

DISTRIBUTION AND STRUCTURAL ORGANIZATION OF AUTONOMIC NEURAL APPARATUS OF THE RAT PANCREAS (AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY)

Ye.I. Chumasov, Ye.S. Petrova and D.E. Korzhevskiy

Using the immunohistochemical methods for detection of neurofilaments (NF), peripherin (PRF), synaptophysin (SF), tyrosine hydroxylase (TH) and Nissl-staining with toluidine blue, thick sections (10–20 μm) prepared through all parts of pancreas of adult Wistar rats ($n=7$) were studied. The topography and the density of distribution of pancreatic islets in the various parts of pancreas were defined. The greatest density of the islets was found in the body of pancreas. The dense innervation of the organ was detected which included several nervous plexuses: the big-looped one consisting of nervous bundles and small trunks of NF-positive myelinated and unmyelinated nervous fibers, the

second one was formed by PRF-positive thin postganglionic bundles of axons and microganglia, and the third one, detected with SF-staining, was main terminal plexus consisting of varicose axons with *en passant* synapses. Interactions of synaptophysin-positive terminals (distant *en passant* synapses) with blood vessels, endocrine (islet) and exocrine cells, excretory ducts of the pancreatic lobules are described in details. Peculiarities of the structure of parasympathetic ganglia, their neurons, and pericellular synaptic apparatus are described; problems of the innervation and the nature of pancreatic insular endocrine cells are discussed. Attention is drawn to the fact that in no case neurons were found in the islets in the rat pancreas.

Key words: *pancreas, autonomic innervation, parasympathetic ganglia, immunocytochemistry, pancreatic islets*

Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAMS North-Western Branch Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg

© Коллектив авторов, 2011
УДК 611.13.018.74:616.92

А.А. Байгильдина¹, А.И. Лебедева³ и В.Ш. Вагапова²

ВОЗМОЖНЫЕ ИСТОЧНИКИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В КРОВИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

¹ Кафедра биологической химии (зав. — проф. Ф.Х. Камиллов), ² кафедра анатомии человека (зав. — проф. В.Ш. Вагапова), Башкирский государственный медицинский университет; ³ отдел морфологии (зав. — проф. С.А. Муслимов), Всероссийский центр глазной и пластической хирургии, г. Уфа, e-mail: baigildinaasia@mail.ru, jeol02@mail.ru

Цель исследования — установление вероятных источников циркулирующих эндотелиоцитов (ЭЦ) в крови и оценка участия васкулярного эндотелиального (VE) кадгерина и сосудистого эндотелиального фактора роста (СЭФР) в молекулярном механизме десквамации ЭЦ на модели повреждения эндотелия при геморрагической лихорадке с почечным синдромом. Проводили гистологическое исследование кусочков почек, печени, легкого, большого мозга, желудка и миокарда, полученных на аутопсии 10 больных. Количество ЭЦ в периферической крови определяли методом J. Hladovec (1978). Концентрации VE-кадгерина и СЭФР определяли методом иммуноферментного анализа. Основными источниками ЭЦ являются крупные и мелкие сосуды почек, печени, слизистой оболочки желудка, миокарда и, вероятно, сосуды большого мозга. Одним из молекулярных механизмов слущивания ЭЦ является стимулируемая СЭФР интернализация VE-кадгерина.

Ключевые слова: *эндотелий, циркулирующие эндотелиоциты, васкулярный эндотелиальный кадгерин, сосудистый эндотелиальный фактор роста*

Эндотелий — это уникальное «эндокринное дерево», выстилающее все регионы сосудистой системы организма. Он играет ключевую роль в регуляции таких фундаментальных процессов, как гемостаз, тонус сосудов, ангиогенез, воспаление, макрофагальная активность и др. [2, 19]. Срок жизни эндотелиоцитов (ЭЦ) довольно велик — от 47 до 23 000 сут, и около 99% из них находятся в состоянии покоя, поэтому количество этих клеток в периферической крови чрезвычайно мало — в среднем не более 4–5 клеток/мл [11]. В настоящее время считается доказанным, что количество циркулирующих ЭЦ в перифериче-

ской крови служит показателем как структурной целостности внутренней выстилки сосудов, так и степени ее повреждения [4, 18]. Однако до сих пор остаются не выясненными два ключевых вопроса: какова органная локализация сосудов — преимущественных источников ЭЦ и каков молекулярный механизм слущивания последних [5, 18, 20]. В связи с этим с целью установления наиболее вероятных источников ЭЦ в крови нами проведено морфологическое изучение целостности эндотелия различных органов.

Материал и методы. Для оценки вовлеченности в молекулярный механизм десквамации ЭЦ васкулярного

эндотелиального кадгерина (VE-кадгерина) и сосудистого эндотелиального фактора роста (СЭФР) определяли их концентрацию в крови с последующим анализом степени корреляционной зависимости. В качестве модели для изучения повреждения интимы сосудов была выбрана геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), возбудителем которой является хантавирус серотипа *Puumala*. Этот выбор продиктован тем, что, как убедительно доказали ряд исследователей, ЭЦ являются главной мишенью хантавирусов [12, 17]. ГЛПС, выбранная в качестве модели повреждения эндотелия, имеет три формы течения — легкую, среднетяжелую и тяжелую (неосложненную и осложненную), при этом выделяют периоды лихорадки: олигоанурии, полиурии и восстановленного диуреза. В данной работе исследовали количество ЭЦ, концентрацию VE-кадгерина и СЭФР в крови при тяжелой форме с осложнениями, поскольку летальные случаи наблюдаются исключительно при этом варианте течения болезни, и для гистологического исследования нами мог быть использован только аутопсийный материал.

Работа одобрена экспертным советом по биомедицинской этике по клиническим дисциплинам ГОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет Росздрава». Для гистологического исследования использованы ткани почек, печени, большого мозга, легких, желудка и миокарда от 10 человек с серологически подтвержденным диагнозом ГЛПС в возрасте 38–44 лет (средний возраст 40 ± 3 года), умерших от ее осложнений в периоды олигоанурии и полиурии. Взятие материала проводили в Центральном патологоанатомическом отделении Городской клинической больницы № 13 г. Уфы и в патологоанатомическом отделении Республиканской клинической больницы им. Г.Г. Куватова не позднее, чем через 3 ч после наступления смерти. Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине и после обезживания заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы окрашивали по методу Маллори, по Ван-Гизону, гематоксилином–эозином. Микроскопические исследования проводили с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 5 Pascal (Carl Zeiss, Германия).

Количество ЭЦ в периферической крови, концентрации VE-кадгерина и СЭФР в сыворотке крови определены у 62 больных с серологически подтвержденным диагнозом ГЛПС в осложненной форме (55 мужчин и 7 женщин) в возрасте 22–65 лет (средний возраст 39 ± 3 года), находившихся на стационарном лечении в Инфекционной клинической больнице № 4 г. Уфы и в отделении гемодиализа Республиканской клинической больницы им. Г.Г. Куватова в 2003–2009 гг. Больные были информированы о цели исследования и от каждого из них получено согласие. Критериями исключения из исследования явились наличие в анамнезе гипертонической болезни, болезней сердца и сосудов, сахарного диабета, злокачественных заболеваний, заболеваний печени и почек. Группу контроля составили 23 практически здоровых человека, сопоставимых с обследованными больными по полу и возрасту. Кровь брали утром натощак в стандартных условиях. Первые 2 мл крови, которые могли содержать ЭЦ, слущившиеся в результате механического повреждения эндотелия иглой при венепункции, в исследовании не использовали. Количество ЭЦ в периферической крови определяли методом J. Hladovec [10], который основан на выделении ЭЦ вместе с тромбоцитами с последующим осаждением последних с помощью раствора аденозиндифосфата. Количество ЭЦ подсчитывали в камере Горяева с использованием фазово-контрастной микроскопии (микроскоп Микмед-6 вариант 7, ЛОМО, Россия) в 2 сетках камеры и выражали их количество в пересчете на 1 мл крови. Обнаруженные клетки имели диа-

метр 30–50 мкм, полигональную форму и были преимущественно безъядерными. Содержание VE-кадгерина и СЭФР в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с помощью коммерческих наборов фирмы Bender MedSystems (Австрия) и BioSource (Бельгия) соответственно. Абсорбцию света регистрировали с помощью микропланшетного ридера (Bench mark, Bio-Rad, США). Результаты обрабатывали с помощью стандартных статистических пакетов программ Statistica 7.0 for Windows: определяли медиану, интерквартильный интервал (25-й и 75-й процентиля); значимость межгрупповых различий средних величин оценивали по критерию U Манна — Уитни с поправкой Бонферрони; взаимосвязь двух признаков оценивали с помощью корреляционного анализа по Спирмену. Статистическая значимость принятия нуль-гипотезы была выбрана равной 0,05.

Результаты исследования. Количество ЭЦ в периферической крови в изучаемой модели повреждения эндотелия статистически значимо превышает контрольные значения, причем наиболее интенсивно ЭЦ слущиваются в периоды проявления болезни, при которых часто имеет место летальный исход (табл. 1). Различия содержания ЭЦ между периодами преимущественно статистически значимы.

Проведено изучение гистологической структуры сосудов различных органов с целью оценки структурной целостности их эндотелиальной выстилки. Морфологическое исследование выявило существенные различия в степени повреждения эндотелия сосудов исследуемых органов. В кровеносных сосудах коркового вещества почек имеют место интенсивная десквамация ЭЦ и обнажение базальной мембраны; в просвете сосудов определяются некротически измененные фрагменты клеток и тканей, форменные элементы крови, явления тромбоза (рисунок, а). На гистологических срезах печени просвет ветвей воротной вены расширен и заполнен мелкозернистым содержимым, вероятно, фибрином и тромбоцитами, эритроцитами и большим количеством слущившихся ЭЦ. Последние отделены от базальной мембраны, и располагаются как поодиночке, так и в виде целых пластов (см. рисунок, б); выявляются их деструктивные изменения. В средних, мелких артериях и артериолах, венах и венулах легких выявляется пристеночное стояние эритроцитов, а в капиллярах — их сладж; слущивания ЭЦ не выявлено (см. рисунок, в). В кровеносных сосудах большого мозга десквамация внутренней выстилки сосудов происходит частично (см. рисунок, г). Кровеносные сосуды собственной и мышечной пластинок слизистой оболочки желудка полностью лишены внутренней выстилки из-за интенсивной десквамации ЭЦ (см. рисунок, д). В приносящих кровеносных сосудах миокарда — артериях и артериолах имеются признаки активного слущивания как единичных ЭЦ, так и пла-

Количество эндотелиоцитов в периферической крови у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом при тяжелой форме с осложнениями на фоне базисной терапии (клетки/мл)

Контроль	Периоды болезни			
	лихорадки	олигоанурии	полиурии	восстановленного диуреза
4,0 [2,5; 5,5]	12,0* [10,0; 13,5]	15,0* [10,5; 17,0]	22,5*.*.*.# [18,0; 23,0]	4,0*.*.*.## [2,5; 6,0]

Примечание. Здесь и в табл. 2 различия значимы по сравнению с показателями: * в контроле; ** в период лихорадки; # в период олигоанурии; ## в период полинурии.

стов с фрагментами базальной мембраны (см. рисунок, е). В капиллярах и венах явления потери эндотелия не обнаружены.

Заключительный этап исследования был посвящен определению содержания VE-кадгерина и СЭФР в сыворотке крови. Концентрация VE-кадгерина остается по сравнению с контролем статистически значимо низкой на всем протяжении болезни, в то время как содержание СЭФР статистически значимо снижается только в первые два периода болезни. Различия содержания в крови определяемых субстанций между периодами статистически не значимы (табл. 2). Анализ корреляционной зависимости по Спирмену между содержанием VE-кадгерина и СЭФР показал преимущественно положительную взаимосвязь между этими показателями средней силы.

Обсуждение полученных данных. Многочисленные исследования последних лет убедительно продемонстрировали увеличение количества ЭЦ в периферической крови на различных моделях повреждения эндотелия, таких как сердечно-сосудистые, инфекционные, аутоиммунные заболевания, заболевания системы крови и др. [3, 6, 8, 14, 16]. По данным F. Dignat-Georgae и соавт., повреждение эндотелия при риккетсиозной и цитомегаловирусной инфекции сопровождается более высоким количеством слущив-

Таблица 1

шихся ЭЦ, чем при его повреждениях неинфекционного генеза [5]. Полученные нами результаты определения количества ЭЦ свидетельствуют об усиленной их десквамации при повреждении эндотелия хантавирусной этиологии, и их количество сопоставимо с таковым при риккетсиозной и цитомегаловирусной инфекциях. Электронно-микроскопическое исследование ЭЦ изучаемых органов позволило выявить в них многочисленные включения хантавирусов [1].

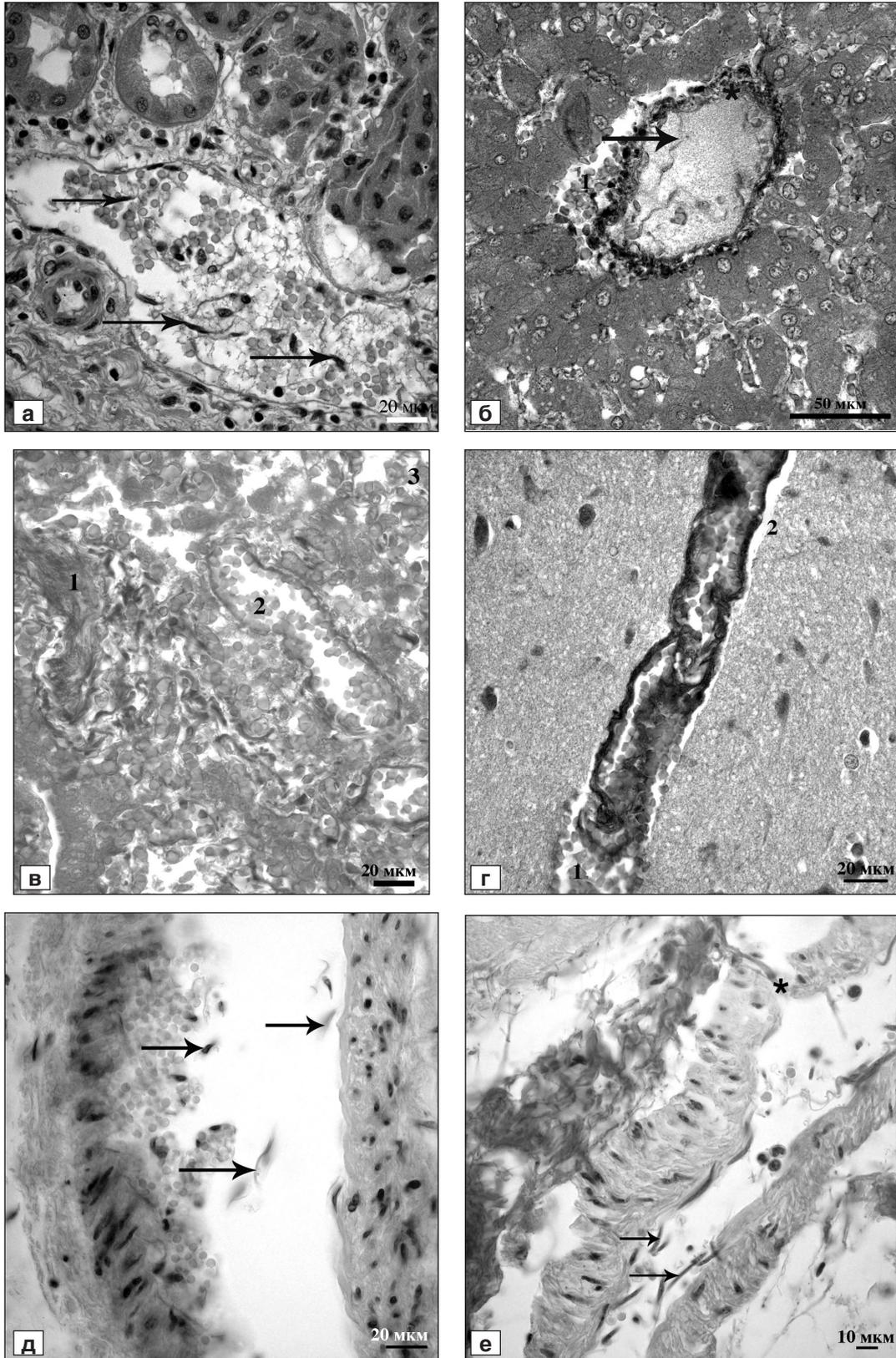
Морфологическое исследование степени повреждения внутренней выстилки сосудов различных органов и их сопоставление показало, что наиболее вероятными источниками ЭЦ при изучаемой модели является эндотелий гемокапилляров почек, ветвей воротной вены печени, сосудов слизистой оболочки желудка, артерий и артериол миокарда; вклад эндотелия гемокапилляров головного мозга в пополнение пула ЭЦ незначителен, а сосуды легких, капилляры и вены миокарда в этот процесс не вовлекаются. Возможно, при иных патологических состояниях источниками ЭЦ могут быть сосуды и других органов. Так, по данным, полученным с использованием меченых CD36, основным источником ЭЦ при серповидноклеточной анемии и опухолях являются только микрососуды [9, 15], в то время как при остром коронарном синдроме — крупные сосуды [16]. Это может быть связано с тем, что при этих заболеваниях, в отличие от вирусных инфекций, не происходит генерализованного вовлечения эндотелия в патогенез болезни.

Функцию формирования межклеточных соединений и обеспечения взаимодействия между ЭЦ выполняет VE-кадгерин. СЭФР способен стимулировать интернализацию этой адгезивной

Таблица 2

Концентрация васкулярного эндотелиального (VE) кадгерина и сосудистого эндотелиального фактора роста (СЭФР) в сыворотке крови у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом при тяжелой ее форме с осложнениями на фоне базисной терапии и коэффициенты ранговой корреляции между ними по Спирмену (R)

Исследованные показатели	Контроль	Периоды болезни			
		лихорадки	олигоанурии	полиурии	восстановленного диуреза
Содержание:					
VE-кадгерина, нг/мл	1,07 [1,025; 1,08]	0,75* [0,64; 0,86]	0,66* [0,57; 0,8]	0,52* [0,31; 0,61]	0,34* [0,16; 0,36]
СЭФР, пг/мл	67,0 [43,4; 77,4]	50,5* [30,2; 73,2]	52,4* [36,0; 68,0]	68,9 [49,2; 59,4]	64,2 [57,4; 75,2]
Коэффициент ранговой корреляции, R	—	+0,5	+0,5	+0,6	-0,4



Кровеносные сосуды у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом.

а — междольковая вена в корковом веществе почки. Стрелки — слущившиеся эндотелиоциты (ЭЦ); б — ветвь воротной вены печени. Стрелка — слущившиеся ЭЦ; звездочка — обнаженный участок базальной мембраны; 1 — кровоизлияние в перивазальное пространство; в — сосуды легкого. 1 — суженная артериола; 2 — пристеночное стояние эритроцитов в венуле; 3 — сдвиг эритроцитов в капиллярах; г — артериола коры большого мозга. 1 — кровоизлияние; 2 — отек перивазального пространства; д — артерия слизистой оболочки желудка. Стрелки — слущившиеся ЭЦ; е — артерия миокарда. Звездочка — разрыв сосуда; стрелки — слущившиеся ЭЦ. Окраска: а, д — гематоксилином — эозином; б-г — по Маллори; е — по Ван-Гизону.

молекулы [7], что способствует ослаблению межклеточных контактов в эндотелии сосудов с последующей десквамацией его клеток в сосудистое русло. Статистически значимо низкое содержание VE-кадгерина в сыворотке крови при исследуемой модели повреждения эндотелия и преимущественно положительная корреляционная взаимосвязь между содержанием этой адгезивной молекулы и СЭФР в крови позволяют предположить, что одной из причин усиленного слущивания является стимулированный СЭФР эндоцитоз кадгерина. Это, с одной стороны, способствует удалению поврежденных ЭЦ, а с другой — препятствует персистенции хантавируса в клетках эндотелия сосудов. Такой ответ на стимуляцию СЭФР наблюдается при повреждении эндотелия возбудителями хантавирусного легочного синдрома и не характерен для эндотелиопатии, ассоциированной с хантавирусом других серотипов [13].

Таким образом, на изученной модели при повреждении эндотелия, вызванном хантавирусом выявленного нами серотипа *Puumala*, основными источниками ЭЦ являются как крупные, так и мелкие сосуды почек, печени, слизистой оболочки желудка, миокарда. Одним из молекулярных механизмов интенсивного слущивания ЭЦ при этом, по-видимому, является стимулируемая СЭФР интернализация VE-кадгерина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Байгильдина А.А. и Лебедева А.И. Ультраструктурные изменения эндотелия сосудов различных органов и регуляторные факторы фибринолиза при осложненном течении геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Мед. вестн. Башкортостана, 2010, т. 5, № 6, с. 54–59.
2. Банин В.В. и Алимов Г.А. Эндотелий как метаболически активная ткань (синтетические и регуляторные функции). Морфология, 1992, т. 102, вып. 2, с. 10–32.
3. Bull T.M., Golpon H., Hebbel R.P. et al. Circulating endothelial cells in pulmonary hypertension. *Thromb. Haemost.*, 2003, v. 90, № 4, p. 698–703.
4. Dignat-George F. and Sampol J. Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept. *Eur. J. Haematol.*, 2000, v. 65, № 4, p. 215–220.
5. Dignat-George F., Sampol J., Lip G. and Blann F.D. Circulating endothelial cells: realities and promises in vascular disorders. *J. Pathophysiol. Haemost. Thromb.*, 2004, v. 279, № 33, p. 495–499.
6. Gascoigne A., Gillespie J.I. and Baudouin S.V. Circulating endothelial cells in patients with septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001, v. 163, № 1, p. 195–200.
7. Gavard J. and Gutkind J.S. VEGF controls endothelial cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat. Cell Biol.*, 2006, v. 8, № 11, p. 1223–1234.
8. Grefte A., Van Der Giessen M. and Van Son W. The circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J. Infect. Dis.*, 1993, v. 167, № 7, p. 270–277.
9. Hebbel R.P. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N. Engl. J. Med.*, 1997, v. 337, № 22, p. 1584–1590.
10. Hladovec J. Circulating endothelial cells as a sign of vessel wall lesions. *Physiol. Bohemoslov.*, 1978, v. 27, № 2, p. 140–144.
11. Hobson B. and Denekamp J. Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br. J. Cancer*, 1984, v. 49, № 4, p. 405–413.
12. Kanerva M., Mustonen J. and Vaehri A. Pathogenesis of Puumala and other hantavirus infections. *Rev. Med. Virol.*, 1998, v. 8, № 2, p. 67–86.
13. Mackow E. R. and Gavrilovskaya I. N. Hantavirus regulation of endothelial cell functions. *Thromb. Haemost.*, 2009, v. 102, № 6, p. 1030–1041.
14. Makin A., Chung N., Silverman S.H. et al. Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells. *Eur. Heart J.*, 2004, v. 25, № 5, p. 371–376.
15. Martinelli G. and Bertolini F. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood*, 2001, v. 97, № 11, p. 3658–3661.
16. Mutin M., Canavy I., Blann A. et al. Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood*, 1999, v. 93, № 9, p. 2951–2958.
17. Peters C.J. and Zaki S.R. Role of the endothelium in viral hemorrhagic fevers. *Crit. Care Med.*, 2002, v. 30, № 5 (suppl), p. 268–273.
18. Rajec J., Tisonova J., Kriska M. et al. Endothelaemia — a marker of vascular damage. *Bratisl. Lek. Listy*, 2007, v. 108, № 9, p. 403–405.
19. Valbuena G. and Walker D.H. The endothelium as a target for infections. *Annu. Rev. Pathol.*, 2006, v.1, № 1, p.171–198.
20. Woywodt A., Bahlmann F.H., De Groot K. et al. Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2002, v. 17, № 10, p. 1728–1730.

Поступила в редакцию 27.03.2011
Получена после доработки 05.04.2011

PROBABLE SOURCES OF ENDOTHELIAL CELLS CIRCULATING IN BLOOD

A.A. Baygildina, A.I. Lebedeva and V.Sh. Vagapova

The aim of study was to determine the probable sources of circulating endothelial cells (CECs) and establish the role of both VE-cadherin and vascular endothelial growth factor (VEGF) in molecular mechanism of endothelium desquamation using the hemorrhagic fever with renal syndrome as the model of endothelium injury. Autopsy pieces of kidney, liver, lung, brain, stomach and myocardium taken from 10 patients were studied histologically. Quantitative measurement of CECs was performed by the method developed by J. Hladovec (1978). Blood levels of VE-cadherin and VEGF were determined by ELISA method. Predominant sources CECs were found to be macro- and microvessels of kidney, liver, lung, brain, gastric mucous membrane, myocardium and, possibly — brain vessels. One of the molecular mechanism of endothelium desquamation is VEGF-stimulated internalization of VE-cadherin.

Key words: *endothelium, circulating endothelial cells, VE-cadherin, vascular endothelial growth factor*

Department of Biochemistry, Department of Human Anatomy, Bashkir State Medical University, Ufa; Department of Morphology, All-Russian Center of Eye and Plastic Surgery, Ufa