

А. В. Сокол, В. В. Руденок

ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ НЕЙРОПЕПТИДА Y В ТИМУСЕ ЧЕЛОВЕКА

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

В работе представлены результаты иммуногистохимического исследования экспрессии нейропептида Y в вилочковой железе человека различных возрастных групп. Возрастные изменения экспрессии нейропептида Y в тимусе человека отражают уровень цитохимической зрелости и/или функциональной активности органа в определенный период онтогенеза.

Ключевые слова: *тимус человека, нейропептид Y, экспрессия.*

A. V. Sokal, V. V. Roudenok

AGE-DEPENDENT DYNAMIC OF NEUROPEPTIDE Y EXPRESSION IN HUMAN THYMUS

The results of immunohistochemical studies of expression of neuropeptide Y in the human thymus of different age groups are presented. Age-related changes in the expression of neuropeptide Y in the human thymus reflect of the cytochemical level of maturity and / or functional activity of the organ within period of ontogenesis.

Key words: *human thymus, neuropeptide Y, expression.*

Оригинальные научные публикации

Нейропептид Y (НПУ) является одним из наиболее распространенных в регуляторных системах нейропептидов, содержит 36 аминокислотных остатков и вместе с родственным по структуре пептидом YY принадлежит к семейству панкреатических регуляторных полипептидов [5,13]. Как свидетельствует анализ литературы нейропептид Y и НПУ рецепторы представлены в центральной и периферической нервной системе человека и млекопитающих животных [5,12,14]. Иммунореактивные к НПУ нервные волокна обнаружены вокруг кровеносных сосудов головного мозга, дыхательных путей, слизистой полости рта, желудка, брыжейки тонкой и толстой кишки, почек, щитовидной железы и других органов [17].

По данным ряда авторов нейропептид Y ассоциирован с рядом физиологических процессов; так центральными эффектами нейропептида Y являются: гипотензия, гипотермия, угнетение дыхания, влияние на высвобождение гипофизарных гормонов [5,12,22]. К периферическим эффектам НПУ относят: регуляцию сердечной-сосудистой, эндокринной и респираторной деятельности, усиление вазоконстрикторного эффекта норадренергических нейронов. [13,17,23]. Ряд работ свидетельствует о вовлечении нейропептида Y в регуляцию широкого круга гуморальных и клеточно-опосредованных иммунных реакций [1,2,7,10,17]. Многочисленные исследования продемонстрировали наличие экспрессии Y1 НПУ рецепторов на поверхности макрофагов [6,8,22], Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, нейтрофилов и тучных клеток [1,2]. При этом активность натуральных киллеров обратно пропорционально коррелирует с сывороточным уровнем нейропептида Y [1,7,16,19]. Нейропептид Y обладает противовоспалительным эффектом, ингибируя выход цитокинов и непосредственно Т-клеточный (Th1) иммунный ответ, одновременно способствуя дифференцировке Th2 клеток [13,15,18,22]. По данным многих авторов нейропептид Y ингибирует продукцию и секрецию интерлейкинов: ИЛ-1 β , ИЛ-2, а также ИЛ-6 [11,16,19,20]. Фармакологическими экспериментами показано модулирующее влияние нейропептида Y на процессы пролиферации, дифференцировки, а также миграции лимфоцитов [1,16,19]. НПУ оказывает влияние и на иммунодуляторное действие других нейропептидов – кальцитонин ген-родственного пептида, вазоактивного интестинального полипептида, со-

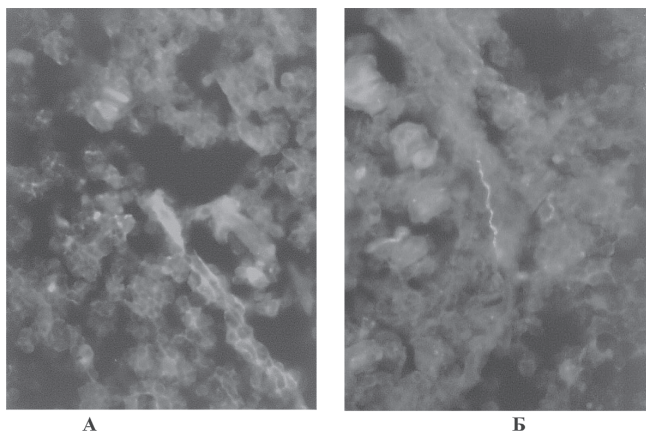


Рис.1 Иммунореактивность к нейропептиду Y в тимусе новорожденного (А) и ребенка 3 лет (Б). Крупная НПУ-ИР дендритная клетка; группы НПУ-ИР эпителиальных клеток (А). НПУ-ИР клетки и нервные волокна (Б). Непрямой иммунофлуоресцентный метод. x200

матостатина, действуя как нейроиммунный котрансмиттер [1].

Кроме того, данные литературы свидетельствуют о выраженной экспрессии нейропептида Y эпителиальными и стромальными клетками вилочковой железы птиц и млекопитающих животных: белых крыс, мышей, морских свинок, кошек, включая и человека [14,21,22]. Следует отметить, что НПУ-иммунореактивные нервные волокна симпатического генеза были найдены преимущественно в периваскулярных сплетениях и лишь спорадически встречались непосредственно в паренхиме вилочковой железы [4,23].

Между тем, подавляющее число исследований выполнено в условиях *in vitro* или на экспериментальных животных. Распределение нейропептида Y в центральных и периферических органах иммунной системы человека, особенно в возрастном аспекте, исследовано недостаточно.

Цель исследования. Изучить возрастную динамику экспрессии нейропептида Y в тимусе человека.

Материал и методы

Объект исследования: аутопсийный и биопсийный материал 73 тимусов человека в возрасте от 24-27 недель до 47 лет. Материал для исследования был разделен на 4 возрастные группы: 1-я группа – тимусы плодов 24-27 недель, 2-я группа – тимусы новорожденных 1-4 суток, 3-я группа – тимусы детей 3-5 лет, 4-я группа-тимусы взрослых 18-47 лет.

Фиксация материала проводилась в универсальном растворе для иммуногистохимических исследований морфологического материала: 2% растворе Замбони, включающем параформальдегид, пикриновую кислоту, одно- и двухзамещенный фосфаты натрия (pH 7.4). После фиксации фрагменты тимуса последовательно промывались в 0.1М фосфатном буфере (pH 7.4), 50% этиловом спирте, 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4), 20% растворе сахарозы. В последнем растворе образцы ткани находились в течение 12 часов при температуре 4°C. Серийные срезы толщиной 8-10мкм были приготовлены из замороженных в 0,9% физиологическом растворе фрагментов тимуса с помощью автоматического замораживающего микротомы фирмы «Leica» при температуре-22°C, смонтированы на покрытых желатином (2% раствор) предметных стеклах и высушены при комнатной температуре (18-20°C) в течение 30 минут. Затем препараты были помещены в холодильную камеру, где сохранялись при температуре-78°C. Перед проведением иммуногистохимических реакций предметные стекла извлекались из холодильника и подвергались просушке в открытом помещении при температуре 18-20 °C в течение 30 минут. Затем срезы дважды промывались в 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4) в течение 20 минут, после чего на них наносился 10% раствор нормальной козьей сыворотки (Dakopatts; X907). Обработанные сывороткой препараты помещались в темную увлажненную камеру на 30 минут. После удаления сыворотки срезы обрабатывались сывороткой, содержащей поликлональные антитела к нейропептиду Y (НПУ, 1:200, В 48-100, Milab). Извлеченные из темной увлажненной камеры по истечении срока инкубации препараты дважды по 10 минут промывались в кюветах с фосфатным буфером (pH 7.4).

Далее срезы обрабатывались сыворотками, содержащими вторичные антитела, конъюгированные с флуорофорами: Cy3 (Cy3™-GARIGG, 30254, Jackson) в разведении 1:100, затем помещались на 2 часа в темную увлаж-

ненную камеру. После удаления сыворотки и двукратного промывания в фосфатном буфере (pH 7.4) срезы заключались в смесь глицерин/фосфатный буфер (3:1). Оценка результатов проводилась на универсальном фотомикроскопе Axioptot ("Zeiss", Германия) с комбинациями фильтров для СуЗ индуцированной иммунофлуоресценции. Интенсивность флуоресценции определялась как слабая, средняя и сильная. В каждом случае анализировали 10 полей зрения при увеличении 400х (Автандилов Г.Г., 1990). Определялся показатель экспрессии нейропептида Y, который представлял собой отношение НПУ-иммунореактивных структур к общему клеткам в поле зрения, выраженный в процентах. Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением пакета прикладных программ «STATISTICA» (Version 6-index, Statsoft Inc.).

Результаты и обсуждение

У плодов (1-я возрастная группа) иммунореактивность к нейропептиду Y обнаруживалась в эпителиальных и тучных клетках, тимоцитах, располагающихся в кортикальной и медуллярной зонах и клетках соединительнотканной стромы тимуса. Распределение нейропептид Y-содержащих структур в дольках тимуса носило диффузный характер. НПУ-ИР образования имели овальную, округлую или, реже, неправильную форму. Выраженность иммуногистохимической реакции к нейропептиду Y была подвержена значительным вариациям. Как правило, наиболее выраженную иммунофлуоресценцию проявляли НПУ-ИР клетки более крупных размеров. Между тем отмечались и отдельные иммунореактивные к нейропептиду Y эпителиальные клетки и тимоциты, у которых выявлялась сильная степень иммуногистохимической реакции

В тимусе детей 2-ой возрастной группы (новорожденные) по сравнению с вилочковой железой 1-ой возрастной группы отмечалось значительное увеличение количества иммунореактивных к нейропептиду Y структур. Наблюдались НПУ-ИР эпителиальные клетки, тимоциты, макрофаги, тучные и единичные дендритные клетки, а также небольшие нейропептид Y-иммунореактивные клетки в строме органа. Специфическое иммуноокрашивание с антителами к нейропептиду Y обнаруживалось в нервных волокнах, в соединительно-тканной капсуле и трабекулах, а также внутри долек вилочковой железы (рис. 1А). Экспрессия нейропептида Y обнаруживалась и в тельцах Гассала. НПУ – ИР нервные волокна с тонкими варикозными расширениями наблюдались в капсуле тимуса, откуда они следовали в паренхиму органа, располагаясь в междольковых перегородках. На препаратах тимуса детей третьей возрастной группы по сравнению с вилочковой железой новорожденных, экспрессия нейропептида Y в клеточных структурах органа уменьшалась. Иммунореактивность к нейропептиду Y обнаруживалась в эпителиальных клетках, тимоцитах, тучных клетках, макрофагах. На срезах вилочковой железы НПУ-ИР структуры располагались как правило в составе клеточных групп. В состав таких групп входили одинаковые по величине НПУ-иммунореактивные образования или, реже, клетки разных размеров. При этом число НПУ-ИР клеток, входящих в состав кластера, варьировало, составляя в среднем от двух до шести. Прослеживались тонкие извитые иммунореактивные к НПУ нервные волокна (рис. 1Б).

В тимусе человека зрелого возраста наблюдалось значительное снижение количества иммунореактивных к нейропептиду Y структур. Обнаруживались единичные эпителиальные клетки и нервные волокна. Иммунореактивность к НПУ в тимических тельцах отсутствовала.

Показатель экспрессии нейропептида Y имеет самое высокое значение для группы новорожденных детей ($14,8 \pm 1,16\%$), что достоверно выше ($p < 0,05$), чем в тимусе плодов ($7,4 \pm 0,86\%$), детей дошкольного возраста ($4,2 \pm 0,58\%$) и взрослых ($1,2 \pm 0,11\%$).

Наши результаты согласуются с данными других авторов, исследовавших распределение нейропептида Y в тимусе птиц и млекопитающих животных: белых крыс, мышей, морских свинок, кошек. Между тем анализ собственных результатов и данные литературы подтверждает существование межвидовых различий в экспрессии НПУ отдельными популяциями клеток.

Присутствие небольшой популяции иммунореактивных к нейропептиду Y клеток в вилочковой железе плодов человека и значительное увеличение их количества у новорожденного ребенка объясняется несколькими причинами. НПУ участвует в регуляции функций эндотелия, обладая индукторным и трофическим влиянием. Таким образом, индуцируя ангиогенез, нейропептид Y принимает непосредственное участие в формировании кровеносного русла вилочковой железы [17]. Увеличение экспрессии НПУ в тимусе новорожденных детей можно объяснить резко возросшей потребностью в его модулирующих функциях. Так фармакологическими экспериментами показано выраженное модулирующее влияние нейропептида Y на этапы развития и дифференцировки Т-клеток [19,22]. Имеются свидетельства стимулирующего влияния нейропептида Y на секрецию цитокинов, а так же миграцию и фагоцитарную активность макрофагов [6,8,9,18,20,23]. Не исключено, что НПУ-эргическая иннервация важна для установления микроокружения, а также дифференцировки и селекции тимоцитов

В тимусе взрослых наблюдалось значительное снижение количества иммунореактивных к нейропептиду Y клеточных структур. Уменьшение числа НПУ-ИР образований в исследованных нами срезах вилочковой железы взрослых после достижения максимума экспрессии нейропептида Y у новорожденных объясняется инволютивными процессами, которые протекают практически во всех органах и системах организма человека, что согласуется с данными De la Fuente [6,7] отметившим, что с возрастом происходит снижение модулирующего влияния нейропептида Y.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о наличии иммунореактивности к нейропептиду Y в тимусе человека, начиная с плодного периода онтогенеза. Возрастная динамика экспрессии нейропептида Y в тимусе человека носит ярко выраженный однофазный характер. Своего максимума экспрессия НПУ достигает в тимусе новорожденных детей, после чего наблюдается ее значительное снижение в органе. В тимусе новорожденных экспрессия нейропептида Y характеризует морфофункциональную зрелость органа и его способность обеспечивать регуляцию иммунных функций и компенсаторно-приспособительные реакции ребенка во внешнесредовых условиях существования.

Литература

1. Bedoui, S., Kawamura N, Straub RH, Pabst R, Yamamura T, von Horsten S./ Relevance of neuropeptide Y for the neuroimmune crosstalk. // J Neuroimmunol. 2003 Jan;134(1-2):1 – 11.
2. Bedoui, S, von Horsten S, Gebhardt T/ A role for neuropeptide Y (NPY) in phagocytosis: implications for innate and adaptive immunity. // Peptides. 2007 Feb;28(2):373 – 6
3. Bedoui, S, Kromer A, Gebhardt T, Jacobs R, Raber K, / Neuropeptide Y receptor-specifically modulates human neutrophil function. // J Neuroimmunol. 2008 Mar;195(1-2):88 – 95.

□ Оригинальные научные публикации

4. *Cavallotti, D, Artico M, Iannetti G, Cavallotti C* Occurrence of adrenergic nerve fibers in human thymus during immune response. // 2002 *Neurochem Int* 40: 211 – 221
5. *Colmers, WF, El Bahn B.* «Neuropeptide Y and Epilepsy». *Epilepsy* 2003. – // *Currents/American Epilepsy Society* 2 (3): 53 – 8.
6. *De la Fuente, M, Medina S, Del Rio M, Ferrandez MD, Hernanz A* Effect of aging on the modulation of macrophage functions by neuropeptides. // *Life Sci.* 2000 Sep 15;67(17):2125 – 35.
7. *De la Fuente, M, Del Rio M, Victor VM, Medina S /* Neuropeptide Y effects on murine natural killer activity: changes with ageing and cAMP involvement. // *Regul Pept.* 2001 Sep 15;101(1-3):73 – 9.
8. *Dimitrijevic, M, Stanojevic S, Vujic V, Beck-Sickinger A, von Horsten S* (2005) Neuropeptide Y and its receptor subtypes specifically modulate rat peritoneal macrophage function in vitro: counter regulation through Y1 and Y2/5. // *Regul. Pept.* 124:163 – 172
9. *Dimitrijevic, M, Stanojevic S, Mitic K, Kustrimovic N, Vujic V.* The anti-inflammatory effect of neuropeptide Y (NPY) in rats is dependent on dipeptidyl peptidase 4 (DP4) activity and age. // *Peptides.* 2008 Dec;29(12):2179-87. Epub 2008 Sep
10. *Du M, Butchi NB, Woods T, Morgan TW, Peterson KE.* / Neuropeptide Y has a protective role during murine retrovirus-induced neurological disease. // *J Virol.* 2010 Nov;84(21):11076 – 88. Epub 2010 Aug 11.
11. *Ferreira, R, Xapelli S, Santos T, Silva AP, Cristovao A, Cortes L, Malva JO /* Neuropeptide Y modulation of interleukin-1 beta (IL-1{beta})-induced nitric oxide production in microglia. // *J Neuroinflammation.* 2011; 8: 169.
12. *Herzog, H.* Neuropeptide Y and energy homeostasis: insights from Y receptor knockout models. // *Eur. J. Pharmacol.* (2007) 480:21 – 29. *Nature Medicine* 13, 803 – 811
13. *Groneberg, DA, Folkerts G, Peiser C, Chung KF, Fischer A* Neuropeptide Y (NPY). // *Pulm Pharmacol Ther.* 2004;17(4):173 – 80.
14. *Kranz, A, Kendall MD, von Gaudecker B.* Studies on rat and human thymus to demonstrate immunoreactivity of calcitonin gene-related peptide, tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y. // *J. Anat.* (1997) 191, pp. 441±450.
15. *Luhder, F, Lee DH, Gold R, Stegbauer J, Linker RA. /* J Neuroimmunol. Small but powerful: short peptide hormones and their role in autoimmune inflammation. // *Epub* 2009 Sep 12.10;217(1-2):1 – 7.
16. *Medina, S, Del Rio M, Hernanz A, De la Fuente M /* Age-related changes in the neuropeptide Y effects on murine lymphoproliferation and interleukin-2 production. // *Peptides.* 2000 Sep;21(9):1403 – 9.
17. *Pons, J, Lee EW, Li L, Kitlinska J. Allen et al.* Neuropeptide Y: multiple receptors and multiple roles in cardiovascular diseases. // *Curr Opin Investig Drugs.* 2004 Sep;5(9):957 – 62.
18. *Prod'homme, T, Weber MS, Steinman L, Zamvil SS /* Trends Immunol. A neuropeptide in immune-mediated inflammation, Y?. // *Epub* 2006Apr;27(4):164 – 7.
19. *Puerto, M, Guayerbas N, Alvarez P, De la Fuente M* Modulation of neuropeptide Y and norepinephrine on several leucocyte functions in adult, old and very old mice. // *J Neuroimmunol.* 2005 Aug;165(1-2):33 – 40.
20. *Straub RH, Schaller T, Miller LE, von Horsten S, Jessop DS.* Neuropeptide Y cotransmission with norepinephrine in the sympathetic nervemacrophage interplay. // *J Neurochem* 2000, 75: 2464 – 2471
21. *Silva Alberto B., Danielle Aw and Donald B.* Evolutionary conservation of neuropeptide expression in the thymus of different species // *Palmer Blackwell Publishing Ltd, Immunology,* 2006, 118, 131 – 140.
22. *Wheway, J, Herzog H, Mackay F.* NPY and receptors in immune and inflammatory diseases. // *Curr Top Med Chem.* 2007;7(17):1743 – 52.
23. *Zukowska, Z, Pons J, Lee EW, Li L.* Neuropeptide Y: a new mediator linking sympathetic nerves, blood vessels and immune system? // *Can J Physiol Pharmacol.* 2003 Feb;81(2):89 – 94.