

**В. В. Коновалов, И. В. Филиппов, П. М. Маслюков, А. И. Емануйлов,
М. Б. Корзина, Л. В. Мадалиева**

Возрастные изменения нейропептид у-ергической передачи в автономной нервной системе

Целью настоящей работы явилось определение нейропептид Y (НПУ)-позитивных нейронов симпатических и интрамуральных узлов, а также рецепторов к нейропептиду Y типов Y1 и Y2 в интрамуральных узлах, миокарде, кишке. Нейроны симпатических и интрамуральных ганглиев к моменту рождения содержат НПУ. В процессе возрастного развития происходит увеличение доли НПУ – содержащих нейронов.

Ключевые слова: нейропептид Y, онтогенез, рецепторы, автономная нервная система, симпатические узлы, интрамуральные узлы.

**V. V. Konovalov, I. V. Filippov, P. M. Maslukov, A. I. Emanuilov,
M. B. Korzina, L. V. Madalieva**

Age Changes of Neuropeptide Y-Ergetic Transfer in the Autonomous Nervous System

The aim of the current study was to determine neuropeptide Y-positive neurons of the sympathetic and intramural ganglia as well as Y1 and Y2 receptors for NPY in the intramural ganglia, myocardium, intestine. Sympathetic and intramural ganglionic neurons have NPY from the moment of birth. The percentage of NPY-positive neurons increases during the development.

Keywords: neuropeptide Y, ontogenesis, receptors, the autonomic nervous system, sympathetic ganglia, intramural ganglia.

Нейропептид Y (НПУ) весьма распространен в автономной нервной системе. Примерно две трети нейронов симпатических узлов у млекопитающих помимо норадреналина содержит этот пептид. Данный пептид в большом количестве обнаруживается в волокнах, иннервирующих сердце, коронарные и мозговые артерии, аорту, сосуды кожи и скелетных мышц у крысы, кошки, морской свинки, человека. НПУ широко распространен в желудочно-кишечном тракте, выявляется в волокнах, направляющихся к слизистой и мышечной оболочке, а также гладким мышцам сосудов [3, 11].

В настоящий момент идентифицировано шесть типов рецепторов к нейропептиду Y (Y1-Y6) [6, 9, 10]. Наиболее изученными являются рецепторы Y1 и Y2 типов. Рецепторы Y1, как правило, расположены постсинаптически. Пресинаптические эффекты нейропептида Y осуществляются главным образом за счет рецепторов типа Y2 (тем не менее, встречаются и постсинаптические Y2 рецепторы, например в миокарде). Y2 рецепторы идентифицированы в симпатической, парасимпатической и метасимпатической нервной системе [4].

Тем не менее, возрастные аспекты синаптической передачи в автономной нервной системе

с участием нейропептида Y остаются неясными, в том числе и степень экспрессии различных типов рецепторов к НПУ в постнатальном онтогенезе. Целью настоящей работы явилось определение НПУ-позитивных нейронов симпатических и интрамуральных узлов, а также рецепторов к нейропептиду Y типов Y1 и Y2 в интрамуральных узлах, миокарде, кишке при помощи иммуногистохимических методов.

Материал и методы

Работа выполнена на новорожденных, 10-, 20-, 30-, 60-, 180-суточных крысах (по 5 в каждой возрастной группе). После введения летальной дозы пентобарбитала натрия (Nembutal®, 300 мг/кг, внутривенно), животных перфузировали транскардиально физиологическим раствором с гепарином, а затем фиксирующей смесью 4 % параформальдегида на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4). После перфузии симпатические узлы, правое и левое предсердие, участок тонкой кишки длиной 0,5 см извлекались и помещались в ту же фиксирующую смесь, в которой производили перфузию, на 1–2 часа. Серии срезов толщиной 12 мкм изготавливали на криостате.

С целью выявления НPY, а также рецепторов к НPY типов Y1 и Y2 применялось двойное мечение соответствующими антителами фирмы Abscam. Срезы преинкубировались в течение 30 мин при комнатной температуре в PBS с добавлением 10 % сыворотки, 1 % тритон X-100, 0,1 % бычьего сывороточного альбумина. Затем срезы инкубировались с первичными антителами в течение 24 ч при комнатной температуре. После кратковременной промывки в PBS срезы инкубировались с вторичными антителами, конъюгированными с флюорохромом FITS (Jackson) 2 ч (разведение 1:100).

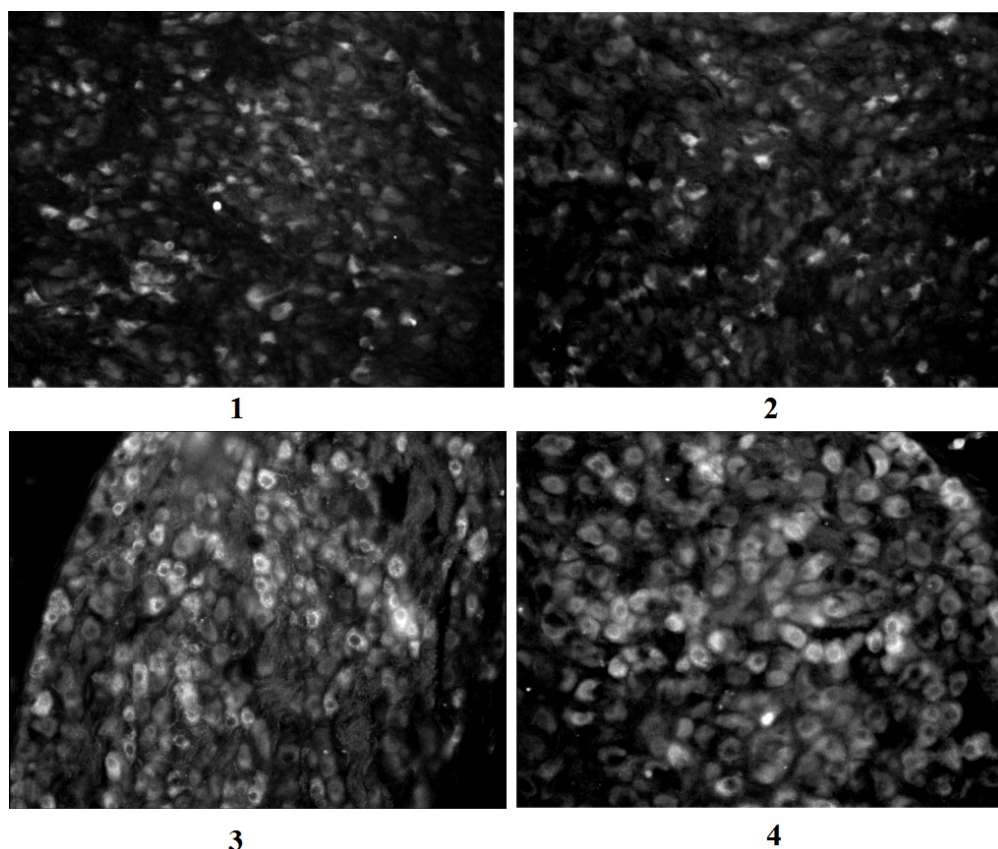
Дальнейший анализ препаратов проводился при помощи флуоресцентного микроскопа Olympus BX45, снабженного соответствующим набором светофильтров и CCD камеры. Анализ изображений осуществлялся с использованием компьютерных программ.

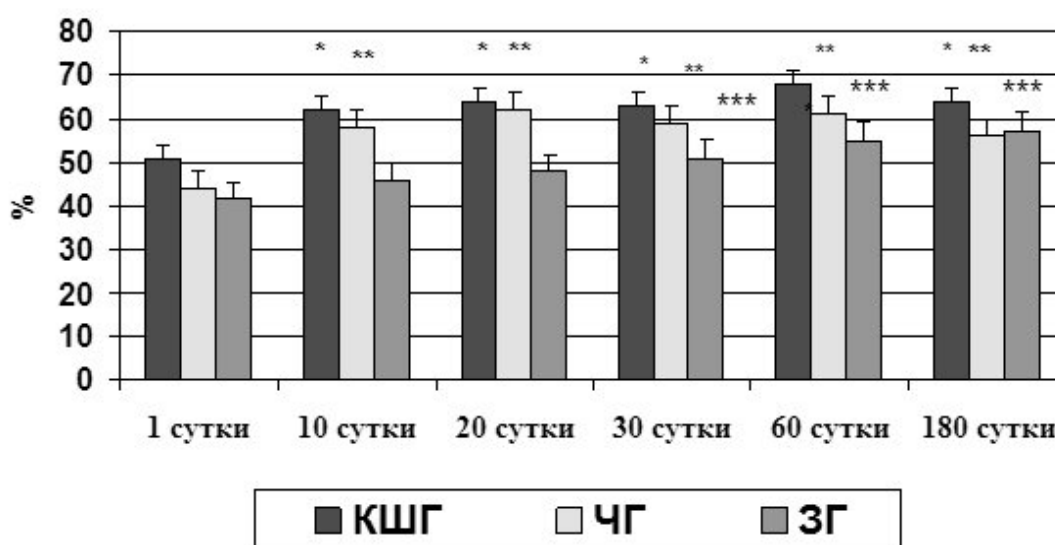
Статистическая обработка включала определение средней арифметической, ошибки средней. Достоверность различий определялась согласно t-критерию Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Результаты исследования показали, что НPY выявлялся в интрамуральных узлах внутренних органов (сердце, тонкая кишка), а также в исследованных симпатических узлах уже с момента рождения и на протяжении остальных изучаемых возрастных периодов. При анализе распределения нейронов, иммунореактивных к различным маркерам установлено, что достоверных различий по особенностям распределения и морфометрическим характеристикам клеток с правой и левой стороны в симпатических узлах не было. В пределах симпатических ганглиев нейроны различных популяций располагались диффузно.

Доля нейронов в краниальном шейном симпатическом узле (КШГ) и чревных узлах (ЧГ), содержащих нейропептид Y, возрастала между моментом рождения и 10 сутками жизни, в звездчатом узле (ЗГ) – между 10 и 30 сутками жизни. В КШГ нейропептид Y содержал достоверно больший процент нейронов по сравнению с ЧГ (рис. 1, 2).





Средняя площадь сечения НПУ-содержащих нейронов увеличивалась в процессе возрастного развития. В исследованных симпатических узлах НПУ-позитивные нейроны имели меньшую среднюю площадь сечения по сравнению с НПУ-негативными клетками.

С момента рождения в интрамуральных ганглиях в правом и левом предсердии выявлялся небольшой процент НПУ-иммунопозитивных нейронов (табл. 1). В дальнейшем, в ходе онто-

генеза их процент существенно возрастал. Начиная с первого месяца жизни, свыше 90 % нейронов интрамуральных узлов сердца оказывались НПУ-иммунопозитивными. В интрамуральных узлах тонкой кишки НПУ-иммунопозитивные нейроны обнаруживались у животных всех исследованных возрастных групп. В процессе возрастного развития их процент также заметно возрастал.

Таблица 1. Процент (n= 5 в каждой возрастной группе) и средние значения площади сечения (мкм²) НПУ – иммунопозитивных нейронов в интрамуральных узлах сердца и желудка крыс разных возрастов

Возраст животного	Сердце		Тонкая кишка	
	Процент иммунопозитивных нейронов	Площадь поперечного сечения нейронов	Процент иммунопозитивных нейронов	Площадь поперечного сечения нейронов
новорожденные	21,6±4,20	138±14,2	28,6±2,16	178±14,2
10-дневные	79,4±2,40	212±14,6	38,5±2,18	218±11,5
20-дневные	82,5±4,10	301±16,1	52,1±3,31	265±23,1
1-месячные	89,2±3,57	344±19,8	66,6±4,41	328±18,4
2-месячные	88,8±3,58	406±18,5	69,7±4,85	457±18,8
6-месячные	94,6±0,24	518±19,1	66,8±3,62	544±21,8

Рецепторы к НПУ типов Y1 и Y2 обнаруживались в сердце в коронарных артериях, артериолах и кардиомиоцитах, в кишке в гладкомышечных клетках. Не было выявлено достоверных различий по плотности рецепторов между различными возрастными группами, а также между рецепторами обоих типов.

Обсуждение результатов

Результаты проведенного исследования сви-

детельствуют о том, что нейроны симпатических и интрамуральных метасимпатических ганглиев к моменту рождения содержат нейропептид Y. В большинстве узлов у грызунов в процессе возрастного развития происходит увеличение доли нейропептид Y-содержащих нейронов [1, 2, 7]. Этот процесс в различных ганглиях протекает гетерохронно. Наибольшее увеличение отмечается в интрамуральных ганглиях сердца, мини-

мальное – в интрамуральных метасимпатических ганглиях желудка. В симпатических узлах наибольший процент нейропептид Y – содержащих нейронов отмечался в чревных ганглиях.

Таким образом, нейропептид Y является достаточно распространенным нейропептидом в различных отделах автономной нервной системы, включая симпатический, парасимпатический и метасимпатический. Действие нейропептида Y реализуется через различные типы рецепторов (Y₁-Y₆), которые расположены постсинаптически и пресинаптически. Кроме влияния на тонус сосудов, деятельность сердца, секреторную и моторную функцию желудочно-кишечного тракта [4, 6, 8, 10], нейропептид Y оказывает трофические эффекты, в частности способствует нейро-

генезу, ангиогенезу, гипертрофии миокарда [5, 12]. Наряду с этим, нейропептид Y играет важную роль в процессах возрастного развития нейронов автономной нервной системы. Тем не менее, в вопросах, физиологии нейропептид Y еще остаются неясности, в частности касающиеся нейрофармакологии отдельных типов рецепторов, механизмах регуляции выделения нейропептида Y антагонистическими отделами автономной нервной системы, а также роли нейропептида Y в механизмах возрастного развития нейронов. Детальное исследование нейропептид Y-ергической системы позволит существенно расширить наши представления о нейропептидной системе регуляции физиологических функций.

Библиографический список

1. Маслюков, П. М. Иммуноцитохимическая характеристика нейронов звездчатого узла симпатического ствола мыши в постнатальном онтогенезе / [Текст] П. М. Маслюков, В. В. Шилкин, Ж.-П. Тиммерманс // Морфология. – 2005. – Т. 128. – №5. – С. 41–44.
2. Маслюков, П. М. Нейромедиаторный состав нейронов краниального шейного и чревного симпатических узлов в постнатальном онтогенезе / [Текст] П. М. Маслюков, М. Б. Корзина, А. И. Емануйлов, В. В. Шилкин // Морфология. – 2009. – Т. 135. – № 1. – С. 30–34.
3. Ноздрачев, А. Д., Маслюков, П. М. Нейропептид Y и автономная нервная система. / [Текст] А. Д. Ноздрачев, П. М. Маслюков // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2011. Т. 47, № 2, С. 105-112.
4. Balasubramaniam A. Neuropeptide Y family of hormones: receptor subtypes and antagonists / A. Balasubramaniam // Peptides. – 1997. - V. 18. – P. 445–457.
5. Hansel D. E. Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor / D. E. Hansel, B. A. Eipper, G. V. Ronnett // Nature. – 2001. – V. 410. – P. 940–944.
6. Hodges G. J. Neuropeptide Y and neurovascular control in skeletal muscle and skin / G. J. Hodges, D. N. Jackson, L. Mattar, J. M. Johnson, J. K. Shoemaker // Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. – 2009. – V. 297. – P. 546–555.
7. Masliukov P. M. Development of neuropeptide Y-containing neurons in sympathetic ganglia of rats / P.M.

Masliukov, V. V. Kononov, A. I. Emanuilov, A. D. Nozdrachev // Neuropeptides. – 2012. – V. 46. – N 6. – P. 345–352.

8. McDermott B. J. Cardiovascular effects of neuropeptide Y: receptor interactions and cellular mechanisms / B. J. McDermott, B. C. Millar, H. M. Piper // Cardiovasc. Res. – 1993. – V. 27. – P. 893–905.

9. Michel M. C. XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors / M. C. Michel, A. Beck-Sickinger, H. Cox, H. N. Doods, H. Herzog, D. Larhammar, Quirion R., Schwartz T., Westfall T. // Pharmacol. Rev. – 1998. – V. 50. – P. 143–150.

10. Protas L. Neuropeptide y: neurotransmitter or trophic factor in the heart? / L. Protas, J. Qu, R. B. Robinson // News Physiol. Sci. – 2003. – V. 18. – P. 181–185.

11. Richardson R. J. Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart / R. J. Richardson, I. Grkovic, C. R. Anderson // Cell Tissue Res. – 2003. – V. 314. – P. 337–350.

12. Zukowska-Grojec Z. Neuropeptide Y: a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium / Z. Zukowska-Grojec, E. Karwatowska-Prokopczuk, W. Rose, J. Rone, S. Movafagh, H. Ji, Y. Yeh, W. T. Chen, H. K. Kleinman, E. Grouzmann, D. S. Grant // Circ. Res. – 1998. – V. 83. – P. 187–195.

Bibliografickij spisok

1. Masljukov, P. M. Immunocitohimicheskaja harakteristika nejronov zvezdchatogo uzla simpaticeskogo stvola myshi v postnatal'nom ontogeneze / [Tekst] P. M. Masljukov, V. V. Shilkin, Zh.-P. Timmermans // Morfologija. – 2005. – Т. 128. – №5. – С. 41–44.
2. Masljukov, P. M. Nejromediatornyj sostav nejronov kranial'nogo shejnogo i chrevnogo simpaticeskix uzlov v postnatal'nom ontogeneze / [Tekst] P. M. Masljukov,

M. B. Korzina, A. I. Emanujlov, V. V. Shilkin // Morfologija. – 2009. – Т. 135. – № 1. – С. 30–34.

3. Nozdrachev, A. D., Masljukov, P. M. Neuropeptid Y i avtonomnaja nervnaja sistema. / [Tekst] A. D. Nozdrachev, P. M. Masljukov // Zhurnal jevoljucionnoj biokhimii i fiziologii. 2011. Т. 47, № 2, С. 105-112.

4. Balasubramaniam A. Neuropeptide Y family of hormones: receptor subtypes and antagonists / A. Balasubramaniam // *Peptides*. – 1997. – V. 18. – P. 445–457.
5. Hansel D. E. Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor / D. E. Hansel, B. A. Eipper, G. V. Ronnett // *Nature*. – 2001. – V. 410. – P. 940–944.
6. Hodges G. J. Neuropeptide Y and neurovascular control in skeletal muscle and skin / G. J. Hodges, D. N. Jackson, L. Mattar, J. M. Johnson, J. K. Shoemaker // *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* – 2009. – V. 297. – P. 546–555.
7. Masliukov P. M. Development of neuropeptide Y-containing neurons in sympathetic ganglia of rats / P. M. Masliukov, V. V. Konovalov, A. I. Emanuilov, A. D. Nozdrachev // *Neuropeptides*. – 2012. – V. 46. – N 6. – P. 345–352.
8. McDermott B. J. Cardiovascular effects of neuropeptide Y: receptor interactions and cellular mechanisms / B. J. McDermott, B. C. Millar, H. M. Piper // *Cardiovasc. Res.* – 1993. – V. 27. – P. 893–905.
9. Michel M. C. XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors / M. C. Michel, A. Beck-Sickinger, H. Cox, H. N. Doods, H. Herzog, D. Larhammar, Quirion R., Schwartz T., Westfall T. // *Pharmacol. Rev.* – 1998. – V. 50. – P. 143–150.
10. Protas L. Neuropeptide y: neurotransmitter or trophic factor in the heart? / L. Protas, J. Qu, R. B. Robinson // *News Physiol. Sci.* – 2003. – V. 18. – P. 181–185.
11. Richardson R. J. Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart / R. J. Richardson, I. Grkovic, C. R. Anderson // *Cell Tissue Res.* – 2003. – V. 314. – P. 337–350.
12. Zukowska-Grojec Z. Neuropeptide Y: a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium / Z. Zukowska-Grojec, E. Karwowska-Prokopczuk, W. Rose, J. Rone, S. Movafagh, H. Ji, Y. Yeh, W. T. Chen, H. K. Kleinman, E. Grouzmann, D. S. Grant // *Circ. Res.* – 1998. – V. 83. – P. 187–195.