

12. Bellinger D. L., Lorton D., Hamill R. W. et al. Acetylcholinesterase staining and choline acetyltransferase activity in the young adult rat spleen: lack of evidence for cholinergic innervations. *Brain Behav. Immun.*, 1993, v. 7, № 3, p. 191–204.

Поступила в редакцию 21.05.2014
Получена после доработки 22.07.2014

AGE CHANGES OF CELLULAR COMPOSITION OF RAT MAJOR PELVIC GANGLION IN NORM AND AFTER DESYMPATHIZATION

O. A. Fokanova and T. A. Romyantseva

The neurons of major pelvic ganglion (MPG) were studied in 140 female Wistar rats of different ages (from newborns up to 180 days). For desympathization, experimental animals were daily intraperitoneally injected with 0.3 ml guanethidine (60–70 mg/kg) from Day 3 to Day 29. To detect the peculiarities of development, the cross-sectional area of neuronal cell bodies and the characteristics of the histograms of their cellular composition were evaluated. The periods of intensive growth in the size of neurons were detected: from Day 5 till Day 10, from Day 14

till Day 30 and from Day 60 till Day 90. These periods were followed by a relative stabilization of the parameter, indicating the stepwise nature of the process. Final stabilization of MPG neuronal populations occurred at Day 90. Desympathization caused the death of a part of a population of neurons, and disruption of normal age-related dynamics of their growth. Phase response to the injection of the neurotoxin was found in MPG. From Day 14 till Day 21, an average cross-sectional area of the cells was below normal, while from Day 21 till Day 60 it exceeded the control values. From Day 90 till Day 180, the cross-sectional area of neurons decreased, becoming lower than in control, indicating a secondary neurodystrophic process. The absence of class 5–7 large neurons after desympathization reflects not only the delay of their growth, but also the inability of surviving neurons to compensatory hypertrophic reactions as a result of disruption of trophic influences.

Key words: *pelvic ganglia, neurons, guanethidine, desympathization, histograms*

Department of Histology, Cytology and Embryology; Department of Human Anatomy, Yaroslavl' State Medical Academy

© Коллектив авторов, 2014
УДК 612.178:612.65

П. М. Маслюков¹, А. И. Емануйлов², А. В. Булибин¹, А. А. Зверев³ и Т. А. Аникина³

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОПЕПТИД Y-ЕРГИЧЕСКОЙ ИННЕРВАЦИИ СЕРДЦА В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

¹ Кафедра нормальной физиологии (зав. — проф. П. М. Маслюков), ² кафедра анатомии человека (зав. — проф. Т. А. Румянцева), Ярославская государственная медицинская академия; ³ кафедра анатомии, физиологии и охраны здоровья человека (зав. — проф. Т. Л. Зефилов), Казанский федеральный университет

Нейропептид Y (НПУ)-содержащие волокна и нейроны интрамуральных узлов, а также Y₁- и Y₂-рецепторы НПУ выявляли в миокарде у крыс в постнатальном онтогенезе иммуногистохимическими методами. Полученные данные свидетельствуют о возрастных изменениях НПУ-опосредованной сердечной иннервации. У новорожденных животных плотность расположения НПУ-позитивных волокон была наименьшей и возрастала с момента рождения в течение первых 20 сут жизни. Y₁- и Y₂-рецепторы обнаруживались в сердце у новорожденных и более взрослых животных. Y₁-рецепторы были обнаружены в сердце в коронарных артериях, артериолах, кардиомиоцитах с момента рождения. Плотность расположения Y₂-рецепторов НПУ в миокарде юных (до 2 мес жизни) и взрослых крыс (до 1 года) была очень мала, однако значительно возрастала у старых крыс. Все нейроны интрамуральных узлов на протяжении постнатального онтогенеза оставались Y₁-иммунопозитивными и Y₂-иммунонегативными.

Ключевые слова: *сердце, иннервация, интрамуральные узлы, нейропептид Y, рецепторы*

Нейропептид Y (НПУ) и его рецепторы участвуют в разнообразных функциях нервной системы, включая регуляцию насыщения, эмоционального состояния, сосудистого тонуса, секреции желез желудочно-кишечного тракта [1, 3]. НПУ

весьма распространен в автономной нервной системе и в большом количестве обнаруживается в волокнах, иннервирующих сердце, коронарные и мозговые артерии, аорту, сосуды кожи и скелетных мышц у крысы, кошки, морской

Сведения об авторах:

Маслюков Петр Михайлович (e-mail: mpm@yuma.ac.ru), *Булибин Андрей Владимирович*, кафедра нормальной физиологии; *Емануйлов Андрей Игоревич*, кафедра анатомии человека, Ярославская государственная медицинская академия, 150000, г. Ярославль, ул. Революционная 5;

Зверев Алексей Анатольевич (Aleksei5@rambler.ru), *Аникина Татьяна Андреевна* (Tania57vg1@rambler.ru), кафедра анатомии, физиологии и охраны здоровья человека, Казанский федеральный университет, г. Казань, ул. Кремлевская, 18

свинки, человека. Примерно две трети нейронов симпатических узлов у млекопитающих, помимо норадреналина, содержат этот пептид [2, 3, 7]. В интрамуральных узлах сердца в подавляющем большинстве нейронов (свыше 80%) выявляется НПУ, причем 100% НПУ-положительных нейронов одновременно содержат ацетилхолин [11].

К настоящему моменту идентифицированы 6 типов рецепторов НПУ (Y_1 – Y_6). Наиболее изученными являются рецепторы Y_1 - и Y_2 -типов [5, 8]. Рецепторы Y_1 , как правило, расположены постсинаптически. Пресинаптические эффекты НПУ осуществляются, главным образом, за счет рецепторов типа Y_2 (тем не менее, встречаются и постсинаптические Y_2 -рецепторы, например в миокарде). Y_2 -рецепторы идентифицированы в симпатической, парасимпатической и метасимпатической нервной системе. Возбуждение пресинаптических рецепторов Y_2 вызывает подавление высвобождения различных нейротрансмиттеров из синаптической терминали: в симпатических нервах — норадреналина, аденозинтрифосфата и самого НПУ, в парасимпатических — ацетилхолина, в афферентных — вещества Р и пептида, связанного с кальцитониновым геном [3, 5, 11].

В симпатических узлах НПУ определяется с момента рождения. В онтогенезе доля НПУ-положительных нейронов возрастает в течение 1-го месяца жизни [2, 7]. 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 НПУ в постнатальном онтогенезе. Цель настоящей работы — выявление возрастных изменений НПУ-положительных волокон и нейронов интрамуральных узлов, иннервирующих сердце, а также рецепторов НПУ типов Y_1 и Y_2 в миокарде.

Материал и методы. Исследование проведено на 35 белых крысах-самках линии Вистар в возрасте 1, 10, 20, 30, 60 сут, 1 и 2 лет жизни с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 775 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Эвтаназию животных осуществляли под уретановым наркозом (3 г/кг, внутривенно) путем транскардиальной перфузии фосфатно-солевого буфера (PBS) с гепарином (5 ЕД/л), затем 4% параформальдегида на 0,1 М PBS. Исследованию подвергали миокард правого предсердия и левого желудочка. Материал помещали на 2 ч в указанный выше фиксатор, после чего промывали 3-кратно в PBS в течение 30 мин и оставляли в 30% растворе сахарозы на 24 ч. Из фиксированного материала на криостате готовили серии срезов толщиной 14 мкм.

Выявление структур, содержащих НПУ, Y_1 - и Y_2 -рецепторы НПУ, проводили при помощи меченых антител по ранее описанной методике [2, 4]. Для выявления НПУ использовали первичные антитела овцы (Abcam, США, разведение 1:500), вторичные антитела были конъюгированы с флюорохромом — флюоресцеин-изотиоцианатом (FITC, разведе-

ние 1:100, Jackson Immunoresearch, США), дающим зеленую флюоресценцию. Для определения Y_1 - и Y_2 -рецепторов использовали первичные антитела кролика (Abcam, США, разведение 1:500), вторичные антитела были конъюгированы с флюорохромом индокарбоцианином (Cy3, Jackson, США, разведение 1:100), дающим красную флюоресценцию.

Срезы преинкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в PBS с добавлением 10% сыворотки, 1% тритон X-100, 0,1% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% тимерозола. Затем срезы инкубировали с первичными антителами в течение 24 ч при комнатной температуре. После кратковременной промывки в PBS срезы инкубировали с вторичными антителами в течение 2 ч, отмывали в PBS и заключали в среду для иммуофлюоресценции (VectaShield, Vector Laboratories, США).

Анализ препаратов проводили с помощью флюоресцентного микроскопа Olympus BX43 (Olympus, Япония) с соответствующим набором светофильтров и охлаждаемой цифровой CCD-камерой Tucsen TCC 6.1ICE с программным обеспечением ISCapture 3.6 (Китай). На цифровых изображениях гистологических препаратов миокарда с помощью квадратно-сетчатой вставки при увеличении 200, используя программу Image J (NIH, США), подсчитывали число НПУ-иммунопозитивных волокон на площади 0,05 мм².

Статистический анализ включал определение среднего арифметического значения и его стандартной ошибки. О значимости различий судили по величине t-критерия Стьюдента и считали их значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования. НПУ-содержащие волокна и нейроны в миокарде у крыс обнаруживались уже с момента рождения и на протяжении остальных изучаемых возрастных периодов (рис. 1, 2). У новорожденных животных плотность расположения НПУ-иммунопозитивных волокон была наименьшей и возрастала с момента рождения в течение первых 20 сут жизни, далее существенно не изменялась, в том числе и у старых 2-летних животных (таблица).

Рецепторы НПУ типа Y_1 и Y_2 обнаруживались в сердце у новорожденных и более взрослых животных. Y_1 -рецепторы в виде мелких зерен в сердце располагались довольно густо в коронарных артериях, артериолах и кардиомиоцитах. Иммунопозитивные Y_1 -рецепторы обнаруживались также во всех нейронах интрамуральных узлов с момента рождения. В различных возрастных группах значимых различий плотности расположения Y_1 -рецепторов выявлено не было.

Плотность расположения рецепторов Y_2 в миокарде юных (до 2 мес жизни) и взрослых животных до 1 года была очень мала, выявлялись лишь одиночные зернистые структуры. Однако число Y_2 -рецепторов значительно возрастало у старых 2-летних крыс (см. рис. 2). Все нейроны интрамуральных узлов на протяжении постнатального онтогенеза оставались Y_2 -иммунонегативными.

Обсуждение полученных данных. Таким образом, полученные данные свидетель-

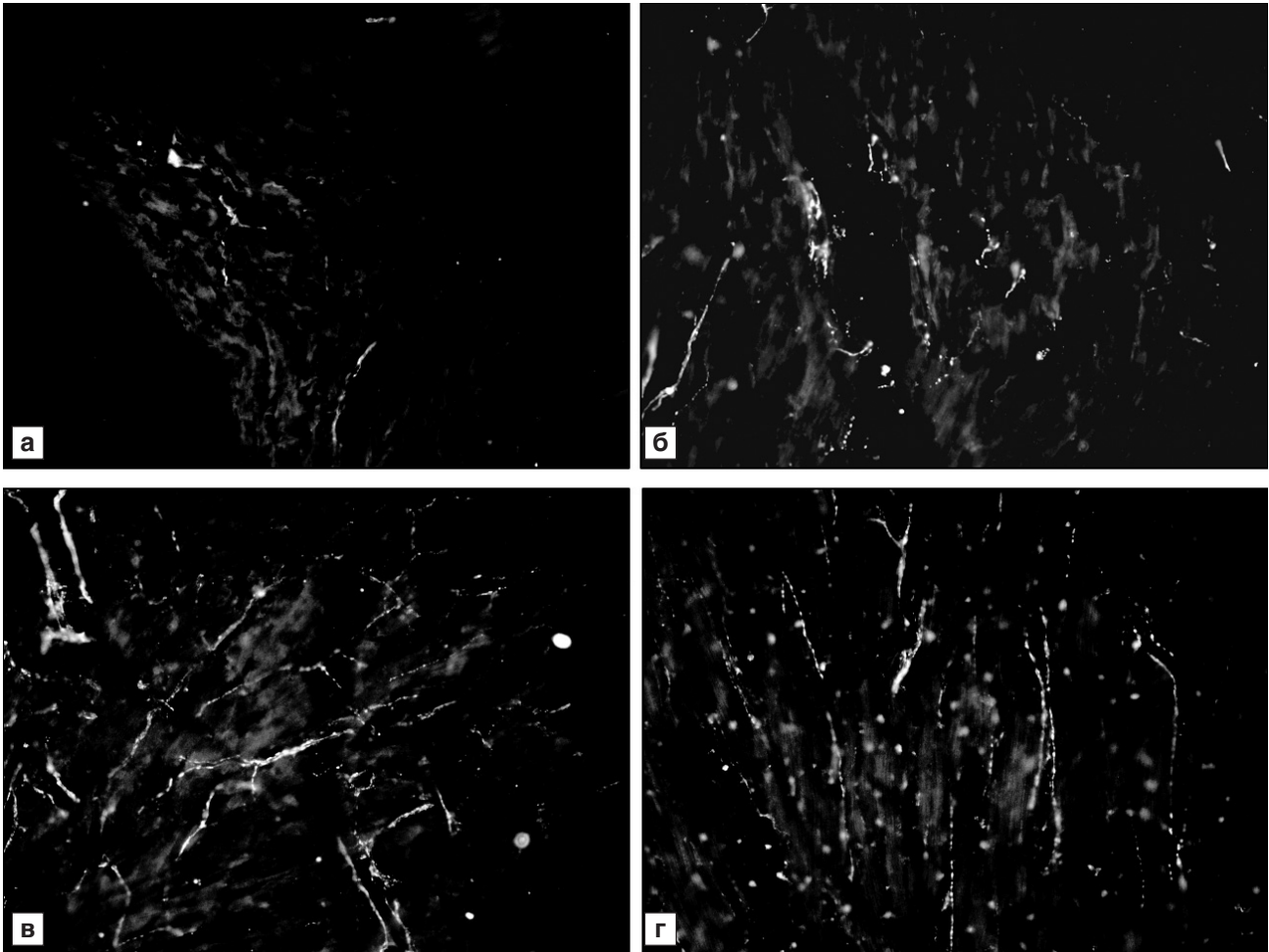


Рис. 1. Нейропептид Y-иммунопозитивные волокна в правом предсердии у новорожденных (а), 10-суточных (б), 20-суточных (в) и 2-летних (г) крыс.

Иммуногистохимическая реакция с флюоресцеин-изотиоцианатом. Об.20, ок. 10

**Плотность расположения
нейропептид Y-иммунопозитивных волокон
в различных отделах миокарда у крыс разного возраста
($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, на 0,05 мм²)**

Возраст животных	Правое предсердие	Левое предсердие	Левый желудочек
Новорожденные	82±7	78±12	74±10
10 сут	224±43	272±56	308±67
20 сут	494±77*	470±81*	526±86
30 сут	504±91*	502±96*	542±105*
60 сут	458±66*	474±88*	470±79*
1 год	522±83*	504±79*	498±86*
2 года	486±72*	496±104*	514±85*

* Различия значимы по сравнению с показателями у новорожденных и 10-суточных животных при $P < 0,05$.

ствуют о наличии смешанной парасимпатической НPY-ергической регуляции сердца к моменту рождения и подтверждают более ранние сведения о наличии НPY-содержащих симпатических волокон, иннервирующих сердце у новорожден-

ных крысят [7]. Значимых различий плотности расположения НPY-иммунопозитивных волокон в предсердиях и желудочках нами не обнаружено.

В онтогенезе размеры нейронов узлов автономной нервной системы возрастают [6]. Увеличение доли НPY-позитивных нейронов интрамуральных узлов и плотности расположения НPY-иммунопозитивных волокон в первые 20 сут жизни коррелирует с возрастанием числа НPY-иммунопозитивных нейронов в звездчатых узлах у крысы в эти возрастные периоды [2, 7].

Есть работы, свидетельствующие о трофической роли НPY в нервной и сердечно-сосудистой системе. НPY вызывает гипертрофию миокарда и обладает ангиогенным свойством [9, 13]. Главным образом стимулирующее влияние на васкуляризацию осуществляется за счет Y_1 -, Y_2 - и Y_5 -рецепторов [13]. НPY стимулирует активацию, миграцию, пролиферацию эндотелиоцитов. Установлено, что НPY требуется для возрастного развития кальциевых каналов L-типа в миокарде [10]. Есть данные об увеличении под

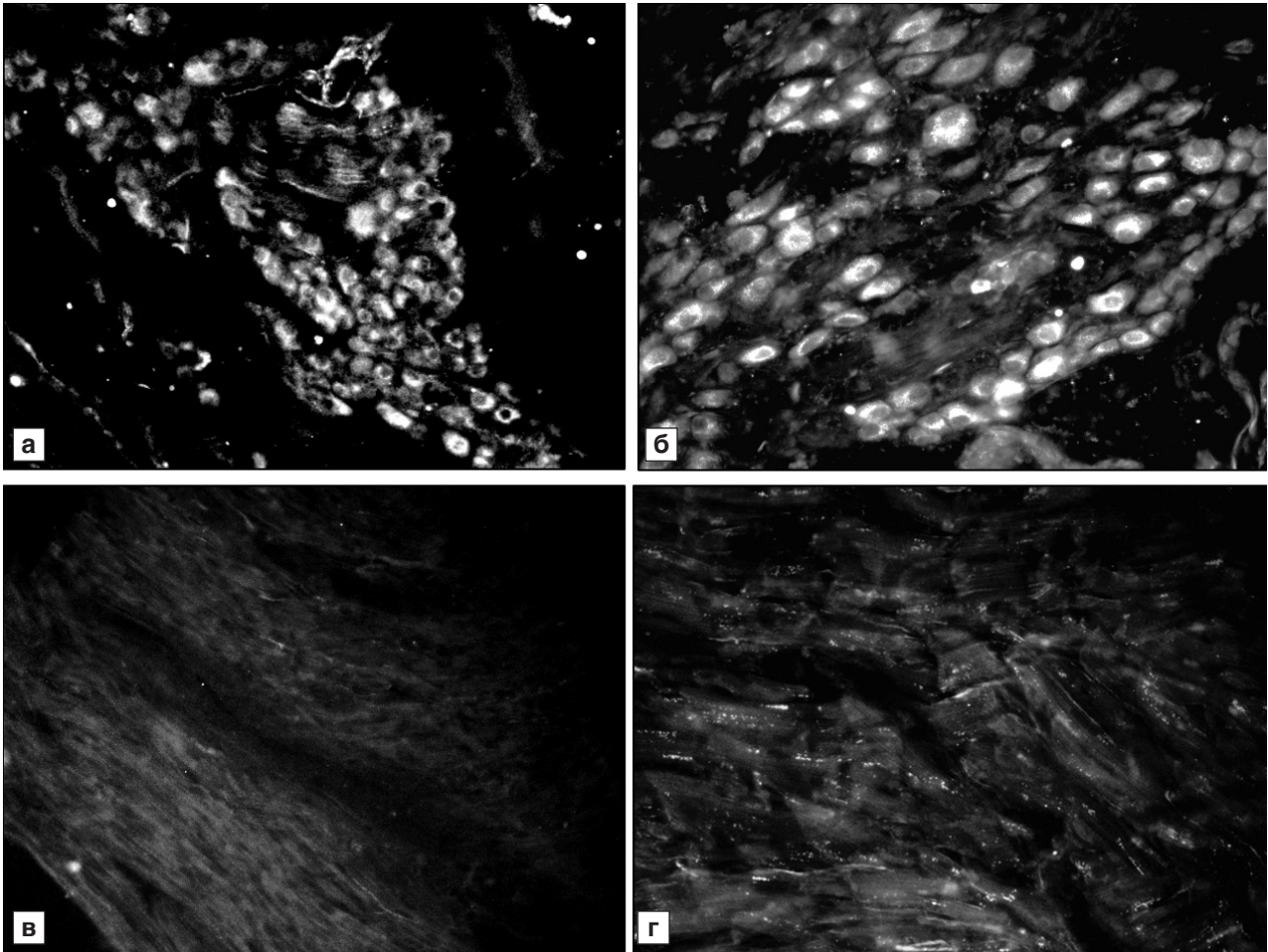


Рис. 2. Нейропептид Y (НПУ)-ергические структуры в правом предсердии крысы.

а, б — НПУ-иммунопозитивные нейроны в интрамуральных ганглиях у 10-суточных и 2-месячных крыс соответственно; в, г — Y_2 -рецепторы в миокарде 10-суточных и 2-летних крыс соответственно. а, б — иммуногистохимическая реакция с флюоресцеин-изоотиоцианатом; в, г — иммуногистохимическая реакция с индокарбоцианином. Об. 20, ок. 10

влиянием НПУ плотности расположения α - и β -адренорецепторов в сердечной мышце [12], что, важно для становления симпатической иннервации сердца.

Таким образом, у крыс НПУ-ергическая иннервация сердца присутствует с момента рождения. В раннем постнатальном онтогенезе происходит увеличение плотности расположения НПУ-позитивных волокон, в старости выявляется увеличение экспрессии Y_2 -рецепторов. Вероятно, указанные изменения связаны с трофическим действием НПУ.

Работа поддержана РФФИ, грант 13-04-00059-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Королева С.В. и Ашмарин И.П. Нейропептид Y: многообразие и кажущаяся противоречивость функций. Анализ возможных опосредованных эффектов. Успехи физиол. наук, 2000, т. 31, № 1, с. 31–46.
2. Маслюков П.М., Ноздрачев А.Д. и Timmermans J.P. Возрастные особенности нейротрансмиттерного состава нейронов звездчатого узла. Росс. физиол. журн. им. И.М.Сеченова, 2006, т. 92, № 2, с. 214–221.
3. Ноздрачев А.Д. и Маслюков П.М. Нейропептид Y и автономная нервная система. Журн. эволюц. биох. и физиол., 2011, т. 47, № 2, с. 105–112.
4. Порсева В.В., Шилкин В.В., Корзина М.Б. и др. Особенности возрастных изменений НФ200⁺-нейронов чувствительных узлов различных сегментарных уровней при химической деафферентации. Морфология, 2012, т. 142, вып. 4, с. 37–42.
5. Hodges G. J., Jackson D. N., Mattar L. et al. Neuropeptide Y and neurovascular control in skeletal muscle and skin. Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol., 2009, v. 297, p. 546–555.
6. Masliukov P.M. Sympathetic neurons of the cat stellate ganglion in postnatal ontogenesis: morphometric analysis. Auton. Neurosci., 2001, v. 89, № 1–2, p. 48–53.
7. Masliukov P.M., Kononov V.V., Emanuilov A.I. and Nozdrachev A.D. Development of neuropeptide Y-containing neurons in sympathetic ganglia of rats. Neuropeptides, 2012, v. 46, № 6, p. 345–352.

8. Michel M.C., Beck-Sickinger A., Cox H. et al. XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol. Rev.*, 1998, v. 50, p. 143–150.
9. Millar B.C., Schluter K.D., Zhou X.J. et al. Neuropeptide Y stimulates hypertrophy of adult ventricular cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 1994, v. 266, 5 Pt 1, C1271–C1277.
10. Protas L., Barbuti A., Qu J. et al. Neuropeptide Y is an essential in vivo developmental regulator of cardiac ICa_v. *L. Circ. Res.*, 2003, v. 93, p. 972–979.
11. Richardson R.J., Grkovic I. and Anderson C.R. Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart. *Cell Tissue Res.*, 2003, v. 314, p. 337–350.
12. Rocha-Singh K.J., Matsuo R. and Karliner J.S. Prolonged incubation with neuropeptide Y upregulates beta-adrenoceptors yet does not cause supersensitivity of beta-adrenoceptor signaling. *Eur. J. Pharmacol.*, 1995, v. 288, p. 349–353.
13. Zukowska-Grojec Z., Karwowska-Prokopczuk E., Rose W. et al. Neuropeptide Y: a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium. *Circ. Res.*, 1998, v. 83, p. 187–195.

Поступила в редакцию 21.05.2014
Получена после доработки 22.07.2014

MORPHOLOGICAL PECULIARITIES OF NEUROPEPTIDE Y-ERGIC INNERVATION OF THE HEART IN POSTNATAL ONTOGENESIS

*P.M.Masliukov, A.I.Yemanuilov, A.V.Bulibin,
A.A.Zverev and T.A.Anikina*

Neuropeptide Y (NPY)-containing fibers and intramural ganglionic neurons, as well as Y₁ and Y₂ receptors to NPY were detected in the myocardium of rats during postnatal ontogenesis using immunohistochemical methods. The data obtained suggest age-dependent changes of the NPY-mediated heart innervation. The density of NPY-positive fibers was the least in newborn animals and increased during first 20 days of life. Y₁ and Y₂ receptors were found in the heart of newborn and more adult rats. Y₁ receptors were observed in the coronary heart arteries, arterioles and cardiomyocytes from the moment of birth. The density of NPY Y₂ receptors was very low in the cardiac muscle of young (prior to the 2nd month of age) and adult (up to 1 year-old) rats but substantially increased in aged animals. During the postnatal ontogenesis? all the intramural ganglionic neurons were Y₁-positive and Y₂-negative.

Key words: *heart, innervation, intramural ganglia, neuropeptide Y, receptors*

Department of Normal Physiology with Biophysics, Department of Human Anatomy, Yaroslavl' State Medical Academy; Department of Anatomy, Physiology and Human Health Protection, Kazan' Federal University