



На правах рукописи

ГОНЧАРУК
Валерий Дмитриевич

**МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ЯДЕР СТВОЛА МОЗГА
У БОЛЬНЫХ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ
ЗАБОЛЕВАНИЯМИ**

03.00.25

Гистология, цитология, клеточная биология

А в т о р е ф е р а т
на соискание ученой степени
доктора биологических наук



Москва - 2008

Работа выполнена в Российском Кардиологическом Научно-Производственном Комплексе МЗ РФ (г. Москва, Россия), Институте мозга Королевской Академии Наук Нидерландов (г. Амстердам, Нидерланды), Университете штата Альберта (г. Эдмонтон, Канада)

Научный консультант академик РАН и РАМН,
доктор медицинских наук, профессор
Чазов Евгений Иванович

Официальные оппоненты: Засл. деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор
ШВАЛЕВ Вадим Николаевич

Засл. деятель науки РФ,
доктор биологических наук, профессор
Косицын Николай Степанович

доктор биологических наук, профессор
Викторов Илья Васильевич

Ведущая организация: Российский государственный
медицинский университет

Защита состоится 5 июня 2008 г. в 15 часов на заседании диссертационного совета Д 212 203 08 при Российском университете дружбы народов, 117198, Москва, ул. Миклухо-Макляя, д 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Российского университета дружбы народов по адресу. г Москва, ул. Миклухо-Макляя, д 6.

Автореферат разослан 21 апреля 2008 г

Ученый секретарь
диссертационного совета

 Саврова О Б

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность темы

По данным Минздрава РФ социальная нестабильность в 1991-1992 гг и 1996-1998 гг вызвала небывалый рост количества заболеваний депрессией, артериальной гипертензией, резкого повышения смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. Исследование механизма длительного неблагоприятного психогенного воздействия на ЦНС, эндокринную и сердечно-сосудистую систему является чрезвычайно актуальным для разработки методов успешного терапевтического вмешательства. Следует отметить, что вопрос о роли центральных отделов нервной и эндокринной регуляции в этиологии эссенциальной гипертензии (ЭГ) впервые был поставлен и традиционно рассматривается в отечественной науке (И П Павлов, Г.Ф Ланг, А Л Мясников, Е И Чазов) Выдающийся русский клиницист Г Т Ланг на основе собственных фундаментальных исследований и критического анализа наблюдений зарубежных исследователей еще в середине прошлого века утверждал. “. мы имеем полное право предположить, что лежащее в основе гипертонической болезни нарушение функции аппарата, регулирующего кровяное давление, имеет место прежде всего в соответствующих гипоталамических центрах и заключается в состоянии повышенной возбудимости этих центров”. И далее “Наши знания о связи между функцией высших вегетативных центров в гипоталамусе и эндокринной системой еще недостаточно полны и точны. Неясна, между прочим, и роль нейрокринии, т.е. внутренней секреции некоторых ядер гипоталамуса (например, *nuclei paraventriculari*)” (Ланг, 1950) Следует отметить, что признаки повышенной секреции нейронов паравентрикулярных ядер (*nuclei paraventriculari*) гипоталамуса у больных эссенциальной гипертензией впервые были продемонстрированы спустя четверть века в патоморфологических исследованиях Ю В Постнова (Postnov et al., 1974) К сожалению, эти исследования не были продолжены, однако, теоретические воззрения Г Т Ланга получили блестящее подтверждение в

последующих клинических наблюдениях и экспериментальных исследованиях

Применение современных иммуногистохимических методов позволило выявить нервные клетки различной нейрохимической модальности, входящие в состав паравентрикулярного гипоталамического ядра, других ядер ствола мозга. Использование трансинаптического антероградного транспорта меченых вирусов позволило установить анатомические связи между ядрами, а применение электрофизиологических методов и микродиализа дало возможность изучать взаимодействие ядер при экспериментальном моделировании первичной гипертензии и, более широко, метаболического синдрома.

Паравентрикулярное гипоталамическое ядро (Pa, paraventricular hypothalamic nucleus) получает и интегрирует информацию, приходящую по четырем основным каналам от интерорецепторов, гуморальным путем, а также со стороны лимбических структур и других гипоталамических ядер. Информация от висцеральных рецепторов, ноцицепторов и терморепцепторов вначале передается по афферентным волокнами вагуса, которые образуют синапсы на нейронах ядра одиночного пути (Sol, solitary nucleus) и спинальным афферентным волокнам, которые образуют синапсы на нейронах дорсальных рогов спинного мозга (в частности, пластины I). В различные субъядра Pa эта информация затем поступает по прямым проекциям от нейронов Sol и от нейронов дорсальных рогов спинного мозга (спино-гипоталамический путь). Кроме того, от некоторых нейронов дорсальных рогов эта информация может поступать опосредованно, с переключением вначале на катехоламинергических нейронах A1/C1 (A1/C1) продолговатого мозга и далее, - на нейронах парабрахмиального ядра в среднем мозге (Sawchenko et al, 2000). Нейроны Pa, активирующие гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему, получают норадренергические входы от нейронов голубоватого места (LC, locus coeruleus) (Jedema and Grace, 2004).

Гуморальные сигналы могут поступать в Pa различными путями. Например, информация об уровне циркулирующих кортикостероидов, глюкозы и осмотических показателях крови может восприниматься нейронами Pa непосредственно либо через локальные интернейроны. Ангиотензин II воздействует на нейроны

Ра через рецепторы в околожелудочковых органах, в частности, субфорникальном органе (SFO, subfornical organ), обладающих повышенной проницаемостью гемато-энцефалического барьера (Ferguson et al, 1992, McKinley et al, 2001). Циркулирующие цитокины, такие как интерлейкин-1, могут прямо активировать афференты вагуса, которые передают эту информацию в Ра через Sol, или действовать через нейроны A1/C1 (Sawchenko et al, 2000) Кроме того, цитокины также могут активировать рецепторы в околожелудочковых органах или воздействовать через клетки эндотелия, стимулируя продукцию простагландина E₂, который как паракринный нейромедиатор передает информацию нейронам Ра (Quan et al., 2003, Zhang et al, 2003)

Информация от таких лимбических структур как орбитомедиальный отдел префронтальной коры и миндалина, связанных, как известно, с эмоциональным ответом на внешний стимул, поступает в Ра опосредованно, через нейроны ядра ложа терминальной полоски (BST, bed nucleus of the stria terminalis) и дорсомедиального гипоталамического ядра (DMH, dorsomedial hypothalamic nucleus) (Sawchenko et al., 2000)

Ра получает обширные входы не только от DMH, связанного с реакцией на стрессорное воздействие, но и от надперекрестного (супрахиазматического) ядра (SCh, suprachiasmatic nucleus), играющего важнейшую роль в управлении циркадными ритмами активности автономной нервной системы и эндокринной регуляции, а также от ядра воронки (inf, infundibular nucleus) и перифорникального ядра (PeF, perifornical nucleus), вовлеченных в регуляцию пищевого поведения и энергетического метаболизма (Ferguson and Samson, 2003; Mastorakos and Zapanti, 2004)

Ра играет решающую роль в организации ответа симпатической нервной системы и реакции эндокринной системы на действие стрессогенного фактора Сложный комплекс афферентных входов, внутренней нейрохимической регуляции, а также обширная система эфферентных выходов делают это ядро ключевой структурой, обеспечивающей поддержание гомеостаза в норме и при адаптации к изменяющимся условиям Взаимодействие Ра с другими ядрами гипоталамуса, ядрами среднего и продолговатого мозга обеспечивает широкий спектр реакций организма, различающихся в зависимости от специфики параметров стимула Нарушение функции Ра, в частности при генетической предрасположенности, может

стать существенным элементом патогенеза конгестивной сердечной недостаточности, а также гипертензии и других компонентов метаболического синдрома (Sawchenko et al, 1998, Patel 2000, Kenney et al, 2003, Benarroch, 2005) Таким образом, Pa может быть терапевтической мишенью при этих заболеваниях.

Необходимо подчеркнуть, что сведения о морфофункциональном статусе ядер ствола мозга у больных эссенциальной гипертензией, за единственным исключением давней работы Ю В Постнова (Postnov et al, 1974), практически отсутствуют В то же время, объективные клинические показатели однозначно указывают на то, что функция этих ядер может быть изменена при этом заболевании. Например, некоторые молодые здоровые люди, находясь в условиях психоэмоционального стресса, реагируют особенно высоким выбросом кортизола, что свидетельствует о повышенной возбудимости гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (HРА, hypothalamo-pituitary-adrenal axis) (Roy et al, 2001), Эти люди также характеризуются более высоким уровнем подъема артериального давления и повышенной реакцией симпатической нервной системы (Matthews et al, 2004, Flaa et al, 2006) Многолетние наблюдения показали, что, как правило, в среднем возрасте эти лица (“гиперреакторы”, по Лангу) становятся гипертониками (Matthews et al., 2004). Больные эссенциальной гипертензией демонстрируют нарушения суточных ритмов многих физиологических показателей, что указывает на функциональную недостаточность основного водителя суточных ритмов, локализованного, как известно, в супрахиазматическом ядре Подавляющее большинство сердечно-сосудистых катастроф у этих больных, в том числе и с летальным исходом, наблюдаются, как правило, в утренние часы, в момент перехода от сна к бодрствованию, что свидетельствует об особой уязвимости организма в это время Отсутствие оптимального баланса суточных ритмов активности многих систем в эти часы характерно для больных ЭГ В отношении ядер продолговатого мозга известно, например, что механическое раздражение области A1/C1, вызванное врожденным дефектом задней нижней мозжечковой артерии, ведет к активации постганглионарных волокон симпатических нервов (Schobel et al., 2002; Smith et al, 2004) и стойкому повышению артериального давления (Morimoto et al., 1997, Geiger et al, 1998, Schobel et al, 2002, Smith et al., 2004). С учетом изложенного нами было проведено сравнительное

исследование ствола мозга больных эссенциальной гипертензией, погибших от острого нарушения кровообращения, и здоровых людей, погибших от механической травмы или гипотермии

Цель работы

При посредстве методов количественной одинарной и двойной иммуногистохимии, а также гибридизации *in situ* выявить различия в организации и взаимодействии основных нейрохимических систем ствола мозга больных эссенциальной гипертензией и здоровых людей

Задачи исследования

В стволе мозга больных эссенциальной гипертензией и здоровых индивидов изучить.

1 нейрохимические системы, синтезирующие

- вазопрессин,
- вазоактивный интестинальный полипептид,
- нейротензин,
- кортикотропин-рилизинг гормон,
- оксид азота,
- нейропептид FF,
- рецептор FF1 к нейропептиду FF
- рецептор FF2 к нейропептиду FF
- норадреналин,
- ангиотензин,
- соматостатин,
- нейропептид Y,
- вещество P

2 проанализировать морфологические корреляты взаимодействия нейрохимических систем.

Научная новизна

Нами впервые проведено систематическое исследование ядер ствола мозга у больных ЭГ, умерших от острого нарушения кровообращения, и здоровых лиц, погибших от причин, не связанных с какой-либо патологией (механическая травма, гипотермия)

Выявлены различия в организации и взаимодействии важнейших нейрохимических систем ствола мозга у лиц обеих групп. Впервые в мозге человека продемонстрирована нейрохимическая система, синтезирующая прессогенный нейропептид FF, и составлен атлас структур, экспрессирующих этот пептид. Впервые изучены ядра ствола, экспрессирующие рецепторы FF1 и FF2 к нейропептиду FF и выявлены различия в экспрессии этих рецепторов у больных ЭГ и здоровых лиц.

Практическая значимость

Результаты проведенного исследования показывают изменение функционального состояния и взаимодействия основных нейрохимических систем ствола мозга у больных ЭГ, что является важным для более глубокого понимания патогенеза заболевания. Впервые продемонстрирована новая нейрохимическая система (нейропептид FF-эргическая) в стволе мозга человека, что представляется важным с общебиологической точки зрения, продемонстрирована ее связь со структурами, имеющими отношение к сердечно-сосудистой регуляции и выявлены различия в ее организации у больных ЭГ и здоровых людей. Полученные данные позволяют оценить действие современной терапии на центральные механизмы нейроэндокринной регуляции и наметить потенциальные мишени для разработки новых медикаментозных средств и способов терапевтического вмешательства.

Реализация результатов исследования

Полученные нами данные о нарушении у больных ЭГ функции супрахиазматического ядра, как основного водителя циркадных ритмов, послужили основой для углубленного изучения нарушений сна и суточного ритма терморегуляции у этих больных и разработки новых методов хронотерапии (Академический Медицинский Центр Университета, г Амстердам, Нидерланды; Госпиталь Гарвардского Университета, Бостон, США). Данные о дисфункции нейрохимических систем, синтезирующих оксид азота и нейропептид FF, в настоящее время используются для разработки новых медикаментозных средств на основе этих соединений (РКНПК МЗ РФ, Москва, Россия).

Апробация диссертации

Материалы диссертации доложены на Ученом Совете Института Экспериментальной Кардиологии МЗ РФ, 2006 (Москва, Россия), 16-ой Конференции Американского Общества по изучению гипертонии, 2006 (Сан Франциско, США), Научной Конференции Общества эндокринологов Канады, 2004 (Оттава, Канада), 34-ом Конгрессе Международного Общества Неврологов, 2004 (Сан Диего, США), 32-ом Конгрессе Международного Общества Неврологов, 2002 (Орlando, США), Российско-Американском рабочем совещании по проблеме сердечно-сосудистых нарушений при депрессивных состояниях, 2002 (Вашингтон, США), Научной конференции Общества нейроэндокринологов Нидерландов, 2000 (Амстердам, Нидерланды)

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из 198 страниц машинописного текста, содержит 46 рисунков и 6 таблиц. Список литературы включает 241 источник.

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1 При эссенциальной гипертензии изменения в экспрессии нейрохимических систем ствола мозга наиболее выражены в гипоталамусе и, в значительно меньшей степени, в продолговатом мозге. Среди гипоталамических ядер наибольшим изменениям подвержены супрахиазматическое и паравентрикулярное ядра.

2 При эссенциальной гипертензии в супрахиазматическом ядре гипоталамуса значительно снижена активность трех основных нейрональных популяций, имеющих отношение к регуляции циркадных ритмов организма – вазопрессин-, вазоактивный интестинальный полипептид- и нейротензин-эргической.

3 При эссенциальной гипертензии в паравентрикулярном гипоталамическом ядре резко повышена активность

кортикотропин-рилизинг гормон синтезирующих нейронов, дающих проекции к супрахиазматическому ядру и срединному возвышению

4 В стволе мозга человека присутствует нейрохимическая система, синтезирующая амидированный нейропептид FF. Рецепторы к нейропептиду FF (FF1 и FF2) распределены в ядрах ствола неравномерно. Так, FF1 экспрессируется, в основном, в гипоталамусе, тогда как FF2 – в продолговатом мозге

5 При эссенциальной гипертензии изменяется взаимодействие нейрохимических систем ствола мозга. Прежде всего наблюдается усиление воздействия кортикотропин-рилизинг гормон синтезирующих нейронов паравентрикулярного гипоталамического ядра на вазопрессин- и нейротензин синтезирующие нейроны супрахиазматического ядра, а также присущее только эссенциальной гипертензии воздействие нейропептид FF синтезирующих нейронов на гипоталамические нейроны, синтезирующие оксид азота

6. При эссенциальной гипертензии снижение или повышение активности нейрохимической системы той или иной модальности сопровождается параллельным изменением плотности иннервации микрососудов паренхимы мозга

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО ССЛЕДОВАНИЯ

Материал и методы

Материал для исследования получали при вскрытиях в моргах городской клинической больницы №54, больницы им. Боткина, Института судебно-медицинской экспертизы (г Москва, Россия) и Медицинского центра Королевской академии наук (Амстердам, Нидерланды). Исследование было проведено в соответствии с нормами и правилами местных комитетов по этике. Всего было изучено 22 образца ствола мозга больных ЭГ, скоропостижно (в течение 2-4 часов) скончавшихся от острого инфаркта миокарда или кровоизлияния в мозг и 22 образца ствола мозга здоровых людей, погибших внезапно от механической травмы или переохлаждения. Обе группы были строго ранжированы по полу,

возрасту и времени суток, в котором был зарегистрирован летальный исход Больные ЭГ при жизни характеризовались высоким артериальным давлением (>160/90) и при аутопсии у них была выявлена гипертрофия миокарда и увеличена толщина стенки левого желудочка Необходимо также подчеркнуть, что материал для исследования был собран в 1996-1997 гг, на пике социальной нестабильности и развала системы здравоохранения в России, спровоцировавших небывалый рост смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. Большинство больных не получало систематической медикаментозной терапии и только трое лечились современными лекарствами, включая блокаторы β -адренергических рецепторов, кальциевых каналов, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента и диуретики Никто из изученных лиц не получал антидепрессанты Анализ историй болезни, а также результаты вскрытия и патоморфологического анализа не обнаружили признаков вторичной гипертензии, неврологических или психических заболеваний у лиц обеих групп.

При вскрытии мозг извлекали, иссекали ствол, включая гипоталамус, средний и продолговатый мозг, и фиксировали в 4%-ном параформальдегиде на фосфатном буфере (0,01M, pH 7,6) при 4° C в течение 2 недель. Далее образцы погружали в 25%-ный раствор глюкозы на три дня, извлекали, замораживали в жидком изопентале и хранили при температуре -70° C Гипоталамус пересекали продольно на две симметричные половины, и левую половину резали серийно на криостате с толщиной срезов 20 мкм. Средний и продолговатый мозг резали целиком, не рассекая на симметричные половины Каждый пятый срез наносили на предметное стекло и использовали для выявления КРГиРНК методом гибридизации *in situ* Остальные серии срезов использовали для иммуногистохимического окрашивания

В работе использовали методы гибридизации *in situ*, одинарной и двойной иммуногистохимии, в случае двойной иммунофлуоресцентной метки использовали лазерный конфокальный сканирующий микроскоп, стереологические (пространственная реконструкция ядер и подсчет в них количества нейронов), количественной денситометрии, статистические (сравнение средних значений, корреляционный и линейный регрессионный анализ) Методом одинарной иммуногистохимии изучали нейрохимические системы экспрессирующие вазопрессин

(VP), вазоактивный интестинальный полипептид (VIP), нейротезин (NT), кортикотропин-рилизинг гормон (CRH), нейропептид FF (NPFF), рецептор FF1 нейропептида FF (FF1), соматостатин (SOM), нейропептид Y (NPY), вещество P (SP), тирозингидроксилазу (TH), нейроспецифическую синтазу оксида азота (nNOS), На препаратах, окрашенных методом двойной иммуногистохимии, оценивали морфологические признаки взаимодействия нейрохимических систем разной модальности. Совместно были окрашены нейрональные популяции, экспрессирующие VP и CRH (VP+CRH), VP и NPFF (VP+NPFF), nNOS и FF1 (nNOS+FF1) Все методики, включая контроль специфичности первичных антител, гибридизации *in situ*, подробно изложены в статьях (Goncharuk et al , 2001; Goncharuk et al , 2002, Goncharuk et al , 2004, Goncharuk et al , 2006; Goncharuk et al., 2007)

Микрофотографии получали при помощи микроскопа AxioPlan, снабженного цифровой видеокамерой (Zeiss, Германия) Использовали пакет компьютерных программ MRGrab (Zeiss). Регулировку яркости и контраста цифровых видеоизображений осуществляли при помощи компьютерной программы Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA)

Для идентификации структур использовали атласы продолговатого и среднего мозга (Paxinos and Huang, 1995; Koutcherov et al., 2004) и головного мозга (Sakamoto et al , 1999; Mai et al , 2003) Макроанатомическая номенклатура приведена в соответствии с атласом мозгового ствола человека и животных (Саркисов и Филимонов, 1947)

Полученные результаты

а) вазопрессин, вазоактивный интестинальный полипептид, нейротензин

В стволе мозга больных ЭГ и лиц контрольной группы вазопрессин (VP)-синтезирующие нейроны сосредоточены, в основном, в трех гипоталамических ядрах – паравентрикулярном (Pa), супраоптическом (SO) и супрахиазматическом (SCh) В Pa эти нейроны были представлены двумя популяциями – средними по величине нейронами (продольный размер примерно 15 мкм) и крупными (около 25 мкм), которые в разных пропорциях были обнаружены во всех субъядрах В SO это были, только крупные

нейроны (25 мкм и более) Количественный подсчет показал, что у больных ЭГ число VP нейронов в Pa и SO не отличается от контроля, В SCh VP нейроны были представлены мелкими нейронами, у которых размер продольной оси перикариона составлял 5-7 мкм и, в основном, они находились в дорсолатеральной области ядра. Количество нейронов в SCh у больных ЭГ было почти в два раза меньше, чем у лиц контрольной группы Нейроны, синтезирующие вазоактивный интестинальный полипептид (VIP) и нейротензин (NT) были обнаружены только в SCh Их продольный размер составлял 5-7 мкм VIP нейроны были сосредоточены в вентромедиальной области SCh, а NT синтезирующие – были равномерно распределены по всему объему SCh Количество VIP и NT нейронов в SCh гипертоников также было значительно уменьшено по сравнению с контролем

б) кортикотропин-рилизинг гормон

У здоровых лиц умеренное количество нейронов, содержащих информационную РНК, кодирующую синтез кортикотропин-рилизинг гормона (CRHmRNA), обнаружено в паравентрикулярном ядре (Pa) В основном, это были нейроны средней величины (около 15 мкм) и реже – более крупные (около 25 мкм). У больных ЭГ, такие нейроны были обнаружены в намного большем количестве, причем во всех субъядрах Pa. Более того, эти нейроны обнаруживались и в таких рядом расположенных структурах как ядро ложа терминальной полоски (BST, bed nucleus of the stria terminalis), горизонтальная ножка диагональной полоски Брока (HDB, horizontal limb of the diagonal band Broca's), компактная часть базального ядра Мейнерта (BC, basal nucleus Meynert's, compact part) и неопределенная зона (ZI, zona incerta), а также, более каудально, дорсо- и вентромедиальном гипоталамических ядрах (DMH, VMH, dorso- and ventromedial hypothalamic nuclei) и ядре воронки (inf, infundibular nucleus) Количественная денситометрия показала, что содержание CRHmRNA в Pa больных ЭГ почти вдвое превышало контрольные показатели. Иммуногистохимическое окрашивание также показало, что в контроле CRH нейроны сосредоточены в, основном, в Pa и, как правило, имеют короткие отростки В то же время у больных ЭГ многочисленные CRH волокна и нейрональные профили были обнаружены вокруг

передней спайки (ac, anterior commissure), особенно в районе центрального отдела ядра ложа терминальной полоски (BSTC, bed nucleus of the stria terminalis, central division) и дорсального субъядра паравентрикулярного гипоталамического ядра (PaD, paraventricular hypothalamic nucleus, dorsal subnucleus) В меньшей степени они наблюдались в вентральном отделе ядра ложа терминальной полоски (BSTV, bed nucleus of the stria terminalis, ventral division), компактной части базального ядра Мейнерта (BC), мелкоклеточном подъядре паравентрикулярного гипоталамического ядра (PaP, paraventricular hypothalamic nucleus, parvocellular subnucleus) и переднем миндалевидном поле (AAA, anterior amygdaloid area) Кроме того, CRH нейроны рострального полюса Pa посылали плотный пучок волокон к срединному возвышению (me, median eminence), и нами впервые было обнаружено, что эти волокна пересекают каудальный полюс Sch. У больных ЭГ, площадь этого пучка в пределах Sch почти втрое превышала контрольные показатели При помощи двойного иммуногистохимического окрашивания удалось показать, что проходящие CRH волокна перекрывают тела VP нейронов, образуя по ходу варикозности, напоминающие транзиторные синапсы Статистический анализ показал обратную корреляцию числа VP нейронов и площади CRH пучка в Sch У больных ЭГ, CRH нейроны, локализованные в наиболее каудальных отделах Pa, посылали намного более мощные по сравнению с контролем, вентральные проекции к срединному возвышению и, кроме того, часть из них дорзально огибала свод (fx, fornix) и проникала в неопределенную зону

В продолговатом мозге как у больных ЭГ, так и у лиц контрольной группы были обнаружены редкие CRH иммунореактивные нейрональные профили и волокна в таких центрах сердечно-сосудистой регуляции как ядро одиночного пути (Sol), ростральный полюс вентролатерального отдела продолговатого мозга (RVLM, rostral ventrolateral medulla), медиальное и латеральное окологорничные ядра (MPB and LPB, medial and lateral parabrachial nuclei) и голубоватое место (LC, locus coeruleus) Отмечалась индивидуальная вариабельность в плотности распределения CRH-иммунореактивных нейрональных профилей и волокон, однако явных различий между обеими группами выявлено не было

в) оксид азота

У здоровых людей нейроны, содержащие нейроспецифическую синтазу оксида азота (nNOS, neurospecific nitric oxide synthase), находились практически во всех гипоталамических ядрах, среднем и продолговатом мозге. Количество нитрергических нейронов в разных ядрах заметно отличалось, однако, следует отметить, что наибольшее их число было обнаружено в ядрах, имеющих отношение к сердечно-сосудистой регуляции. По своим морфологическим характеристикам (величина, форма перикариона, длина отростков и характер их ветвления) эти нейроны не отличались от нейронов других модальностей, характерных для данного ядра. Нитрергические нейроны с короткими ветвящимися отростками часто образовывали синаптоподобные структуры на рядом расположенных нитрергических нейронах или неокрашенных нервных клетках, что характеризовало их как интернейроны, функционирующие в пределах данного ядра. В то же время нейроны с длинными отростками, как правило, посылали свои проекции к другим ядрам, что предполагает их важную роль в обеспечении взаимодействия ядер. Во всех ядрах мы наблюдали нитрергические нервные волокна, проникающие глубоко в стенку паренхимальных микрососудов. Следует отметить, что наибольшая плотность нитрергической иннервации микроциркуляторного русла была обнаружена в ядре одиночного пути.

У больных ЭГ мы обнаружили резкое снижение количества нитрергических нейронов в гипоталамических ядрах, особенно паравентрикулярном. Необходимо отметить, что наиболее выраженными эти изменения были у лиц, страдавших помимо эссенциальной гипертензии, также диабетом и ожирением. В ядрах среднего и продолговатого мозга изменения были выражены в значительно меньшей степени, отличались большей индивидуальной вариабельностью и не так очевидно коррелировали с тяжестью заболевания.

г) нейропептид FF

В стволе мозга человека впервые изучена нейрохимическая система, синтезирующая амидированный нейропептид FF,

обладающий широким спектром физиологического действия, включая прессорный эффект.

Нейроны, синтезирующие нейропептид FF, мы наблюдали во многих ядрах гипоталамуса, расположенных вдоль rostroкаудальной оси от перекреста зрительных нервов до уровня таламических ядер. Количество этих нейронов в разных ядрах варьировало, однако следует заметить, что ядра, прилегающие к стенке третьего мозгового желудочка, а также локализованные вентолатерально по отношению к передней спайке, содержали наибольшее их количество. По своим морфологическим характеристикам они соответствовали нейронам типичным для каждого ядра. Среди них встречались как интернейроны, обладающие короткими отростками, формирующими синапсы на соседних нейронах, так и нейроны дистального действия, посылающие свои аксоны за пределы ядра. Двойное иммуноцитохимическое окрашивание показало, что нейропептид FF синтезирующие нейроны могут образовывать синаптоподобные структуры на VP-эргических нейронах. В продолговатом мозге, эти нейроны в наибольшем количестве были обнаружены в дорсальном моторном ядре вагуса. Довольно плотное сплетение нейропептид FF иммунореактивных волокон было обнаружено в области A1/C1 катехоламинергических нейронов продолговатого мозга. Двойное иммуноцитохимическое окрашивание показало, что эти волокна образуют синаптоподобные структуры на нейронах, содержащих тирозингидроксилазу – ключевой фермент синтеза катехоламинов.

Нейроны, экспрессирующие рецептор FF1 к нейропептиду FF, широко представлены в гипоталамусе. Наибольшее их количество находится в ядре ложа терминальной полоски и неопределенной зоне. В меньшей степени они представлены в перифорникальном ядре, ядре воронки, латеральном серобугорном ядре (LTu, lateral tuberal nucleus), серобугорно-сосцевидном ядре (TM, tuberomammillary nucleus), компактном отделе базального ядра Мейнерта, переднем миндалевидном поле и, еще в меньшей степени - в паравентрикулярном, супрахиазматическом, дорсо- и вентромедиальном ядрах. Плотные сплетения нервных волокон, несущих рецептор FF1, встречаются в наиболее ростральных отделах гипоталамуса на уровне передней спайки и центрального отдела ядра ложа терминальной полоски, перифорникальном ядре,

ядре воронки, вентромедиальном ядре и медиальном пучке конечного мозга (mfb, medial forebrain bundle) В продолговатом мозге нейроны, экспрессирующие рецептор FF1, встречаются в дорзальном комплексе ядер вагуса и области A1/C1

Двойное иммуноцитохимическое окрашивание позволило выявить существенные различия в экспрессии рецептора FF1 у больных ЭГ и здоровых лиц. Оказалось, что у гипертоников, в отличие от контроля, этот рецептор экспрессируется в нитрергических нейронах почти всех гипоталамических ядер, включая паравентрикулярное, дорсо- и вентромедиальное ядра, базальное ядро Мейнерта и ядро ложа терминальной полоски

д) нейропептид Y, ангиотензин, соматостатин, вещество P

Значительное число нейропептид Y (NPY) -синтезирующих нейронов обнаруживалось только в ядре воронки как у больных ЭГ, так и у здоровых лиц. Одиночные NPY нейроны наблюдались в вентромедиальном и паравентрикулярном гипоталамических ядрах. NPY иммунореактивные волокна также преимущественно наблюдались в ядре воронки и прилежащих структурах. В целом, заметных различий в экспрессии NPY в стволе мозга больных ЭГ и здоровых лиц выявлено не было. Ангиотензин-, соматостатин- и вещество P- синтезирующие нейроны в небольшом количестве встречались в различных ядрах ствола мозга у лиц обеих групп. Различий в плотности или ходе волокон также не наблюдалось

Заключение

а) вазопрессин (VP), вазоактивный интестинальный полипептид (VIP), нейротензин (NT)

В SCh больных ЭГ было обнаружено почти двукратное снижение количества нейронов трех основных функционально различных групп –VP-, VIP- и NT-синтезирующих. Известно, что в SCh, число нейронов, экспрессирующих VP, изменяется ритмически в течение суток, достигая пика в утренние часы (Swaab, 2003). Кроме того, показано, что VP нейроны SCh оказывают тормозный эффект на CRH-синтезирующие нейроны Pa, посылающие аксоны к аденогипофизу (Swaab, 2003). Таким

образом, уменьшенное количество VP нейронов в SCh у больных ЭГ, с одной стороны, отражает дисфункцию эндогенного молекулярного пейсмекера, находящегося, как известно, в этом ядре и генерирующего суточный ритм, а с другой стороны, свидетельствует о снижении тормозного эффекта на гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось. Известно, что VIP синтезирующие нейроны SCh являются мишенью для аксонов ганглиозных клеток сетчатки, а NT синтезирующие нейроны – получают проекции от нейронов латерального коленчатого тела. Показано, что обе эти группы нейронов участвуют в синхронизации ритма эндогенного пейсмекера с поступающей от зрительного анализатора информацией о суточном изменении освещенности окружающей среды (Swaab, 2003). Снижение количества нейронов, экспрессирующих VIP и NT в SCh больных ЭГ, может свидетельствовать о нарушении этой синхронизации. Таким образом, обнаруженные нами изменения в SCh больных ЭГ могут объяснить хорошо известное у них нарушение суточных ритмов (Tuck et al, 1985; Dyer et al., 1987; O'Brien et al, 1988; Pickering, 1990, Portaluppi et al, 1990, Verdecchia et al., 1990, Coca, 1994, Munakata et al, 1994; Karlo et al, 1996).

б) кортикотропин-релизинг гормон (CRH)

У больных ЭГ практически во всех субъядрах Pa наблюдалось значительное (более чем в два раза) повышение количества CRH-синтезирующих нейронов и почти трехкратное увеличение содержания информационной РНК, кодирующей синтез CRH (CRHmRNA). Повышенное количество нейронов, синтезирующих в Pa этот гормон, может лежать в основе характерного для таких больных усиленного выброса кортизола и аномального повышения симпатической активности в ответ на действие стрессогенного стимула. Была отмечена обратно-пропорциональная зависимость между площадью, занимаемой аксонами этих нейронов в SCh, и количеством нейронов SCh. Можно предположить, что у больных ЭГ, многочисленные CRH синтезирующие нейроны, находящиеся в Pa и посылающие аксоны в SCh, могут, действуя через синапсы, вызвать патологическое изменение активности нейронов SCh, приводя к его дисфункции в качестве основного генератора циркадных ритмов.

в) оксид азота

Обнаружено, что у здоровых лиц нитрергические нейроны особенно широко представлены в ядрах ствола мозга, имеющих отношение к сердечно-сосудистой регуляции У больных ЭГ количество этих нейронов было заметно снижено, особенно в Pa Известно, что оксид азота представляет собой объемный газообразный нейротрансмиттер и выполняет в Pa, в основном, тормозную функцию В экспериментах на животных показано, что введение в Pa блокаторов нейронального синтеза оксида азота сопровождается резким усилением активности CRH синтезирующих нейронов с последующей активацией симпатических нервов (Zhang and Patel, 1998, Patel et al., 2001, Zheng et al., 2006) С учетом этих данных можно считать, что в обнаруженное нами в Pa больных ЭГ снижение активности нитрергических нейронов также способствует растормаживанию и активации CRH синтезирующих нейронов

г) нейропептид FF

Нейроны, синтезирующие нейропептид FF, довольно широко представлены в ядрах гипоталамуса и продолговатого мозга, имеющих отношение к сердечно-сосудистой регуляции Нами установлено, что эти нейроны могут образовывать синаптические контакты на катехоламинергических нейронах области A1/C1, Почти во всех ядрах гипоталамуса, а также в ядре одиночного пути и дорсальном моторном ядре вагуса мы обнаружили нейроны, содержащие рецепторы к этому нейропептиду Характерно, что рецептор FF1, в основном, экспрессируется в гипоталамусе, тогда как FF2 – в ядре одиночного тракта и дорсальном моторном ядре вагуса. Заслуживает внимания факт, что у больных ЭГ рецептор FF1 экспрессируется многочисленными нитрергическими нейронами почти всех гипоталамических ядер, тогда как у здоровых лиц подобной экспрессии практически не наблюдается Экспериментально установлено, что нейропептид FF обладает прессорным эффектом при введении в желудочки мозга Можно предполагать, что воздействие на нитрергическую систему гипоталамуса опосредует этот эффект

д) нейропептид Y, ангиотензин, соматостатин, вещество P

У больных ЭГ не отмечено явных признаков изменения функции этих пептидергических систем. Нейропептид Y был обнаружен нами только в ядре воронки. Экспериментальные исследования показывают, что эти нейроны в основном, вовлечены в регуляцию пищевого поведения и, возможно, поэтому мы не обнаружили изменения их активности у больных ЭГ. Как у больных ЭГ, так и у здоровых лиц, соматостатин и вещество P синтезирующие нейроны в весьма незначительном количестве встречались в Pa и некоторых других ядрах, прилегающих к стенке третьего желудочка. Возможно эти нейрохимические системы в значительно меньшей степени вовлечены в регуляцию артериального давления, либо изменения в них лежат за пределами разрешающих возможностей использованных методик.

ВЫВОДЫ

1 При изучении методами количественной иммуногистохимии впервые установлено, что при эссенциальной гипертензии значительно снижено количество вазопрессин-, вазоактивный интестинальный полипептид- и нейротензин-синтезирующих нейронов в супрахиазматическом (надперекрестном) ядре гипоталамуса. Активность вазопрессин - синтезирующих нейронов в паравентрикулярном и супраоптическом ядрах гипоталамуса не отличается от таковой у здоровых людей.

2 У больных эссенциальной гипертензией значительно повышена активность кортикотропин-рилизинг гормон-синтезирующей нейрональной системы в паравентрикулярном ядре гипоталамуса и, в меньшей степени, во всех остальных гипоталамических ядрах и дорсальном комплексе ядер миндалины.

3. Выявлено, что у больных эссенциальной гипертензией объем пучка кортикотропин-рилизинг гормон иммунореактивных волокон, проникающего в супрахиазматическое ядро со стороны паравентрикулярного ядра, значительно превышает таковой у здоровых людей.

4 У больных эссенциальной гипертензией методом количественной иммуногистохимии обнаружено резкое снижение активности нитергической системы гипоталамуса.

5. В мозге человека впервые иммуногистохимическим методом обнаружена нейрональная система, синтезирующая нейропептид FF. Нейроны, экспрессирующие нейропептид FF, наиболее многочисленны в ядрах гипоталамуса и дорсальном моторном ядре вагуса

6. В стволе мозга человека впервые описаны нейроны, экспрессирующие рецепторы FF1 и FF2 к нейропептиду FF

7. У больных эссенциальной гипертензией нитреергические нейроны большинства ядер гипоталамуса и дорсального комплекса ядер миндалины экспрессируют рецептор FF1 к нейропептиду FF

8. У больных эссенциальной гипертензией более выражена относительно контроля иннервация микрососудов гипоталамуса нейропептид FF-синтезирующими нейронами и экспрессия рецептора FF1 в сосудистой стенке

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Goncharuk VD.** 1994 Changes in ganglion nodosum neurons associated with stress-related cardiac deficiency Exp Toxicol Pathol 46 457-464.

2. **Goncharuk VD, Buijs RM** 1999 Изменения в супрахиазматическом и паравентрикулярном ядрах гипоталамуса у людей при эссенциальной гипертензии Архив патологии 61.7-10

3. Romijn HJ, van Uum JF, Emmering J, **Goncharuk V, Buijs RM.** 1999. Colocalization of VIP with AVP in neurons of human paraventricular, supraoptic and suprachiasmatic nucleus Brain Res 832 47-53

4. **Гончарук ВД, Баяс РМ** 2000 Функциональный и морфологический статус супрахиазматического ядра гипоталамуса у людей при эссенциальной гипертензии Кардиология 4 18-24

5. **Goncharuk VD, van Heerikhuizen JJ, Dai JP, Swaab DF, Buijs RM** 2001 Neuropeptide changes in the suprachiasmatic nucleus in primary hypertension indicate functional impairment of the biological clock J Comp Neurol 431:320-330

6. **Goncharuk VD, van Heerikhuizen JJ, Swaab DF, Buijs RM.** 2002a Paraventricular nucleus of the human hypothalamus in primary

hypertension Activation of corticotropin-releasing hormone neurons. *J Comp Neurol* 443 321-331

7. Jhamandas JH, **Goncharuk VD**, Buijs RM. 2002b Distribution of neuropeptide FF (NPFF) in the human brain relationship to tyrosine hydroxylase (TH) and vasopressin (VP) neurons Program No 827.7.2002 Abstract Viewer/tinary Planner Washington, DC Society for Neuroscience

8. Чазов ЕИ, Дугин СФ, **Гончарук ВД**. 2002с Гипоталамическая регуляция кровообращения в норме и при сердечно-сосудистых заболеваниях Сборник трудов научной сессии “Фундаментальные исследования и прогресс кардиологии” РКНПК РФ 4-5 июля 2002 г – Москва 2002 С. 10-13

9. Buijs RM, Van Eden CG, **Goncharuk VD**, Kalsbeek A. 2003 The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *J Endocrinol* 177 17-26.

10. **Goncharuk VD**, Zeng Z, Wang R, MacTavish D, Jhamandas JH 2004a Distribution of the neuropeptide FF1 receptor (FF1) in the human hypothalamus and surrounding forebrain structures immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 474:487-503.

11. **Gonharuk V**, Jhamandas JH 2004b. Distribution of neuropeptide FF2 receptor in the human forebrain and medulla/ Program No47.14.2004. Abstract Viewer/tinary Planner/ Washington, DC Society for Neuro-science

12. **Goncharuk VD**, Buijs RM, MacTavish D, Jhamandas JH 2006 Neuropeptide FF (NPFF) distribution in the human and rat forebrain. a comparative immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 496:572-593

13 Buijs RM, Scheer F, Kreier F, Yi C, Bos N, **Goncharuk VD**, Kalsbeek A 2006 Organization of circadian functions- interaction with the body. *Prog Brain Res* 153 341-361.

14 Чазов ЕИ, Лакомкин ВЛ, **Гончарук ВД**, Сидорова МВ, Мох ВП, Мартемьянов ВМ, Кузьмин АВ, Беспалова ЖД, Сергиенко ВБ, Масенко ВП, Капелько ВИ 2007 Влияние нейропептида FF на систему кровообращения у бодрствующих крыс. Кардиологический вестник 13:10-14

15. **Goncharuk VD**, Buijs RM, Swaab DF. 2007 Corticotropin-releasing hormone neurons in hypertensive patients are activated in the hypothalamus but not in the brainstem *J Comp Neurol* 503 148-168

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

A1/C1	noradrenaline cells and/or adrenaline cells A1/C1 норадренергические клетки и/или адренергические клетки A1/C1
AAA	anterior amygdaloid area переднее миндалевидное поле
ac	anterior commissure передняя сляка
BC	basal nucleus (Meynert's), compact part базальное ядро (Мейнерта), компактная часть
BSTC	bed nucleus of the stria terminalis, central division ядро ложа терминальной полоски, центральный отдел
BSTV	bed nucleus of the stria terminalis, ventral division ядро ложа терминальной полоски, вентральный отдел
CRH	corticotrophin-releasing hormone кортикотропин-рилизинг гормон
DMH	dorsomedial hypothalamic nucleus дорсомедиальное гипоталамическое ядро
FF1	neuropeptide FF1 receptor рецептор FF1 нейропептида FF
FF2	neuropeptide FF2 receptor рецептор FF2 нейропептида FF
fx	foxiix свод
HDB	nucleus of the diagonal band (Broca's), horizontal limb ядро диагональной полоски (Брока), горизонтальная ножка
inf	infundibular nucleus ядро воронки
LC	locus coeruleus голубоватое место
LPB	lateral parabrachial nucleus латеральное околоручковое ядро
LTu	lateral tuberal nucleus латеральное серобугорное ядро
me	median eminence среднее возвышение
mfb	medial forebrain bundle медиальный пучок конечного мозга
MPB	medial parabrachial nucleus медиальное околоручковое ядро
	медиальное ретикулярное ядро продолговатого мозга
NT	neurotensin нейротензин
Pa	paraventricular hypothalamic nucleus паравентрикулярное гипоталамическое ядро
PaD	paraventricular hypothalamic nucleus, dorsal subnucleus паравентрикулярное гипоталамическое ядро, дорсальное подъядро
PaM	hypothalamic paraventricular nucleus, magnocellular subnucleus паравентрикулярное ядро гипоталамуса, крупноклеточное подъядро
PaP	hypothalamic paraventricular nucleus, parvocellular subnucleus

PeF	паравентрикулярное ядро гипоталамуса, мелкоклеточное подъядро perifornical nucleus
SCh	перифорникальное ядро suprachiasmatic nucleus
SO	надперекрестное (супрахиазматическое) ядро supraoptic nucleus
Sol	супраоптическое ядро solitary nucleus
TM	ядро одиночного пути tuberomammillary nucleus
VP	серобугорно-сосцевидное ядро vasopressin
VIP	вазопрессин vasoactive intestinal polypeptide
VMH	вазоактивный интестинальный полипептид ventromedial hypothalamic nucleus
ZI	вентромедиальное гипоталамическое ядро zona incerta
	неопределенная зона

Отпечатано в ООО «Компания Спутник+»

ПД № 1-00007 от 25 09 2000 г.

Подписано в печать 17 01 08

Тираж 70 экз Усл. п.л 1,5

Печать авторефератов (495) 730-47-74, 778-45-60