

© П. М. Маслоков, П. А. Вишнякова, Д. А. Аряева, А. Ф. Будник, 2019  
УДК 611.018.8:612.338:612.65:599.323.4

П. М. Маслоков<sup>1</sup>, П. А. Вишнякова<sup>1</sup>, Д. А. Аряева<sup>1</sup>, А. Ф. Будник<sup>2</sup>

## ПОСТНАТАЛЬНЫЙ ОНТОГЕНЕЗ НЕЙРОПЕПТИД У-ЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ ТОНКОЙ КИШКИ

<sup>1</sup> Кафедра нормальной физиологии (зав. — проф. П. М. Маслоков), ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России; <sup>2</sup> кафедра нормальной и патологической анатомии (зав. — проф. И. А. Мизиев), ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова»

**Цель** — выявление локализации, процентного содержания и морфометрических характеристик НПУ-иммунореактивных (ИР) нейронов в интрамуральных ганглиях межмышечного (МС) и подслизистого сплетения (ПС) тонкой кишки крыс различных возрастных групп.

**Материал и методы.** Работа выполнена на крысах линии Вистар в возрасте 1, 10, 20, 30, 60 сут и 2 года с использованием иммуногистохимических методов.

**Результаты.** НПУ-ИР-нейроны обнаруживаются в тонкой кишке уже с момента рождения и на протяжении остальных изучаемых возрастных периодов. В интрамуральных ганглиях МС количество их было весьма небольшим и значимо в онтогенезе не менялось. В ганглиях ПС НПУ-ИР-нейроны в большом количестве выявлялись у новорожденных, наибольший процент наблюдался в возрасте 20–30 сут. Средняя площадь сечения НПУ-ИР-клеток в ПС была значимо большей по сравнению с таковой у 10-суточных и более взрослых крыс.

**Выводы.** Таким образом, нейропептид У является достаточно распространенным нейропептидом в различных отделах автономной нервной системы, включая симпатический, парасимпатический и метасимпатический, и играет важную роль в процессах возрастного развития нейронов.

**Ключевые слова:** нейропептид У, автономная нервная система, интрамуральные ганглии, тонкая кишка, онтогенез

**Введение.** Нейропептид У (НПУ) участвует в регуляции различных процессов, включая насыщение, эмоциональное состояние, артериальное давление, гастроинтестинальную секрецию [2]. НПУ играет роль нейротрансмиттера в автономной нервной системе и в большом количестве обнаруживается в волокнах, иннервирующих сердце, коронарные и мозговые артерии, сосуды скелетных мышц и кожи у крысы, кошки, морской свинки, человека [7, 14]. Также НПУ широко распространен и в пищеварительном тракте, в том числе выявляется в волокнах, направляющихся к слизистой и мышечной оболочкам, а также гладким мышцам сосудов [2, 5, 6].

В симпатических ганглиях и интрамуральных ганглиях сердца НПУ определяется с момента рождения, при этом в онтогенезе процент НПУ-позитивных нейронов возрастает в течение 1-го месяца жизни [1, 9, 10]. Тем не менее, возрастные аспекты экспрессии нейропептида У в метасимпатических интрамуральных энтеральных ганглиях остаются неясными. Целью настоящей работы явилось определение локали-

зации и морфометрических характеристик НПУ-позитивных нейронов в интрамуральных ганглиях двенадцатиперстной кишки крыс разного возраста от момента рождения до старости при помощи иммуногистохимических методов.

**Материал и методы.** Работа выполнена на новорожденных, 10-, 20-, 30-, 60-суточных, 2-летних крысах (по 5 в каждой возрастной группе). Исследование проводили с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 775 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). На проведение исследования получено разрешение этического комитета Ярославского государственного медицинского университета (№ 29 от 21.02.2019 г.). После введения летальной дозы уретана (3 г/кг внутривенно) животных перфузировали транкардиально раствором стандартного фосфатно-солевого буфера (PBS, 0,01M, pH 7,4) (Биолот, Россия), затем 4% раствором параформальдегида (Sigma, США) на PBS. После перфузии участок двенадцатиперстной кишки длиной 0,5 см извлекали и помещали в ту же фиксирующую смесь, в которой производили перфузию, на 1–2 ч. Серии срезов толщиной 12 мкм изготавливали на криостате.

Для выявления нейронов, содержащих НПУ, использовали первичные антитела кролика (Abscam, США, разведение 1:500), вторичные антитела были конъюгированы с флюо-

### Сведения об авторах:

Маслоков Петр Михайлович (e-mail: [mpm@ysmu.ru](mailto:mpm@ysmu.ru)), Вишнякова Полина Александровна,

Аряева Дарья Андреевна, кафедра нормальной физиологии с биофизикой, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5

Будник Антонина Францевна, кафедра анатомии человека, Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова, 360004, г. Нальчик, ул. Чернышевского, 173

рохромом — индокарбозианином (Cy3, Jackson, США, разведение 1:100), дающим красную флюоресценцию. Для расчета доли иммунопозитивных нейронов, кроме метки к НПУ, производили иммуномечение всей нейронной популяции при помощи антител от морской свинки к протеиновому генному продукту 9,5 (PGP9.5, Abcam, США, разведение 1:200), вторичные антитела были конъюгированы с флюорохромом флюоресцеин-изотиоцианатом (FITC, разведение 1:100, Jackson Immunoresearch, США), дающим зеленую флюоресценцию.

Анализ препаратов проводили на флюоресцентном микроскопе Olympus BX43 (Токио, Япония) с соответствующим набором светофильтров и охлаждаемой цифровой CCD-камерой Tucsen TCC 6.1ICE с программным обеспечением ISCapture 3.6 (Китай). Для анализа размеров и процентного соотношения иммунопозитивных нейронов на цифровых изображениях гистологических препаратов использовали программу Image J (НИН, США, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Долю иммунопозитивных нейронов определяли как их отношение к общему числу нейронов, которое принимали за 100%. Анализу подлежали нервные клетки, срез которых прошел через ядро с ядрышком. Для определения площади сечения нейронов в случайном порядке брали 100 нейронов, иммунопозитивных к каждому из исследованных маркеров в каждой возрастной группе.

Математическая обработка данных проведена с использованием пакета прикладных программ Sigma Plot (StatSoft, USA). Все величины представлены как средняя арифметическая ± ошибка среднего. Значимость различий средних величин определяли по методикам ANOVA, критериям Вилкоксона и Манна—Уитни. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования.** НПУ-иммунореактивные (НПУ-ИР) нейроны обнаруживали в тонкой кишке в интрамуральных ганглиях межмышечного сплетения (МС) уже с момента рождения и на протяжении остальных изучаемых возрастных периодов. Тем не менее, количество их было весьма небольшим и значимо в онтогенезе не менялось (табл. 1).

В ПС НПУ-ИР-нейроны выявляются в большем проценте с момента рождения (рисунок, см.

табл. 1). Их доля значимо увеличивалась в возрасте 20–30 сут, а затем уменьшалась у 2-месячных ( $p < 0,05$ ) и значимо не менялась у старых 2-летних крыс ( $p > 0,05$ ).

Среднее значение площади сечения НПУ-ИР-нейронов увеличивалось в онтогенезе с момента рождения в течение первых 2 мес жизни (табл. 2). В ПС средние значения площадей сечения НПУ-ИР-клеток были значимо больше таковых иммунонегативных нейронов у 10-суточных и более взрослых крыс ( $p < 0,05$ ). В МС средние площади сечения НПУ-ИР- и иммунонегативных нейронов значимо не отличались друг от друга ( $p > 0,05$ ).

**Обсуждение полученных данных.** Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что нейроны интрамуральных метасимпатических ганглиев кишки к моменту рождения содержат НПУ. Результаты нашей работы подтверждают ранее полученные сведения о преимущественной локализации НПУ в нейронах ПС по сравнению с МС [6, 12].

Считается, что у грызунов ПС формируется лишь после 1-й недели жизни [1, 6], однако, мы обнаружили НПУ-ИР-нейроны в ПС в большом количестве уже у новорожденных. Доля НПУ-ИР-нейронов в ПС не остается постоянной, наблюдаются подъем и последующий спад в возрасте 20–30 сут по сравнению с другими возрастными группами. В отличие от этого у грызунов наблюдается возрастание доли НПУ-ИР-нейронов в симпатических ганглиях в течение 1-го месяца жизни [9]. Наиболее выраженное увеличение доли НПУ-ИР-нейронов ранее отмечено нами в интрамуральных ганглиях сердца, где НПУ экспрессируют свыше 90 % нейронов [10].

Таблица 2

**Средние значения площадей сечения НПУ-ИР (+) и НПУ-негативных (–) нейронов в интрамуральных ганглиях двенадцатиперстной кишки крыс разного возраста (n=100 в каждой возрастной группе)**

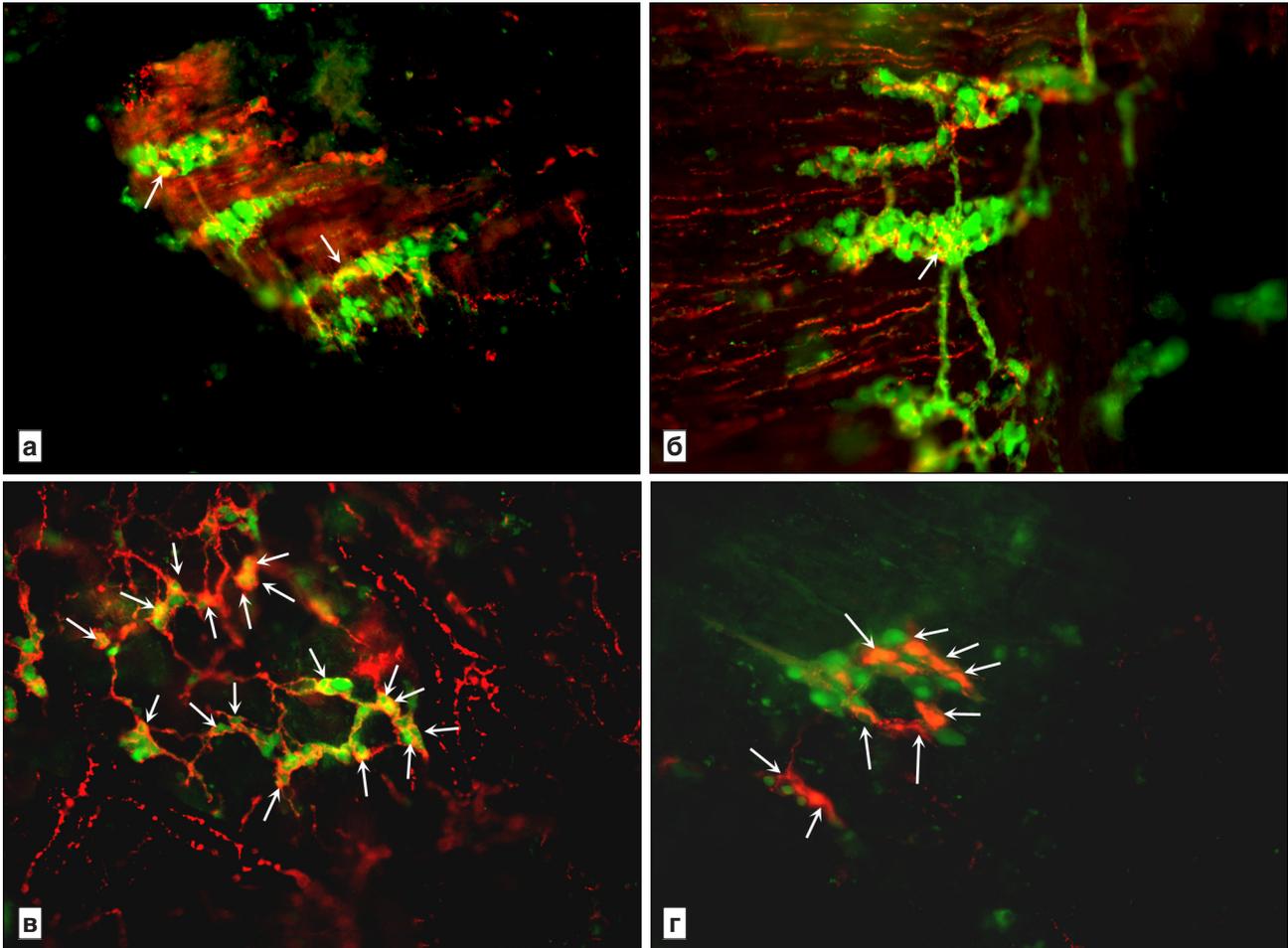
Возраст	МС		ПС	
	НПУ+	НПУ–	НПУ+	НПУ–
Новорожденные	94±7,5	85±6,4	84±7,5	78±6,4
10 сут	154±6,8	146±5,7	134±6,3	112±3,9*
20 сут	160±7,5	165±5,9	159±9,3	127±6,3*
30 сут	164±10,4	154±6,3	172±11,2	134±9,6*
2 мес	171±8,2	172±8,7	187±13,5	158±14,8*
2 года	173±12,4	174±11,5	195±12,3	156±8,9*

Таблица 1  
**Доля НПУ-ИР-нейронов в интрамуральных ганглиях двенадцатиперстной кишки крыс разного возраста (n=5 в каждой возрастной группе, %)**

Возраст	Межмышечное сплетение	Подслизистое сплетение
Новорожденные	4,1±0,32	56,3±2,4
10 сут	3,1±0,36	59,7±4,25
20 сут	3,7±0,24	78,1±5,18*
30 сут	3,2±0,64	75,6±4,62*
2 мес	3,6±0,51	60,0±3,26*
2 года	2,9±0,62	59,8±4,24

\* Различия значимы по сравнению с новорожденными, 10-суточными, 2-месячными и 2-летними животными при  $p < 0,05$ .

\* Различия значимы по сравнению с ИР-нейронами при  $p < 0,05$ .



Нейроны, содержащие НПУ в интрамуральных ганглиях межмышечного (а, б) и подслизистого (в, г) сплетений двенадцатиперстной кишки новорожденных (а), 20-суточных (б), 30-суточных (в) и 2-летних (г) крыс.

Стрелки — НПУ-ИР-нейроны. Флюоресценция Су3 (красный, НПУ), FITC (зеленый, PGP9.5). Об. 20, ок. 10

В онтогенезе размеры нейронов ганглиев автономной нервной системы возрастают [1, 8–11]. Основное увеличение размеров нейронов интрамуральных ганглиев тонкой кишки, в том числе НПУ-ИР, мы наблюдали в первые 10 сут жизни, которое продолжалось до конца 2-го месяца жизни, что соответствует нашим ранее полученным данным [11].

Согласно литературным данным, большинство НПУ-ИР-нейронов содержат фермент синтеза ацетилхолина — холинацетилтрансферазу [5, 12]. НПУ оказывает прямое тормозящее влияние на моторику и секрецию кишечника. Ингибирующее влияние НПУ на секреторную функцию кишки реализуется путем активации  $Y_1$ -постсинаптических рецепторов энтероцитов и нейрональных пресинаптических  $Y_2$ -рецепторов. НПУ тормозит моторику кишки, ингибируя выделение ацетилхолина из терминалей. При этом действие реализуется за счет  $Y_2$ -рецепторов [5, 6, 15].

Учитывая, что нейроны ПС участвуют в регуляции секреции, можно предположить, что в воз-

расте 20–30 сут происходит окончательное формирование секреторной функции тонкой кишки, связанное с переходом с молочного питания на самостоятельное. При этом НПУ может играть особую роль в становлении функции тонкой кишки, действуя не только в качестве котрансммиттера, но и как трофический фактор. Кроме влияния на тонус сосудов, деятельность сердца, секреторную и моторную функцию пищеварительного тракта, нейропептид  $Y$  дает трофические эффекты, в частности способствует нейрогенезу, ангиогенезу, гипертрофии миокарда [2, 3, 13]. В кишке НПУ играет также важную роль в модулировании функций иммунных клеток и эпителиального барьера. При воспалении кишечника содержание НПУ снижается [4].

**Заключение.** Таким образом, в большинстве ганглиев автономной нервной системы у грызунов в процессе возрастного развития происходит увеличение доли НПУ-содержащих нейронов. Этот процесс в различных ганглиях про-

текает гетерохронно. Наибольшее увеличение отмечается в интрамуральных ганглиях сердца, минимальное — в интрамуральных метасимпатических ганглиях кишки. Наряду с этим, НПУ играет важную роль в процессах возрастного развития нейронов автономной нервной системы. Детальное исследование НПУ-ергической системы позволит существенно расширить представления о нейропептидной системе регуляции функций организма.

#### Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: П. М. М.

Сбор и обработка материала: А. Ф. Б.

Статистическая обработка данных: А. Ф. Б.

Анализ и интерпретация данных: А. Ф. Б., П. М. М.

Написание текста: П. М. М.

**Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.**

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Маслюков П. М., Будник А. Ф., Ноздрачев А. Д. Нейрохимические особенности узлов метасимпатической системы в онтогенезе // Успехи геронтологии. 2017. Т. 30, № 3. С. 347–355 [Masliukov P. M., Budnik A. F., Nozdrachev A. D. Developmental changes of neurotransmitter properties in sympathetic neurons // *Uspekhi gerontologii*. 2017. Vol. 30, № 3. P. 347–355].
2. Ноздрачев А. Д., Маслюков П. М. Нейропептид Y и автономная нервная система // Журн. эволюцион. биохим. и физиол. 2011. Т. 47, № 2. С. 105–112 [Nozdrachev A. D., Maslyukov P. M. Neuropeptide Y and autonomic nervous system // *Zhurnal evolyutsionnoi biokhimii i fiziologii*. 2011. Vol. 47, № 2. P. 105–112].
3. Czarnecka M., Lu C., Pons J., Maheswaran I., Ciborowski P., Zhang L., Cheema A., Kitlinska J. Neuropeptide Y receptor interactions regulate its mitogenic activity // *Neuropeptides*. 2019. Vol. 73. P. 11–24. doi: 10.1016/j.npep.2018.11.008
4. Chandrasekharan B., Nezami B. G., Srinivasan S. Emerging neuropeptide targets in inflammation: NPY and VIP // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2013. Vol. 304, № 11. G949–G957.
5. Cox H. M. Neuropeptide Y receptors; antisecretory control of intestinal epithelial function // *Auton. Neurosci.* 2007. Vol. 133, № 1. P. 76–85.
6. Furness J. B. The enteric nervous system. Oxford: Blackwell Publishing, 2006.
7. Hodges G. J., Jackson D. N., Mattar L., Johnson J. M., Shoemaker J. K. Neuropeptide Y and neurovascular control in skeletal muscle and skin // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2009. Vol. 297, № 3. R546–555.
8. Masliukov P. M., Emanuilov A. I., Moiseev K., Nozdrachev A. D., Dobrotvorskaya S., Timmermans J. P. Development of non-catecholaminergic sympathetic neurons in para- and prevertebral ganglia of cats // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2015. Vol. 40. P. 76–84.
9. Masliukov P. M., Konovalov V. V., Emanuilov A. I., Nozdrachev A. D. Development of neuropeptide Y-containing neurons in sympathetic ganglia of rats // *Neuropeptides*. 2012. Vol. 46, № 6. P. 345–352.
10. Masliukov P. M., Moiseev K., Emanuilov A. I., Anikina T. A., Zverev A. A., Nozdrachev A. D. Development of neuropeptide Y-mediated heart innervation in rats // *Neuropeptides*. 2016. Vol. 55. P. 47–54.
11. Masliukov P. M., Moiseev K., Budnik A. F., Nozdrachev A. D., Timmermans J.-P. Development of calbindin- and calretinin-immunopositive neurons in the enteric ganglia of rats // *Cell Mol. Neurobiol.* 2017. Vol. 37, № 7. P. 1257–1267.
12. Mongardi Fantaguzzi C., Thacker M., Chiochetti R., Furness J. B. Identification of neuron types in the submucosal ganglia of the mouse ileum // *Cell Tissue Res.* 2009. Vol. 336, № 2. P. 179–189.
13. Saraf R., Mahmood F., Amir R., Matyal R. Neuropeptide Y is an angiogenic factor in cardiovascular regeneration // *Eur. J. Pharmacol.* 2016. Vol. 776. P. 64–70.
14. Tan C. M. J., Green P., Tapoulal N., Lewandowski A. J., Leeson P., Herring N. The Role of Neuropeptide Y in Cardiovascular Health and Disease // *Front. Physiol.* 2018 Vol. 9. P. 1281. doi: 10.3389/fphys.2018.01281
15. Tough I. R., Forbes S., Tolhurst R., Ellis M., Herzog H., Bornstein J. C., Cox H. M. Endogenous peptide YY and neuropeptide Y inhibit colonic ion transport, contractility and transit differentially via Y1 and Y2 receptors // *Br. J. Pharmacol.* 2011. Vol. 164. P. 471–484.

Поступила в редакцию 11.04.2019

### NEUROPEPTIDE Y-ERGIC NEURONS OF THE SMALL INTESTINE IN POSTNATAL ONTOGENESIS

P. M. Maslyukov<sup>1</sup>, P. A. Vyshnyakova<sup>1</sup>, D. A. Aryaeva<sup>1</sup>, A. F. Budnik<sup>2</sup>

**Objective** — to demonstrate the localization, percentage and morphometric characteristics of NPY-immunoreactive (IR) neurons in the intramural ganglia of the myenteric (MP) and submucous neural plexus (SP) of the small intestine in rats of different age groups.

**Material and methods.** The work was performed on 1-, 10-, 20-, 30-, 60-day-old and 2-year-old rats using immunohistochemical methods.

**Results.** NPY-IR neurons were detected in the small intestine from the moment of birth and throughout all studied age periods. In the intramural ganglia of the MP, their number was very small and did not change significantly during ontogenesis. In the SP, NPY-IR neurons were detected in large numbers in newborns; the maximal number of the neurons was observed at 20–30 days. The average cross-sectional area of the NPY-IR cells in the SP was significantly larger than such area of immunonegative neurons in 10-day-old and older rats.

**Conclusions.** Thus, neuropeptide Y is fairly common in various parts of the autonomic nervous system, including sympathetic, parasympathetic and metasympathetic, and plays an important role in the processes of age-related neuronal development.

**Key words:** neuropeptide Y, autonomic nervous system, enteric ganglia, small intestine, ontogenesis

<sup>1</sup> Department of Normal Physiology, Yaroslavl' State Medical University, 5 Revolucionnaya St., Yaroslavl' 150000; <sup>2</sup> Department of Normal and Pathological Anatomy, H. M. Berbekov Kabardino-Balkarian State University, 173 Chernyshevskogo St., Nalchik 360004