

Ю.С. Кривова, В.М. Барабанов, Е.С. Савельева и С.В. Савельев

## НЕЙРОЭНДОКРИННЫЕ КОМПЛЕКСЫ В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ НУТРИИ (MYOCASTOR COYRUS) (ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Лаборатория развития нервной системы (зав. — проф. С.В. Савельев) Научно-исследовательского института морфологии человека РАМН, Москва; e-mail: homulkina@gmail.com

Использование методики двойного иммуногистохимического маркирования выявило в поджелудочной железе нутрии несколько типов нейроэндокринных взаимоотношений. Обнаружены нейроинсулярные комплексы двух типов, которые имеют типичную для млекопитающих организацию. Для нутрии характерно объединение нескольких панкреатических островков с нейронами и нервными волокнами. Выявленные комплексы, отражающие взаимодействия нервных элементов с отдельными эндокриноцитами и их группами видоспецифичны. Полученные данные демонстрируют разнообразие нейроэндокринных взаимоотношений в поджелудочной железе и, вероятно, возможность влияния нервной системы на дифференцировку В-клеток.

**Ключевые слова:** поджелудочная железа, нейроинсулярный комплекс, периферин, нутрия.

Нервные элементы и эндокриноциты в поджелудочной железе млекопитающих могут быть интегрированы друг с другом в сложные комплексы, которые были названы нейроинсулярными комплексами. Т. Fujita выделил 2 типа таких комплексов [4]. В электронно-микроскопических и иммуногистохимических исследованиях достаточно полно изучена структура нейроинсулярных комплексов некоторых млекопитающих [1, 4–9]. Комплексы I типа представляют собой панкреатические островки — ПО (Лангерганса), ассоциированные с телами ганглионарных нейронов и нервными волокнами. Тела нейронов в этих комплексах локализованы под соединительнотканной оболочкой, покрывающей ПО, и контактируют с эндокриноцитами [7]. В нейроинсулярных комплексах II типа тела ганглионарных нейронов отсутствуют. Нервные волокна подходят к ПО, разветвляются и образуют на его периферии тонкую сеть [8]. Отдельные нервы проникают внутрь ПО и проходят между эндокриноцитами [8]. Функциональная роль нейроинсулярных комплексов до конца не ясна [6]. Для понимания этой роли необходимы детальные сведения об организации нейроэндокринных взаимоотношений и их формировании в эмбриональном развитии и при образовании новых ПО у половозрелых особей. Однако подробных исследований организации нейроэндокринных комплексов крайне мало.

С использованием гистологических методов и электронной микроскопии было показано, что в поджелудочной железе нутрии (*Myocastor coyrus*) обильно представлены нейроинсулярные комплексы I и II типа [5]. Применение иммуногистохимических методов с использованием

маркеров к таким антигенам нервной системы, как SNAP-25 и NCAM, позволило установить наличие в поджелудочной железе нутрии диффузной нервной сети [1]. Эта сеть представлена тонкими нервными волокнами и мелкими одиночными нейронами с отростками [1]. Кроме того, в поджелудочной железе нутрии имеется большое количество эндокриноцитов, не входящих в состав ПО. Сведения об их иннервации отсутствуют.

Цель настоящей работы — иммуногистохимическое исследование структуры крупных нейроэндокринных комплексов, а также выявление и изучение иннервации одиночных эндокриноцитов и их скоплений, диффузно распределенных в экзокринной части поджелудочной железы.

**Материал и методы.** В работе исследована поджелудочная железа двух нутрий (*Myocastor coyrus*). Животных наркотизировали путем внутривенного введения 0,9 мл 2% раметара в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Целую поджелудочную железу фиксировали в жидкости Буэна, кусочки заливали в парафин и готовили срезы толщиной 10 мкм.

В работе использовали антитела к гормонам поджелудочной железы и некоторым антигенам нервной системы: поликлональные антитела морской свинки к инсулину (Dako, Дания, 1:50–1:150); мышинные моноклональные антитела к глюкагону (Sigma, США, 1:1000–1:2000); мышинные моноклональные антитела к периферину (Novocastra, Великобритания, 1:100–1:200); кроличьи поликлональные антитела к S-100 (Sigma, США, 1:80). Негативным контролем служили реакции с заменой первых антител раствором для их разведения (Dako, Дания). При проведении иммуногистохимических реакций депарафинированные, гидратированные срезы обрабатывали 3% раствором  $H_2O_2$  в течение 20 мин для блокирования эндогенной пероксидазы.

Выявление инсулина, глюкагона и белка S-100 проводили с использованием стандартной иммунопероксидазной реакции. Срезы инкубировали с первыми антителами во влажной камере при температуре 8 °С 18–20 ч. Со вторыми антителами [HRP (пероксидаза хрена) к антигенам морской свинки IgG, Sigma, США, 1:400; HRP-F(ab')<sub>2</sub> к антигенам мыши IgG, Zymed, Бельгия, 1:1000; HRP-F(ab')<sub>2</sub>-к антигенам кролика IgG, Zymed, Бельгия, 1:500] срезы инкубировали в течение 1 ч при 37 °С.

При проведении реакций на периферин срезы подвергали высокотемпературной обработке в 0,01M цитратном буфере (рН 6,0) в течение 1 мин. С антителами к периферину срезы инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и затем применяли высокочувствительную систему визуализации CSA-II (Dako, Дания).

На заключительном этапе срезы обрабатывали раствором диаминобензидина (ДАБ, Sigma, США) в 0,05M трис-HCl-буферном растворе, рН 7,6, содержащем 0,02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Для исследования организации нейроэндокринных комплексов применяли методику двойного иммуногистохимического мечения на серийных срезах. В работе использованы 2 серии по 20 срезов (толщиной 10 мкм). Одну серию срезов маркировали антителами к периферину и инсулину, другую — антителами к периферину и глюкагону. При проведении реакций на первом этапе проводили выявление периферина указанным выше способом. В качестве хромогена применяли раствор ДАБ, содержащий 0,3% NiCl<sub>2</sub>. На втором этапе с помощью стандартной иммунопероксидазной реакции выявляли эндокриноциты поджелудочной железы. В качестве хромогена использовали раствор ДАБ без добавления NiCl<sub>2</sub>.

**Результаты исследования.** Иммуногистохимические реакции на гормоны поджелудочной железы (инсулин, глюкагон) показали, что ее эндокринная часть у нутрии представлена оформленными ПО, а также отдельными эндокриноцитами и их небольшими скоплениями, диффузно распределенными в экзокринной части железы.

Позитивная реакция на периферин выявлена в нервных ганглиях и нервных волокнах различного диаметра. Крупные пучки нервных волокон проходят в соединительнотканной капсуле железы. Тонкие нервы встречаются в междольковой соединительной ткани, среди ацинусов, а также в мышечных оболочках кровеносных сосудов. К ПО подходят нервы различного диаметра. Вегетативные нервные ганглии состоят из групп крупных клеток, окруженных соединительнотканной капсулой, и располагаются как в междольковой соединительной ткани, так и внутри долек.

Применение методики двойного иммуногистохимического мечения позволило показать, что элементы периферической нервной системы образуют 2 типа комплексов с оформленными ПО. В нейроинсулярных комплексах I типа эндокриноциты интегрированы с телами ганглионарных нейронов и их отростками (рис. 1, а). Тела нейронов могут

быть локализованы вместе с эндокриноцитами под соединительнотканной оболочкой, окружающей ПО, а также в ацинарной паренхиме вблизи ПО (см. рис. 1, а). В нейроинсулярных комплексах II типа эндокриноциты ассоциированы только с нервными волокнами (см. рис. 1, б, в). Нервные волокна подходят к ПО самостоятельно или вдоль сосудов и образуют сеть на периферии ПО (см. рис. 1, б, в). Отдельные нервы проникают внутрь ПО и проходят между эндокриноцитами. Внутри ПО выявлены нервные волокна, подходящие как к В-, так и к А-эндокриноцитам (рис. 2, а).

Анализ серийных срезов позволил выявить ряд деталей организации нейроэндокринных взаимоотношений в поджелудочной железе. Обнаружены сложные нейроэндокринные комплексы, в которых несколько ПО и отдельные эндокриноциты объединены друг с другом сетью нервных волокон (см. рис. 1, б). В ряде случаев выявлены нервные ганглии, интегрированные с двумя ПО. Иннервация ПО может осуществляться короткими нервными волокнами, идущими от нервного ганглия, расположенного вблизи ПО (см. рис. 1, в).

Наряду с иннервацией оформленных ПО, установлено наличие иннервации одиночных как В-, так и А-эндокриноцитов, и их небольших скоплений, диффузно распределенных в экзокринной части железы (см. рис. 2, б). В редких случаях выявлены одиночные эндокриноциты и их небольшие скопления, интегрированные с 1–2 нейронами (см. рис. 2, в).

При маркировании антителами к S-100 наблюдается позитивная реакция в нервных ганглиях, крупных пучках нервных волокон, а также в ПО. Наиболее интенсивная реакция на этот белок выявлена в глиоцитах нервных ганглиев (рис. 3). В цитоплазме нейронов и в нервных волокнах реакция на S-100 была менее интенсивной. В ПО выявлены S-100-позитивные клетки (см. рис. 3). По морфологическим признакам и интенсивности реакции эти клетки сходны с глиоцитами, присутствующими в вегетативных ганглиях поджелудочной железы. Кроме того, ПО окружены тонкой прерывистой оболочкой, дающей положительную реакцию на белок S-100. В ряде случаев видно, что эта оболочка образована отростками S-100-позитивных клеток, локализованных на периферии ПО (см. рис. 3).

**Обсуждение полученных данных.** В поджелудочной железе нутрии выявлены нейроинсулярные комплексы I и II типа, характерные для млекопитающих [1, 4–9]. Однако наше исследование показало, что, помимо этих комплексов,

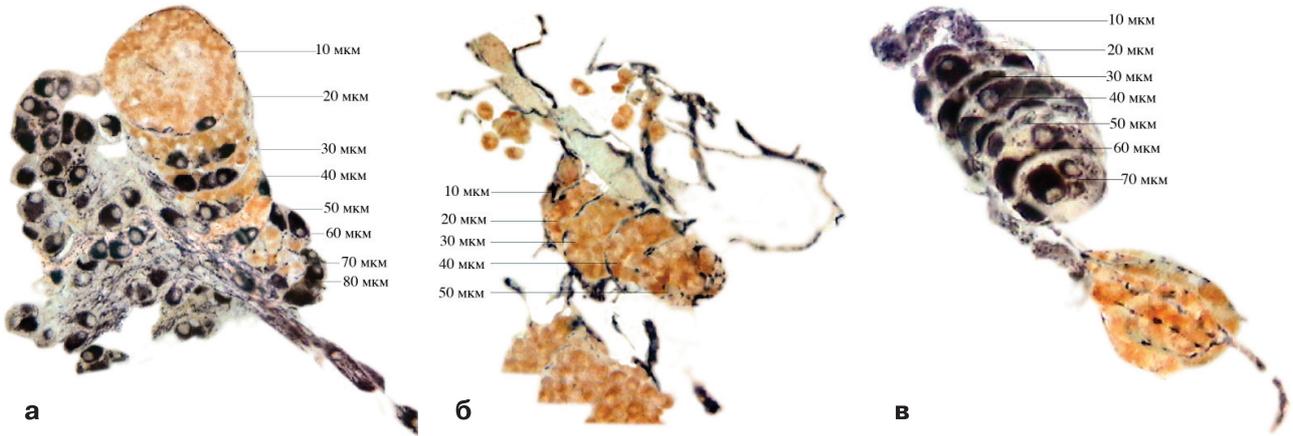


Рис. 1. Нейроинсулярные комплексы в поджелудочной железе нутрии.  
 а — нейроинсулярный комплекс I типа; б, в — нейроинсулярные комплексы II типа. Реконструкции, выполненные с использованием серийных срезов, маркированных антителами к периферину и инсулину.

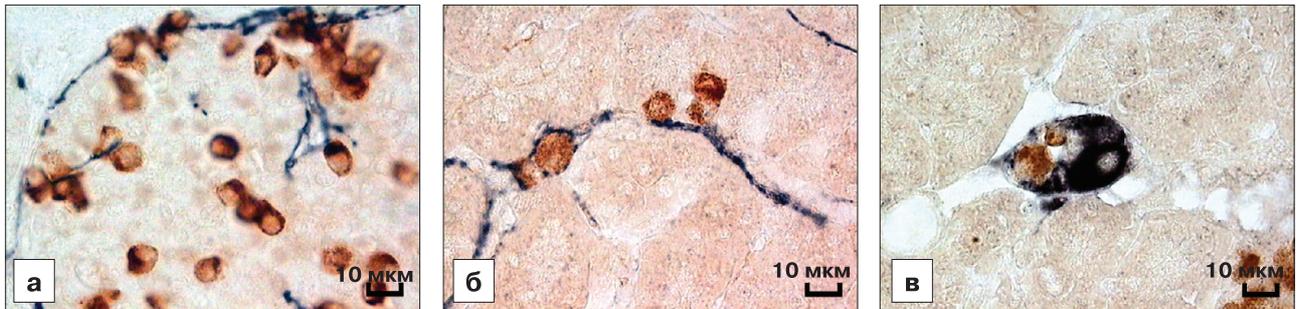


Рис. 2. Нейроэндокринные взаимоотношения в поджелудочной железе нутрии.  
 а — нервные волокна, подходящие к А-эндокриноцитам в панкреатическом островке; б — нервные волокна, подходящие к В-эндокриноцитам, не входящим в состав панкреатических островков; в — отдельные В-эндокриноциты, интегрированные с нейронами. Маркирование антителами к периферину и гормонам поджелудочной железы (инсулину, глюкагону).

в поджелудочной железе нутрии существуют и другие формы интеграции нервной системы с эндокринной частью железы.

Во-первых, это комплексы, состоящие из нескольких ПО и отдельных эндокриноцитов, связанных друг с другом нервными волокнами или объединенных с одним нервным ганглием. Во-вторых, это взаимоотношения между элементами периферической нервной системы и отдельными эндокриноцитами и их небольшими группами, не входящими в состав ПО. Подобные взаимоотношения могут являться одной из форм нейроэндокринных комплексов, характерных для поджелудочной железы нутрии. Возможно также, что они представляют собой начальные этапы образования крупных нейроинсулярных комплексов I и II типа.

Выявленное разнообразие форм взаимоотношений элементов периферической нервной системы с эндокриноцитами предполагает существование взаимодействий между ними и возмож-

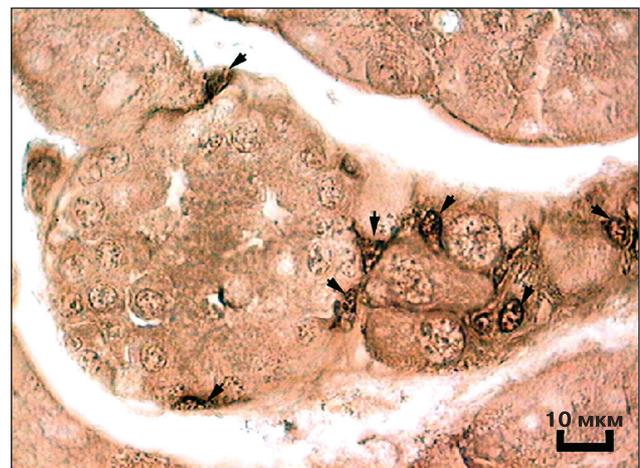


Рис. 3. Глиоциты (стрелки) в нервном ганглии и на периферии панкреатического островка.  
 Реакция на белок S-100.

ность участия нервной системы в регуляции эндокринных функций поджелудочной железы. Представление о регуляторной роли нервной системы в эндокринной секреции является наиболее распространенным в настоящее время [2]. Не исключено, что существуют взаимодействия между нервной системой и эндокриноцитами, которые влияют не только на секреторную активность, но и на дифференцировку В-клеток. Можно предположить, что активный морфогенез отростков периферических нейронов формирует сигнал, который запускает эту дифференцировку. В поджелудочной железе нутрии могут существовать и другие варианты нейроэндокринных комплексов, не описанные в настоящем исследовании. При сравнении экспрессии периферина в нервных элементах поджелудочной железы с ранее полученными данными по экспрессии SNAP-25 [1] обнаружены различия в распределении этих маркеров. Количество тонких периферин-позитивных нервных волокон в ткани железы меньше, чем SNAP-25-позитивных нервных волокон. При маркировании антителами к периферину не обнаруживаются мелкие нейроны, выявляемые при реакциях на SNAP-25. Возможно, эти различия связаны с отсутствием экспрессии периферина в диффузной нервной сети поджелудочной железы, состоящей из мелких одиночных нейронов и их отростков. SNAP-25 является более универсальным маркером, позволяющим наиболее полно выявлять нервные элементы. Однако позитивная реакция на SNAP-25 в эндокриноцитах затрудняет изучение нейроэндокринных комплексов при использовании этого белка в качестве маркера.

ПО у нутрии [1], как и у ряда других млекопитающих [3, 8], окружены тонкой прерывистой оболочкой, образованной шванновскими клетками и их отростками. Данные об экспрессии белка S-100 в ПО подтверждают наличие этой оболочки.

Полученные результаты демонстрируют разнообразие форм интеграции периферической вегетативной нервной системы с эндокринной частью поджелудочной железы. Выявлены 4 типа нейроэндокринных взаимоотношений: 1) нейроинсулярные комплексы I типа; 2) нейроинсулярные комплексы II типа; 3) комплексы, состоящие из нескольких ПО и отдельных эндокриноцитов, интегрированных с нервными элементами; 4) взаимоотношения нервных элементов с отдельными эндокриноцитами, не входящими в состав ПО. В проведенном исследовании получено подтверждение существования глиальной оболочки вокруг ПО, а также обнаружены различия в экспрессии

периферина и SNAP-25 в иннервационном аппарате поджелудочной железы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кривова Ю.С., Барабанов В.М., Савельева Е.С. и Савельев С.В. Иммуногистохимическое выявление SNAP-25, NCAM и инсулина в поджелудочной железе нутрии (*Myocastor coypus*). Бюл. eksper. биол., 2007, т. 144, № 11, с. 582–585.
2. Ahrén B. Autonomic regulation of islet hormone secretion — implications for health and disease. *Diabetologia*, 2000, v. 43, № 4, p. 393–410.
3. Donev S. Ultrastructural evidence for presence of a glial sheath investing the islets of Langerhans in the pancreas of mammals. *Cell Tiss. Res.*, 1984, v. 237, № 2, p. 343–348.
4. Fujita T. Histological studies on the neuro-insular complex in the pancreas of some mammals. *Z. Zellforsch.*, 1959, Bd. 50, S. 94–109.
5. Kern H.F., Hofmann H.V. and Kern D. Light and electron microscopic studies of the islets of Langerhans in nutria (*Myocastor coypus*) with special reference to neuro-insular complexes. *Z. Zellforsch.*, 1971, Bd. 113, № 2, S. 216–229.
6. Persson-Sjögren S. Neuroinsular complex type I: morphology and frequency in lean and genetically obese mice. *Pancreas*, 2001, v. 33, № 6, p. 373–378.
7. Persson-Sjögren S., Zashihin A. and Forsgren S. Nerve cells associated with the endocrine pancreas in young mice: an ultrastructural analysis of the neuroinsular complex type I. *Histochem. J.*, 2001, v. 33, № 6, p. 373–378.
8. Sunami E., Kanazawa H., Hashizume H. et al. Morphological characteristics of Schwann cells in the islets of Langerhans of the murine pancreas. *Arch. Histol. Cytol.*, 2001, v. 64, № 2, p. 191–201.
9. Watanabe S., Wakuri H. and Mutoh K. Histological studies on the endocrine pancreas in the dog. *Anat. Histol. Embryol.*, 1989, v. 18, № 2, p. 150–156.

Поступила в редакцию 11.11.08

#### NEUROENDOCRINE COMPLEXES IN THE PANCREAS OF NUTRIA (*MYOCASTOR COYPUS*) (AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY)

*Yu.S. Krivova, V.M. Barabanov, Ye.S. Savelyeva and S.V. Savelyev*

With the application of a double immunohistochemical labeling method, several types of neuroendocrine interactions were demonstrated in the pancreas of nutria. Two types of neuroinsular complexes were detected that have the organization typical to the mammals. It was found to be typical of nutria that several pancreatic islets were integrated with nerve cells and nerve fibers. The complexes detected that reflect the interactions between nervous elements and single endocrine cells or their small groups, are species-specific. The data obtained demonstrate the diversity of neuroendocrine interactions in the pancreas and possible influence of the nervous system on B-cell differentiation.

**Key words:** *pancreas, neuroinsular complex, peripherin, nutria.*

Laboratory of the Nervous System Development, RAMS Institute of Human Morphology, Moscow.