responses to leptin. *Hypertension.* 2007. Vol. 49. P. 647–652.

118. Intermedin in paraventricular nucleus attenuates sympathoexcitation and decreases TLR4-mediated sympathetic activation via adrenomedullin receptors in rats with obesity-related hypertension. J. Sun, X. S. Ren, Y. Kang et al. *Neurosci Bull.* 2019. Vol. 35. P. 34–46.

119. Paraventricular nucleus is involved in the central pathway of cardiac sympathetic afferent reflex in rats. M. K. Zhong, Y. C. Duan, A. D. Chen et al. *Exp Physiol.* 2008. Vol. 93. P. 746–753.

120. Reactive oxygen species in the paraventricular nucleus mediate the cardiac sympathetic afferent reflex in chronic heart failure rats. Y. Han, Z. Shi, F. Zhang et al. *Eur J Heart Fail.* 2007. Vol. 9. P. 967–973.

121. Exercise training attenuates renovascular hypertension partly via RAS-ROS- glutamate pathway in the hypothalamic paraventricular nucleus. Y. Zhang, X. J. Yu, W. S. Chen et al. *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6. P. 1–10.

122. Swanson L. W., Sawchenko P. E. Hypothalamic integration: Organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Ann. Rev. Neurosci.* 1983. Vol. 6. P. 269–324.

123. Angiotensin II enhances GABA(B) receptor-mediated responses and expression in nucleus tractus solitarii of rats. Q. Zhang, F. Yao, S. T. O'Rourke et al. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009. Vol. 297. P. H1837–H1844.

124. SOD1 gene transfer into paraventricular nucleus attenuates hypertension and sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats. N. Yuan, F. Zhang, L. L. Zhang et al. *Pflugers Arch.* 2013. Vol. 465(2). P. 261–270.

125. Kawabe T., Kawabe K., Sapru H. N. Effect of barodenervation on cardiovascular responses elicited from the hypothalamic arcuate nucleus of the rat. *PLoS One.* 2012. Vol. 7(12). P. 53111.

126. Glutamatergic innervation of neuropeptide Y and pro-opiomelanocortin-containing neurons in the hypothalamic arcuate nucleus of the rat. J. Kiss, Z. Csaba, A. Csa'ki, B. Hala'sz. *Eur J Neurosci.* 2005. Vol. 21. P. 2111–2119.

127. GABAergic nature of hypothalamic leptin target neurones in the ventromedial arcuate nucleus. M. L. Ovesjo, M. Gamstedt, M. Collin, B. Meister. *J Neuroendocrinol.* 2001. Vol. 13. P. 505–516.

128. Li D. P., Pan H. L. Role of gamma-aminobutyric acid (GABA) A and GABAB receptors in paraventricular nucleus in control of sympathetic vasomotor tone in hypertension. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007. Vol. 320. P. 615–626.

129. Protein kinase CK2 contributes to diminished small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activity of hypothalamic pre-sympathetic neurons in hypertension. J. Pachuaau, D. P. Li, S. R. Chen et al. *J Neurochem.* 2014. Vol. 130(5). P. 657–667.

130. Пат. на корисну модель, 128145 Україна, МПК G01N 33/50. Комплексний спосіб детекції нейропептидів в нейронах мозку щурів при імуногістохімічному дослідженні / Колесник Ю.М., Ганчева О.В., Абрамов А.В., Іваненко Т.В., Тіщенко С.В., Данукало М.В; заявник і патентовласник Запорізький держ. мед. ун-т № и № 2018. 0160319.02.18 ; заявл. 19.02.2018; опубл. 10.09.2018, Бюл. № 17.

131. Современные подходы и новые методические возможности в оценке функционального состояния мелких лабораторных животных. Ю. М. Колесник, О. В. Ганчева, А. В. Абрамов и др. *Патология.* 2017. Т. 3(41). С. 364–370.

132. Nitrosative stress, hypernitrosylation, and autoimmune responses to nitrosylated proteins: new pathways in neuroprogressive disorders including depression and chronic fatigue syndrome. G. Morris, M. Berk, H. Klein et al. *Mol Neurobiol.* 2017. Vol. 54(6). P. 4271-4291.

133. Echade C, Pascual O, Triller A, Bessis A (2011) Nitric oxide regulates astrocyte maturation in the hippocampus: involvement of NOS2. *Mol Cell Neurosci* 46(4):762–769.
134. Пирс Э. Гистохимия / Э. Пирс. – М. : Изд-во иностр. лит., 1962. – 962 с.
135. Paxinas G. B., Watson C. C. The Rat Brain in Stereotaxis Coordinates / secondedit. Sydney: *Academia Press*. 1986. 264 p.
136. Полак Дж., Ван Норден С. Введение в иммуноцитохимию: современные методы и проблемы. Пер. с англ.– Москва: *Мир*. 1987. 74 с.
137. Norstrom A., Hansson H., Sjostrand J. Effects of colchicine on axonal transport and ultrastructure of the hypothalamo–neurohypophyseal system of the rat. *Zeitschrift for Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*. 1971. Vol. 113(2). P. 271–293.
138. Зайцев В. М., Лифляндский В. Г., Маринкин В. И. Прикладная медицинская статистика. *Фолиант*. 2006. 432 с.
139. Анализ патофизиологических моделей артериальной гипертензии у мелких лабораторных животных. Н. В. Кузьо, С. В. Тищенко, Н. Ю. Самойленко, В. В. Нифонтова. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*. 2014. Т. 14, №3 (47). С. 210–214.
140. Спадкова залежність формування метаболічних порушень у щурів лінії SHR на фоні артеріальної гіпертензії. Ю. М. Колесник, Т. В. Абрамова, Н. Ю. Самойленко, С. В. Тищенко. *Науково–практичний журнал: Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2013. №2. С. 251–252.
141. Самойленко Н. Ю., Тищенко С. В. Крысы линии SHR как адекватная модель генетически детерминированной гипертензии у человека. *Патологія*. 2014. №1(30). С. 34.
142. Пат. на корисну модель, 102234 Україна, МПК (2015.01) А 61Р 5/21, G09В 23/28, А61К 31/573. 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 і патентовласник Запорізький держ. мед. ун-т № u 201503152; заявл. 06.04.15 ; опубл. 26.10.2015, Бюл. № 20.

143. Enhanced depressor response to nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. S. Kagiya, T. Tsuchihashi, I. Abe, M. Fujishima. *Hypertension*. 1998. Vol. 31. P. 1030–1034.

144. Gibbs S. M. Regulation of neuronal proliferation and differentiation by nitric oxide. *Mol Neurobiol*. 2003. Vol. 27(2). P. 107–120.

145. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. V. Calabrese, C. Mancuso, M. Calvani et al. *Nat Rev Neurosci*. 2007. Vol. 8(10). P. 766–775.

146. Brown G. C. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide*. 2010. Vol. 23(3). P. 153–165.

147. Nitric oxide induces hypoxia ischemic injury in the neonatal brain via the disruption of neuronal iron metabolism. Q. Lu, V. A. Harris, R. Rafikov et al. *Redox Biol*. 2015. Vol. 6. P. 112–121.

148. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. F. X. Guix, I. Uribealgo, M. Coma, F. J. Munoz. *Prog Neurobiol*. 2005. Vol. 76(2). P. 126–152.

149. Signaling and stress: the redox landscape in NOS2 biology. D. D. Thomas, J. L. Heinecke, L. A. Ridnour et al. *Free Radic Biol Med*. 2015. Vol. 87. P. 204–225.

150. Hardingham N., Dachtler J., Fox K. The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Front Cell Neurosci*. 2013. Vol. 7. P. 1–19.

151. Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: New players in cell differentiation and development. *Nat Rev Genet*. 2014. Vol. 15. P. 7–21.

152. Förstermann U., Sessa W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Seminars in nephrology*. 2014. Vol. 34(5). P. 532–539.

153. Kolesnyk Yu. M., Gancheva O. V., Tishchenko S. V. The pattern of the NOS isoforms expression in arcuate nucleus of hypothalamus in experimental hypertension. *Патологія*. 2017. Т. 14, №1(39). С. 38–43.

154. Ганчева О. В., Тищенко С. В., Богатирчук Н. С. Сравнительный анализ паттерна распределения nNOS в сосудистом и тканевом компартментах аркуатного ядра гипоталамуса. *Сучасні аспекти медицини і фармації.– 2015*: зб. тез Всеукраїнської наук.–практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнародною участю. Запоріжжя: ЗДМУ, 2015. С. 40–41.

155. Ганчева О. В., Тищенко С. В., Богатирчук Н. С. Анализ распределения эндотелиальной синтазы оксида азота в аркуатном ядре гипоталамуса у крыс со спонтанной артериальной гипертензией. Всеукраїнська науково–практична конференція молодих вчених та студентів. *Здобутки теоретичної медицини в практику охорони здоров'я* : зб. тез Всеукраїнської наук.–практ. конф. молодих вчених та студентів. Запоріжжя: ЗДМУ, 2016. С. 45.

156. Тищенко С. В. Анализ распределения нейрональной синтазы оксида азота в аркуатном ядре гипоталамуса у крыс со спонтанной артериальной гипертензией. *Іновації в медицині* : зб. тез 85–ої наук.–практ. конф. студентів і молодих вчених із міжнар. участю. Івано–Франківськ : 2016. С. 257.

157. Вплив артеріальної гіпертензії на стан системи оксиду азоту в експерименті. О. В. Ганчева, М. І. Федотова, С. В. Тищенко, М. В. Данукало. *Інтегративні механізми пат. процесів: від експеримент. досліджень до клінічної практики*: матеріали VII Пленуму Всеукр. наук. товариства патофізіологів та наук.–практ. конф., присв. 110–річчю з дня народження чл.–кор. АМН СРСР, проф. М.Н. Зайка. Полтава, 2018. С. 17.

158. Iellamo F. Neural mechanisms of cardiovascular regulation during exercise. *Autonomic Neuroscience*. 2001. Vol. 90 (2). P. 66–75.

159. Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. H. Hsueh, Y. He, A. Kastin et al. *Brain*. 2008. Vol. 132(4). P. 889–902.

160. Merchenthaler I., Lennard D. E. The Hypophysiotropic Neurotensin–Immunoreactive Neuronal System of the Rat Brain. *The Endocrine Society*. 2016. Vol. 129, №6. P. 2875–2981.
161. Judd E. K., Calhoun D. A., Warnock D. G. Pathophysiology and treatment of resistant hypertension: the role of aldosterone and amiloride–sensitive sodium channels. *Semin Nephrol*. 2014. Vol. 34 (5). P. 532–539.
162. Kaczyńska K, Szereda–Przestaszewska M. Cardio–respiratory effects of systemic neurotensin injection are mediated through activation of neurotensin NTS₁ receptors. *Eur J Pharmacol*. 2012. Vol. 15, 691(1–3). P. 245–250.
163. Potential roles of neurotensin on cognition in conditions of obese–insulin resistance. N. Saiyasit, J. Sripetchwandee, N. Chattipakorn, S. C. Chattipakorn. *Neuropeptides*. 2018. Vol. 72. P. 12–22.
164. Yilmaz A., Buijs F. N., Kalsbeek A., Buijs R. M. Neuropeptide changes in the suprachiasmatic nucleus are associated with the development of hypertension. *Chronobiology International*. 2019. Vol. 36(8). P. 1072–1087.
165. Arakawa H., Chitravanshi V., Sapru H. The hypothalamic arcuate nucleus: a new site of cardiovascular action of angiotensin – (1-12) and angiotensin II *Am J of Physiol–Heart and Circ Physiol*. 2011. Vol. 3. P. 951–960.
166. The brain renin–angiotensin system: location and physiological roles. M. McKinley, A. Albiston, A. Allen et al. *The Int. J of Biochem & Cell Biol*. 2003. Vol. 35(6). P. 901– 918.
167. Jackson L., Eldahshan W., Fagan S. C., Ergul A. Within the Brain: The Renin Angiotensin System. *International journal of molecular sciences*. 2018. Vol. 19 (3). P. 876.
168. Potter L. R. Regulation and therapeutic targeting of peptide-activated receptor guanylyl cyclases. *Pharmacology & therapeutics*. 2011. Vol. 130(1) P. 71-82.
169. Application of NT–proBNP and BNP measurements in cardiac care: a more discerning marker for the detection and evaluation of heart failure. Y. Seino, A. Ogawa, T. Yamashita et al. *Eur J of Heart Fail*. 2004. Vol. 6. P. 295–300.

170. Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNAs in the rat brain. J. P. Herman, C. M. Dolgas, D. Rucker et al. *Journal of Comparative Neurology*. 1996. Vol. 369. P. 165–187.

171. Usefulness of plasma B-type natriuretic peptide to identify ventricular dysfunction in pediatric and adult patients with congenital heart disease. Y. M. Law, B. B. Keller, B. M. Feingold et al. *Am J Cardiol*. 2005. Vol. 95. P. 474–478

172. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentrations are markedly higher in the umbilical cord blood of newborns than in their mothers. A. Hammerer-Lercher, J. Mair, G. Tews G et al. *Clin Chem*. 2005. Vol. 51. P. 913–915.

173. Early detection of cardiac dysfunction by BNP in beta-thalassaemia major patients. A. N. Cheema, M. Phil, D. A. Khan et al. *Acta Cardiol*. 2012. Vol. 67. P. 331–335.

174. C-type natriuretic peptide suppresses arginine-vasopressin secretion from dissociated magnocellular neurons in newborn rat supraoptic nucleus. S. Yamamoto, I. Morimoto, N. Yanagihara et al. *Neurosci Lett*. 1997. Vol. 229(2). P. 97–100.

175. Veening J. G., Gerrits P. O., Barendregt H. P. Volume transmission of betaendorphin via the cerebrospinal fluid; a review. *Fluids Barriers CNS*. 2012. Vol. 9. P. 16.

176. Beta-Endorphin and adrenocorticotropin are secreted concomitantly by the pituitary gland. R. Guillemin, T. Vargo, J. Rossier et al. *Science*. 1977. Vol. 197. P. 1367–1369.

177. Central opioid inhibition of neuroendocrine stress responses in pregnancy in the rat is induced by the neurosteroid allopregnanolone. P. J. Brunton, A. J. McKay, A. Piastowska et al. *J. Neurosci*. 2009. Vol. 29. P. 6449–6460.

178. Тищенко С. В., Ганчева О. В., Каджарян Є. В. Порівняльний аналіз вмісту мозкового натрійуретичного пептиду та β-ендорфіну в аркуатному ядрі гіпоталамусу при артеріальній гіпертензії різного генезу. *Актуальні*

проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. 2017. Т. 17, №4(60). С. 87–91.

179. Hancheva O. V., Tishchenko S.V., Ivanenko T. V. Quantitative characteristics of the neurotensin content in the hypothalamic arcuate nucleus in arterial hypertension of different etiologies. *Патологія.* 2018. Т. 15, № 2(43). С. 176–179.

180. Тищенко С. В. Особливості експресії ангіотензину II в аркуатному ядрі гіпоталамуса експериментальних щурів при різних за етіологією артеріальних гіпертензіях. *Патологія.* 2018. Т. 15, № 3(44). С. 367–371.

181. Tishchenko S. V. The balance of pressor and depressor substances in the neurons of arcuate nucleus of hypothalamus in etiologically different arterial hypertension. *Journal of Education, Health and Sport.* 2019. Vol. 9, №4. P. 492–502.

182. Тищенко С. В., Ганчева О. В. Экспрессия мозгового натрийуретического пептида и β -эндорфина при этиологически разных моделях артериальной гипертензии. *Сучасні аспекти медицини і фармації – 2017:* зб. тез Всеукраїнської наук.–практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнародною участю. Запоріжжя: ЗДМУ, 2017. С. 115.

183. Ганчева О. В., Тищенко С. В., Мороз Д. В. Сравнительный анализ распределения нейротензина в аркуатном ядре гипоталамуса. *Сучасні аспекти медицини і фармації – 2018:* зб. тез всеукраїнської наук.–практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнародною участю. Запоріжжя: ЗДМУ, 2018. С. 40–41.

184. Tishchenko S. V. Features of the BNP and beta–endorphin expression in hypertension in different models. *Cardiovascular Research.* Vol. 114. Suppl 1 Vienna, 2018. S 24.

185. Ганчева О. В., Данукало М. В., Тищенко С. В. Аналіз показників експресії ангіотензину II в аркуатному ядрі гіпоталамуса та дорсальному моторному ядрі N. Vagus у гіпертензивних щурів. *Досягнення та*

перспективи експериментальної і клінічної ендокринології: зб. тез міжнарод. наук.–практ. конф. Харків, 2019. С. 30.

186. Ганчева О. В., Данукало М. В., Тіщенко С. В., Каджарян Є. В. Етіологічна залежність вмісту ангіотензину II в аркуатному ядрі гіпоталамусу та блакитній плямі стовбуру мозку при артеріальній гіпертензії : матеріали 20–го з'їзду Укр. фізіологічного тов.–ва з між нар. участю, присвяченого 95–річчю від дня народження академіка П.Г.Костюка (м. Київ, 27–30 трав. 2019 р.). *Фізіологічний журнал*. 2019. Т. 65, № 2. С. 50.

187. Role of astrocytes, microglia, and tanocytes in brain control of systemic metabolism. García-Cáceres C, Balland E, Prevot V, Luquet S, Woods S, Koch M et al. *Nature Neuroscience*. 2018. Vol. 22 (1). P.7-14.

188. Nazarali, A., Gutkind, J., Correa, F. and Saavedra, J. Decreased Angiotensin II Receptors in Subfornical Organ of Spontaneously Hypertensive Rats After Chronic Antihypertensive Treatment With Enalapril. *American Journal of Hypertension*. 1990, Vol. 3(1). P.59-61.

189. Тіщенко С. В., Михайличенко В. В. Вплив есенціальної артеріальної гіпертензії на морфо-денситометричні показники нейронів аркуатного ядра гіпоталамуса. «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації»: матеріали науково-практичної конференції.(м. Харків, 15 трав. 2019 р). Харків,2019. С. 173

190. Ганчева О.В., Тіщенко С.В. Артеріальна гіпертензія – як важливий фактор морфоденситометричних змін нейронів аркуатного ядра гіпоталамуса. залежність перебудов від етіології артеріальної гіпертензії. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2019. Т. 18, №1(67). С. 33–38.

191. Forstermann, U. Sessa, W. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, 2011.Vol. 33(7). P. 829-837.

192. Villanueva C., Giulivi C., Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radical Biology And Medicine*, 2010. Vol. 49(3). P. 307-316.

193. Kotsuba A., Chertok V., Babich E. Nitricoxideergic neurons of the human bulbar vasomotor center in arterial hypertension. *Zhurnal Nevrologii I Psichiatrii Im S.S. Korsakova*, 2010. Vol. 110(2). P. 61-65.

194. Villanueva C., Giulivi C., Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radical Biology And Medicine*, 2010. Vol. 49(3). P. 307-316.

195. Wang Y., Golledge J., Neuronal Nitric Oxide Synthase and Sympathetic Nerve Activity in Neurovascular and Metabolic Systems. *Current Neurovascular Research*, 2012. Vol. 10(1). P. 81-89.

196. Liu Y., Feng Q., NOing the heart: Role of nitric oxide synthase-3 in heart development. *Differentiation*, 2012. Vol. 84(1). P. 54-61.

197. Nelson D.O. Altered CNS neuroanatomical organization of spontaneously hypertensive (SHR) rats. *Brain Research*, 1981. Vol. 226. P. 119-130.

198. Lewis S., Shulkes A., Jarrott B. Regional brain concentrations of vasoactive intestinal polypeptide in normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Brain Research*, 1986. Vol. 399(1). P.173-177.

199. Quirion R., Rioux F., Regoli D. Inhibits neurotensin-induced hypotension in Rats. *Life Sci*, 1980. Vol. 27. P.1889-1895.

200. Sumners M.I., Phillips E., Richards M. Central pressor action of neurotensin in conscious rats. *Hypertension*, 1982. Vol.4. P.888-893.

201. Gunther S., Gimbrone M. Regulation by angiotensin II of its receptors in resistance blood vessels. *Nature*. 1980. Vol. 287. P. 230–232..

202. The use of plasma aldosterone and urinary sodium to potassium ratio as translatable quantitative biomarkers of mineralocorticoid receptor antagonism. Eudy R., Sahasrabudhe V., Sweeney K. et al. *Journal Of Translational Medicine*, 2011. Vol. 9(1). P. 180.

203. Bosnyak S., Jones E.S., Christopoulos Aβ-Pro7Ang III is a novel highly selective angiotensin II type 2 receptor (AT2R) agonist, which acts as a

vasodepressor agent via the AT2R in conscious spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci*, 2015. Vol. 129(6). P.297-303.

204. Chaves G.Z., Caligiorn S.M., Santos R.A. Modulation of the baroreflex control of heart rate by angiotensin-(1-7) at the nucleus tractus solitarii of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Hypertens*, 2000. Vol. 18. P.1841-1848.

205. Ferreira A. J., Moraes P. L., Foureaux G. The angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis is expressed in sinoatrial node cells of rats. *J. Histochem*, 2011.Vol.59. P. 761-768.

206. Cao L.H., Yang X.L. Natriuretic peptides and their receptors in the central nervous system. *Prog Neurobiol*, 2008. Vol. 84(3). P. 234–248.

207 Mahinrad S., de Craen AJM., Yasar S. Natriuretic peptides in the central nervous system: Novel targets for cognitive impairment.. *Neuroscience*, 2016 Vol.68. P. 148–156.

208. .Pandey K.N. Guanylyl cyclase/atrial natriuretic peptide receptor-A: Role in the pathophysiology of cardiovascular regulation. *J Physiol Pharmacol*, 2011. Vol 89. P. 557–73.

209. Namdari M., Eatemadi A., Negahdari B. Natriuretic peptides and their therapeutic potential in heart failure treatment: An updated review. *Cell Mol Biol*, 2016. Vol. 62. P. 1–7.

210. Дядык А.И. Натрийуретические пептиды (гормоны) в современной кардиологии: от теории к практике . *Ліки України*, 2008. №5.С.40-43.

211. Manuel L. Sánchez. Distribution of alpha-neoendorphin, ACTH (18–39) and beta-endorphin (1–27) in the alpaca brainstem. *Anatomia Histologia Embryologia*, 2018. Vol. 47(5). P. 481–492

212. Yamada K., Imai M., Yoshida S. Mechanism of diuretic action of U-62,066E, a kappa opioid receptor agonist. *European Journal of Pharmacology*, 1989. Vol. 160. Vol. 2. P. 229–237

213. Mao J. NMDA and Opioid Receptors: their interactions in antinociception, tolerance and neuroplasticity. *Brain Research Reviews*, 1990.Vol.

30. P. 289–304.

214 Veening J. G., Barendregt H. P. The effects of beta-endorphin: state change modification. *Fluids and barriers of the CNS*. 2015. Vol.12(3). P.254-260.

215. Bodnar R. J. Endogenous opiates and behavior. *Peptides*, 2013.Vol. 50. P.55–95.

216. Xia Y., Haddad G.G. Ontogeny and distribution of opioid receptors in the rat brainstem. *Brain Res*, 1991. Vol. 549. P.181-191.

217. Yan J. Sun The Role of Water and Sodium Ions in the Activation of the μ Opioid Receptor. *Angew. Chemie Int Ed*, 2013. Vol.52. P. 10112–10115.

218. Giraud S.Q., Kotz C.M., Billington C.J. Association between the amygdala and nucleus of the solitary tract in mu-opioid induced feeding in the rat. *Brain Res*, 1998.Vol. 802(1). P.184-188.

219. Pavan C.G., Roncari C.F., Barbosa S.P. Activation of μ opioid receptors in the LPBN facilitates sodium intake in rats. *Behav Brain Res*, 2015. Vol. 288. P. 20–25.

220. Yan J., Li J., Yan J., Sun H. Activation of μ -opioid receptors in the central nucleus of the amygdala induces hypertonic sodium intake. *Neuroscience*, 2013. Vol. 233. P. 28–43.

221 Nelson D., Boulant J., Altered CNS neuroanatomical organization in spontaneously hypertensive (SHR) rats. *BrainRes*, 1981. Vol. 226(1-2). P.119-130.

222. Bennett B., Clodfelter J., Sundberg D., Morris M. Cultured Hypothalamic Explants From Spontaneously Hypertensive Rat sHave Decreased Vasopressin and Oxytocin Content and Release. *Am J Hypertens*,1989. Vol.2(1). P. 46-51.

223.Behavioural effects of monoamine reuptake inhibitors on symptomatic domains in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder. Hiraide S., Ueno K., Yamaguchi T. et al *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2013. Vol.105. P. 89-97.

224. Kirouac G., Ganguly P. Cholecystokinin-induced release of dopamine in the nucleus accumbens of the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res*, 1995. Vol. 689(2). P. 245-253.

225. Kovarova M., Hesker P.R., Jania L. NLRP1-dependent pyroptosis leads to acute lung injury and morbidity in mice. *J Immunol*, 2012. Vol.189. P. 2006–16.

ДОДАТОК А1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Харківського національного
медичного університету МОЗ України
д. мед. н., професор В.Д. Марковський


« 11 » _____ 2018 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
результатів наукових досліджень**

1. **Найменування пропозиції:** патогенетичні особливості морфо-функціонального стану нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу при різних моделях артеріальної гіпертензії.
2. **Установа-розробник, автор:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної фізіології (69074, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26), проф. Ганчева О.В., асистент Тіщенко С.В.
3. **Джерела інформації:**
 1. Yu.M. Kolesnyk, O.V. Gancheva, S.V. Tishchenko. The pattern of the NOS isoforms expression in arcuate nucleus of hypothalamus in experimental hypertension. // Патологія, - 2017.- Т.1, №1.- С.38-43.
 2. Тіщенко С.В., Ганчева О.В., Грекова Т.А. Порівняльний аналіз вмісту мозкового натрійуретичного пептиду та β-ендорфіну в аркуатному ядрі гіпоталамусу при артеріальній гіпертензії різного генезу // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2017. – Т. 17, вип. 4 (60), ч. 2. – С. 87-91.
4. **Де і коли впроваджено:** кафедра патологічної фізіології ім. Д.О. Альперна Харківського національного медичного університету МОЗ України, квітень-жовтень 2018 року.
5. **Результати застосування методу:** матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри патологічної фізіології на практичних заняттях та лекціях з тем: «Патологія судинного тонуусу: артеріальні гіпе- та гіпотензії, атеросклероз» (обговорено на засіданні кафедри 22.11.2018 р., протокол № 18).
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3):** використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо ролі центральних механізмів регуляції артеріального тиску у формуванні артеріальної гіпертензії, що сприяє підвищенню якості їх наукової та медичної освіти.
7. **Зауваження та пропозиції:** Не вносилися.

Відповідальний за впровадження: завідувач кафедрою патологічної фізіології ім. Д.О. Альперна, д.мед.н., професор Ніколаєва Ольга Вікторівна.

Завідувач кафедри патологічної фізіології імені Д.О. Альперна
Харківського національного медичного
університету МОЗ України,
професор



О. В. Ніколаєва

ДОДАТОК А2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Дніпропетровської медичної академії МОЗ
України
професор Науменко Л.Ю.

« 12 » _____ 2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** патогенетичні особливості морфо-функціонального стану нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу при різних моделях артеріальної гіпертензії
2. **Установа-розробник, автор:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної фізіології, проф. Ганчева О.В., асистент Тіщенко С.В.
3. **Джерела інформації:**
 1. Yu.M. Kolesnyk, O.V. Gancheva, S.V. Tishchenko. The pattern of the NOS isoforms expression in arcuate nucleus of hypothalamus in experimental hypertension, // Патологія .- 2017.- Т.1, №1.- С.38-43.
 2. Тіщенко С.В., Ганчева О.В., Грекова Т.А. Порівняльний аналіз вмісту мозкового натрійуретичного пептиду та β-ендорфіну в аркуатному ядрі гіпоталамусу при артеріальній гіпертензії різного генезу // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2017. – Т. 17, вип. 4 (60), ч. 2. – С. 87-91.
4. **Впроваджено:** патогенетична роль гіпоталамусу (аркуатного ядра) в регуляції артеріального тиску та формуванні артеріальної гіпертензії.
5. **Термін впровадження:** січень 2018 - грудень 2018 рік
6. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра загальної та клінічної патофізіології Одеського національного медичного університету МОЗ України.
7. **Форма впровадження:** в навчальний процес – в матеріали лекцій і практичних занять 1-2-3-го медичних факультетів, а також в наукову роботу кафедри.

8. **Зауваження та пропозиції:** Не вносилися.

Пропозиція обговорена та затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної фізіології Дніпропетровської медичної академії МОЗ України (протокол № 11 від 5 листопада 2019).

Відповідальний за впровадження:
професор, д.мед.н.



Ю.В. Сілкина

завідувач кафедри патологічної фізіології
Дніпропетровської медичної академії
МОЗ України,
професор



М.А. Довгаль

ДОДАТОК АЗ



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** патогенетичні особливості морфо-функціонального стану нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу при різних моделях артеріальної гіпертензії
2. **Установа-розробник, автор:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної фізіології, проф. Ганчева О.В., асистент Тищенко С.В.
3. **Джерела інформації:**
 1. Yu.M. Kolesnyk, O.V. Gancheva, S.V. Tishchenko. The pattern of the NOS isoforms expression in arcuate nucleus of hypothalamus in experimental hypertension. *Патологія*. 2017.Т.1. №1 - С.38-43.
 2. Тищенко С.В., Ганчева О.В., Грекова Т.А. Порівняльний аналіз вмісту мозкового натрійуретичного пептиду та β-ендорфіну в аркуатному ядрі гіпоталамусу при артеріальній гіпертензії різного генезу. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*. 2017, Т. 17, вип. 4 (60), ч. 2, С. 87-91.
- Впроваджено:** матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри патологічної фізіології Запорізького державного медичного університету МОЗ України на практичних заняттях та лекціях з тем: «Артеріальна гіпертензія, визначення поняття, принципі класифікації, Гемодинамічні варіанти артеріальної гіпертензії. Роль порушень пресорних і депресорних систем у розвитку артеріальної гіпертензії» та «Первинна та вторинна артеріальна гіпертензія. Етіологія, патогенез. Експериментальні моделі».
4. **Термін впровадження:** вересень-грудень 2018 рік
5. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної фізіології Запорізького державного медичного університету МОЗ України.
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3):** використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо патогенетичних варіантів артеріальної гіпертензії та ролі порушення центральних (нейрогенних) механізмів регуляції у формуванні стійкого підвищення артеріального тиску, що сприяє підвищенню якості їх наукової та медичної освіти.
7. **Зауваження та пропозиції:** Не вносилися.

Пропозиція обговорена та затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної фізіології Запорізького державного медичного університету МОЗ України (протокол № 9 від 12.03.2019).

Відповідальний за впровадження зав. кафедри патофізіології, д.мед.н., професор Ганчева Ольга Вікторівна.

Завідувач кафедри патофізіології
Запорізького державного медичного
університету МОЗ України,
професор

О.В. Ганчева

ДОДАТОК А4



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи ДВНЗ
«Тернопільський державний медичний
університет імені І.Я.Горбачевського» МОЗ України
професор Шульгай А. Г.

« 14 » 02 2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** патогенетичні особливості морфо-функціонального стану нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу при різних моделях артеріальної гіпертензії
2. **Установа-розробник, автор:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної фізіології, проф. Ганчева О.В., асистент Тищенко С.В.
3. **Джерела інформації:**

1. Yu.M. Kolesnyk, O.V. Gancheva, S.V. Tishchenko. The pattern of the NOS isoforms expression in arcuate nucleus of hypothalamus in experimental hypertension. *Патологія* 2017. Т. 1, №1. С.38-43.
2. Тищенко С.В., Ганчева О.В., Грекова Т.А. Порівняльний аналіз вмісту мозкового натрійуретичного пептиду та β-ендорфіну в аркуатному ядрі гіпоталамусу при артеріальній гіпертензії різного генезу. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії* 2017. Т. 17, вип. 4 (60), ч. 2. С. 87-91.

Впроваджено: матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри патологічної фізіології Тернопільського державного медичного університету МОЗ України на практичних заняттях та лекціях з тем: «Артеріальна гіпертензія, визначення поняття, принципи класифікації. Гемодинамічні варіанти артеріальної гіпертензії. Роль порушень пресорних і депресорних систем у розвитку артеріальної гіпертензії» та «Первинна та вторинна артеріальна гіпертензія. Етіологія, патогенез. Експериментальні моделі».

4. **Термін впровадження:** вересень-грудень 2018 рік.
5. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної фізіології Тернопільського державного медичного університету МОЗ України.
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3):** використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо патогенетичних варіантів артеріальної гіпертензії та ролі порушення центральних (нейрогенних) механізмів регуляції у формуванні стійкого підвищення артеріального тиску, що сприяє підвищенню якості їх наукової та медичної освіти.
7. **Зауваження та пропозиції:** Не вносилися.

Пропозиція обговорена та затверджена на методичному засіданні кафедри патофізіології Тернопільського державного медичного університету МОЗ України (протокол № 2 від 18.02.2019).

Відповідальний за впровадження: завідувач кафедри д.мед.н., професор Денефіль О.В.

Завідувач кафедри патологічної фізіології
ДВНЗ «Тернопільський державний медичний
Університет імені І.Я. Горбачевського» МОЗ України,
д.мед.наук, професор

О.В. Денефіль

ДОДАТОК А5

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

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

Марічерда В.Г.

« 25 » _____ 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** патогенетичні особливості морфо-функціонального стану нейронів аркуатного ядра гіпоталамусу при різних моделях артеріальної гіпертензії
2. **Установа-розробник, автор:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної фізіології, професор Ганчева О.В., асистент Тіщенко С.В.
3. **Джерела інформації:**
 1. Yu.M. Kolesnyk, O.V. Gancheva, S.V. Tishchenko. The pattern of the NOS isoforms expression in arcuate nucleus of hypothalamus in experimental hypertension. // Патологія .- 2017.- Т.1, №1.- С.38-43.
 2. Тіщенко С.В., Ганчева О.В., Грекова Т.А. Порівняльний аналіз вмісту мозкового натрійуретичного пептиду та β-ендорфіну в аркуатному ядрі гіпоталамусу при артеріальній гіпертензії різного генезу // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2017. – Т. 17, вип. 4 (60), ч. 2. – С. 87-91.
4. **Впроваджено:** патогенетична роль гіпоталамусу (аркуатного ядра) в регуляції артеріального тиску та формуванні артеріальної гіпертензії.
5. **Термін впровадження:** 23.01.2018 - 12.04.2018 рік
6. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра загальної та клінічної патофізіології ім. В.В. Підвисоцького Одеського національного медичного університету МОЗ України.
7. **Форма впровадження:** в навчальний процес – в матеріали лекцій і практичних занять медичного та стоматологічного факультетів, а також в наукову роботу кафедри.
8. **Зауваження та пропозиції:** Не вносилися. Обговорено та затверджено на методичному засіданні кафедри загальної та клінічної патофізіології, протокол № 10 від 23 травня 2018 р.

Відповідальний за впровадження:

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


Вастьянов Р.С.

ДОДАТОК Б
СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ НА ТЕМУ
ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Кузьо Н.В., Тищенко С.В., Самойленко Н.Ю., Нифонтова В.В. Анализ патофизиологических моделей артериальной гипертензии у мелких лабораторных животных. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*. 2014. Т. 14, №3 (47). С.210–214. (Дисертант виконав літературний пошук).

2. Kolesnyk Yu.M., Gancheva O.V., Tishchenko S.V. The pattern of the NOS isoforms expression in arcuate nucleus of hypothalamus in experimental hypertension. *Патологія*. 2017. Т. 14, №1(39). С. 38–42. (Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів).

3. Тищенко С.В., Ганчева О.В., Грекова Т.А. Порівняльний аналіз вмісту мозкового натрійуретичного пептиду та β-ендорфіну в аркуатному ядрі гіпоталамусу при артеріальній гіпертензії різного генезу. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*. 2017. Т. 17, №4(60), Ч.2. С. 87-91. (Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів).

4. Hancheva O.V., Tishchenko S.V., Ivanenko T.V. Quantitative characteristics of the neurotensin content in the hypothalamic arcuate nucleus in arterial hypertension of different etiologies. *Патологія*. 2018. Т. 15, № 2(43). С. 176–179. (Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів).

5. Тищенко С.В. Особливості експересії ангіотензину II в аркуатному ядрі гіпоталамуса експериментальних щурів при різних за етіологією артеріальних гіпертензіях. *Патологія*. 2018. Т. 15, № 3(44). С.

367–371. *(Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів).*

6. Ганчева О.В., Тищенко С.В. Артеріальна гіпертензія – як важливий фактор морфоденсітометричних змін нейронів аркуатного ядра гіпоталамуса. залежність перебудов від етіології артеріальної гіпертензії. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2019. Т. 18, №1(67). С. 33–38. *(Дисертант виконав набір матеріалу, морфоденсітометричне дослідження та статистичну обробку результатів).*

7. Tishchenko S.V. The balance of pressor and depressor substances in the neurons of arcuate nucleus of hypothalamus in etiologically different arterial hypertension. *Journal of Education, Health and Sport*. 2019. Vol.9, №4. P. 492-502.

8. Колесник Ю.М., Абрамова Т.В., Самойленко Н.Ю., Тищенко С.В.. Спадкова залежність формування метаболічних порушень у щурів лінії SHR на фоні артеріальної гіпертензії. *Науково-практичний журнал: Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2013. №2 (19). С. 251-252. *(Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів).*

9. Самойленко Н.Ю., Тищенко С.В. Крысы линии SHR как адекватная модель генетически детерминированной гипертензии у человека. *Патологія*. 2014. №1(30). С. 34. *(Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів).*

10. Ганчева О.В., Тищенко С.В., Богатирчук Н.С. Сравнительный анализ паттерна распределения nNOS в сосудистом и тканевом компартментах аркуатного ядра гипоталамуса. *Сучасні аспекти медицини і фармації – 2015*: зб. тез Всеукраїнської наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнародною участю. Запоріжжя: ЗДМУ, 14-15 травня, 2015. С. 40-41. *(Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів).*

11. Ганчева О.В., Тищенко С.В., Богатирчук Н.С. Анализ распределения эндотелиальной синтазы оксида азота в аркуатном ядре гипоталамуса у крыс со спонтанной артериальной гипертензией. Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених та студентів. *Здобутки теоретичної медицини в практику охорони здоров'я* : зб. тез Всеукраїнської наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів. Запоріжжя: ЗДМУ, 24-25 березня, 2016. С. 45-46. (Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів).

12. Тищенко С.В. Анализ распределения нейрональной синтазы оксид азота в аркуатном ядре гипоталамуса у крыс со спонтанной артериальной гипертензией. *Іновації в медицині* : зб. тез 85-ої наук.-практ. конф. студентів і молодих вчених із міжнар. участю. Івано-Франківськ : 24-25 березня 2016. С. 258-259.

13. Тищенко С.В., Ганчева О.В. Экспрессия мозгового натрийуретического пептида и β -эндорфина при этиологически разных моделях артериальной гипертензии. *Сучасні аспекти медицини і фармації – 2017*: зб. тез Всеукраїнської наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнародною участю. Запоріжжя: ЗДМУ, 11-12 травня, 2017. С. 115. (Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів).

14. Ганчева О.В., Тищенко С.В., Мороз Д.В. Сравнительный анализ распределения нейротензина в аркуатном ядре гипоталамуса. *Сучасні аспекти медицини і фармації – 2018*: зб. тез всеукраїнської наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнародною участю. Запоріжжя: ЗДМУ, 18-25 квітня, 2018. С. 9. (Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів).

15. Ганчева О.В, Федотова М.І, Тищенко С. В, Данукало М.В. Вплив артеріальної гіпертензії на стан системи оксиду азоту в експерименті. *Інтегративні механізми пат. процесів: від експеримент. досліджень до клінічної практики*: матеріали VII Пленуму Всеукр. наук. товариства

патофізіологів та наук.-практ. конф., присв. 110-річчю з дня народження чл.-кор. АМН СРСР, проф. М.Н. Зайка. Полтава, 11-12 жовтня, 2018. С. 17. *(Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів)*.

16. Tishchenko S.V. Features of the BNP and beta-endorphin expression in hypertension in different models. *Cardiovascular Research*. V.114. Suppl 1 Vienna, 2018. S 24.

17. Ганчева О.В., Данукало М.В., Тіщенко С.В. Аналіз показників експресії ангіотензину II в аркуатному ядрі гіпоталамуса та дорсальному моторному ядрі N. vagus у гіпертензивних щурів. *Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології*: зб. тез міжнарод. наук.-практ. конф. Харків, 2019. С. 30-32. *(Дисертант виконав набір матеріалу, імуногістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів)*.

18. Тіщенко С.В., Михайличенко В.В. Вплив есенціальної артеріальної гіпертензії на морфо-денситометричні показники нейронів аркуатного ядра гіпоталамуса. «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» зб. тез міжнарод. наук.-практ. конф. Харків, 15 травня, 2019. С. 173. *(Дисертант виконав набір матеріалу, гістхімічне дослідження та статистичну обробку результатів)*.

19. Ганчева О.В., Данукало М.В., Тіщенко С.В., Каджарян Є.В. Етіологічна залежність вмісту ангіотензину 2 в аркуатному ядрі гіпоталамусу та блакитній плямі стовбуру мозку при артеріальній гіпертензії : матеріали 20-го з'їзду Укр. фізіологічного тов.-ва з між нар. участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г.Костюка (м. Київ, 27-30 трав. 2019 р.). *Фізіологічний журнал*. 2019. Т. 65, № 3. С. 50. *(Дисертант виконав набір матеріалу та імуногістхімічне дослідження)*.

ДОДАТОК В

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Науково-практичний журнал «Здобутки клінічної і експериментальної медицини» (Запоріжжя, 2013) — публікація тез.
2. Науково-практичний журнал «Патологія» (Запоріжжя, 2014) — публікація тез.
3. Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2015» (Запоріжжя, 2015) — публікація тез, усна доповідь.
4. Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я» (Запоріжжя, 2016) — публікація тез, усна доповідь.
5. Міжнародна науково-практична конференція студентів та молодих вчених «Інновації в медицині» (Івано-Франківськ, 2016) — публікація тез.
6. Міжнародна науково-практична конференція студентів та молодих вчених «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2017» (Запоріжжя, 2017) — публікація тез, усна доповідь.
7. Міжнародна науково-практична конференція студентів та молодих вчених «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2018» (Запоріжжя, 2018) — публікація тез, усна доповідь.
8. Міжнародна науково-практична конференція студентів та молодих вчених «Інтегративні механізми пат. процесів: від експеримент. досліджень до клінічної практики» (Полтава, 2018) — публікація тез, стендова доповідь.
9. Міжнародна науково-практична конференція студентів та молодих вчених «Frontiers in Cardio Vascular Biology» (Відень, 2018) — публікація тез, стендова доповідь.
10. Міжнародна науково-практична конференція студентів та молодих вчених «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень

сучасної медицини і фармації» (Харків, 2019) — публікація тез.

11. 20-й з'їзд Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, присвячений 95-річчю від дня народження академіка П. Г. Костюка (Київ, 2019) — публікація тез, стендова доповідь.