

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2012

УДК 616.34-007.43-031:031:611.956:612.741.16

**ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ
ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РЫБ (*Pisces*)**

Е.С. Савельева, А.Е. Процина, С.В. Савельев

ФГБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» РАМН, г. Москва

Проведено иммуногистохимическое исследование иннервации поджелудочной железы шести видов рыб (22 особей) – акула кошачья коричневополосая (*Ch. punctatum* Müller and Henle, 1838), скат хвосток речной глазчатый (*P. motoro* Müller & Henle, 1841), стерлядь (*A. ruthenus* L., 1758), угорь речной (*A. anguilla* L., 1758), радужная форель (*S. irideus* L., 1758), щука обыкновенная (*E. lucius* L., 1758). Использовались антитела к глюкагону (Lab Vision) и инсулину (Sigma) – для выявления эндокринного компонента поджелудочной железы, нейрон специфической эналазе (Lab Vision), нейрон специфическому β -III тубулину (Abcam), S-100 (Lab Vision), синаптофизину (Abcam) и нейропептиду Y (Abcam) – для выявления иннервации в железе. Полученные результаты свидетельствуют о наличии двух типов регуляции активности эндокринных и экзокринных клеток. Архаичный механизм построен на прямой регуляции со стороны периферической нервной системы. Другой механизм построен на том, что эндокринные клетки приобрели способность влиять на дифференцировку окружающей ткани за счёт синтеза сигнальных нейропептидов.

Ключевые слова: рыбы, поджелудочная железа, иммуногистохимия, нервная система, нейропептиды.

Исследование организации нейроэндокринного аппарата поджелудочной железы (ПЖ) человека и животных представляет собой одну из актуальных проблем современной морфологии и физиологии углеводного обмена [1, 2, 12]. В настоящее время известно, что в иннервации участвуют парасимпатические, симпатические и сенсорные нервные окончания. Предполагается, что симпатическая нервная система вовлечена в регулировку размеров островков [8] и запускает секрецию гормонов в островке. Было установлено нервное регулирование островка нейропептидами [4, 13]. Однако, эволюционное происхождение различных механизмов регуляции активности эндокринных клеток со стороны нервной системы до настоящего времени не нашло объяс-

нения. Для решения этой проблемы необходимы исследования происхождения иннервации ПЖ у низших позвоночных.

При исследовании ПЖ рыб было выявлено большое разнообразие типов строения как самой железы, так и эндокринной ткани [3, 14]. Исследования иннервации ПЖ рыб в основном посвящены изучению нейропептидов [6]. Так, в работе Pana J.-Z. et al. в 1992 году детально описана структура и локализация НPY в островках, экзокринной ткани и в эпителии протоков ПЖ катрана (*Squalus acanthias*) [10]. При этом работы по исследованию нервного аппарата ПЖ рыб крайне малочисленны и являются сопутствующими к основным исследованиям [9, 11]. Таким образом, вопрос о происхождении иннервации эндокринной части

ПЖ первичноводных животных, в частности рыб, остается актуальным и в настоящее время.

Материалы и методы

В работе нами были использована ткань ПЖ 22 экземпляров следующих видов рыб: акула кошачья коричневополосая (*Ch. punctatum* Müller and Henle, 1838), скат хвостокор речной глазчатый (*P. motoro* Müller & Henle, 1841), стерлядь (*A. ruthenus* L., 1758), угорь речной (*A. anguilla* L., 1758), радужная форель (*S. irideus* L., 1758), щука обыкновенная (*E. lucius* L., 1758).

Эвтаназия животных проводилась согласно международным правилам [5, 7]. Для изучения иннервации эндокринной ткани ПЖ было предпринято иммуногистохимическое исследование на смежных срезах (5-10 мкм) по выявлению моноклональными и поликлональными антителами инсулина, глюкагона, нейронспецифической энолазы (NSE), β -III тубулина, S-100, синаптофизина и нейропептида Y (NPY). Список использованных антител, их разведения и иммунореактивность представлены в таблице 1.

антитела виды рыб	β -III тубулин Abcam (1:500)	NSE Abcam (1:400)	Синаптофизин Abcam (1:650)	NPY Abcam (1:500)	S-100 Lab Vision (1:150)	к Инсулину Морск. свинки Sigma (1:300)	к Глюкагону Кролик поликл. Lab Vision(1:100)
акула (<i>Ch. Punctatum</i>)	+	+	+	+	+	+	+
скат (<i>P. motoro</i>)	+	+	+	+	-	+	+
стерлядь (<i>A.ruthenus</i>)	+	+	+	+	+	+	+
угорь (<i>A. anguilla</i>)	+	-	+	+	+	+	+
форель (<i>S. Irideus</i>)	+	+	+	+	-	+	+
щука (<i>E. Lucius</i>)	+	-	+	+	+	+	+

Результаты и обсуждение

Сравнительное исследование морфофункциональной организации ПЖ рыб показало основные эволюционные этапы становления её нервного аппарата. Наиболее архаичной конструкцией обладает ПЖ акул. Гистологическое и иммуногистохимическое исследования ПЖ акулы (*Ch. punctatum*) позволили установить, что железа имеет паренхиматозное строение, в ней нет ясных границ и четко выраженной базальной мембраны вокруг скопленных экзокринных клеток. Эндокринная ткань представлена отдельными клетками, образующими эндокринные поля. Исследование реактивности ПЖ акулы к ней-

рон-специфической энолазе (NSE) выявило экспрессию маркера в зонах локализации секретирующих эндокринных клеток (Рис. 3, Б1). Также наблюдается позитивная реакция в зоне эндокринных протоков, в стенках артериол и венул. Иммунопозитивная реакция на β -III тубулин (Рис. 1, А) выявлена в нервах и нервных окончаниях, окружающих артериолы, а также в единичных нервных клетках, локализованных к эндокринной паренхиме. Иммунопозитивная реакция с антителами к S-100 и NPY также наблюдалась в оболочке ПЖ и стенках артериол. Таким образом, у этой группы животных собственный нервный аппарат поджелудочной железы

отсутствует, однако наблюдается некоторое количество, вероятно, эмбрионально депонированных, нервных клеток. Функцию иннервации органа выполняют нервные волокна, проникающие как в эндокринную, так и экзокринную части железы в составе сосудисто-нервных пучков, ха-

рактерных для всех позвоночных. Войдя в железу вместе с артериолами, эти волокна формируют локальные зоны иннервации, которые не имеют выраженных контактов ни с эндокринными, ни с экзокринными клетками.

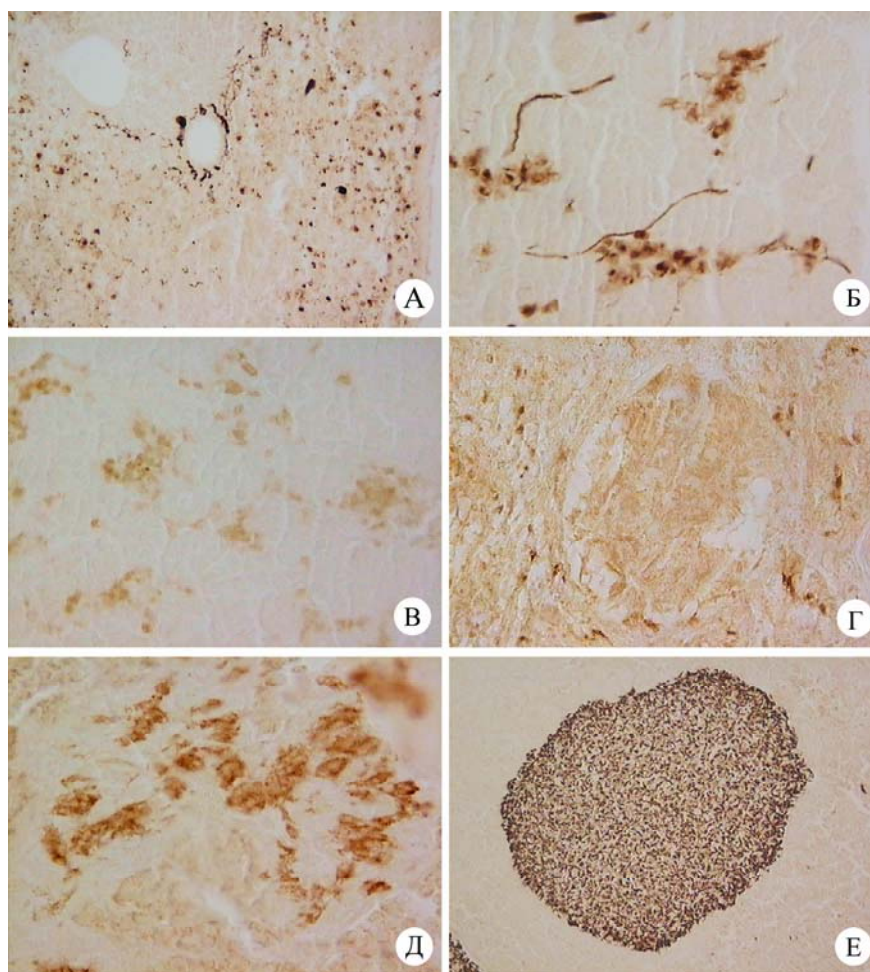


Рис. 1. Иммуногистохимическая реакция с антителами к β -III Тубулину в поджелудочной железе рыб: А – акулы (*Ch. punctatum*) x 20; Б – ската (*P. motoro*), В – стерляди (*A. ruthenus*), Г – угря (*A. anguilla*), Д – форели (*S. irideus*), Е – щуки (*E. lucius*) x 40

У стерляди наблюдается столь же архаичный вариант иннервации железы. Заметным отличием от акулы является незначительное связывание нейтральных маркёров с эндокринными скоплениями клеток, что характерно для млекопитающих. У стерляди обнаружены не паренхи-

матозные скопления экзокринных и эндокринных клеток, а полноценные островки Лангерганса и ацинарная ткань с выраженными протоками. При этом нервный аппарат представляет собой разветвления волокон, отделившихся от сосудисто-нервного пучка, как и у акул. Имму-

ногистохимическая реакция с антителами к нейрон-специфическому β -III тубулину выявлена в нервах и их отростках, принадлежащих сосудам и капиллярам, также наблюдалась слабая реактивность эндокринных кластеров и отдельных клеток (рис. 1, В). Однако в островках реакция на антитела к β -III тубулину была негативной. Иммуногистохимическая реактивность в ПЖ стерляди к антителам S-100 была выявлена в единичных клетках и нервных окончаниях, окружающих островки и артериолы (рис. 3, В3). Иммуногистохимическое окрашивание антителами к NPY (рис. 2, Б) было позитивным в нервах и их отростках в ацинарной ткани, а также в зонах локализации глюкагон- и соматостатин-позитивных клеток.

В результате гистологического исследования ПЖ ската установлено, что эндокринная ткань представлена ленто-видными островками и кластерами клеток. Иммунопозитивная реакция с антителами к S-100 (рис. 3, В1) наблюдалась как в нервах между ацинусов, так и вдоль сосудов и капилляров, пронизывающих поджелудочную железу ската. Иммуногистохимическая реакция с антителами к NPY (рис. 2, А) выявлена в зонах локализации глюкагон-позитивных клеток и нервных окончаниях. Иммуногистохимическая реакция с антителами к нейрон-специфическому β -III тубулину (рис. 1, Б) выявлена в нервах и их отростках, находящихся в эндокринной ткани ПЖ ската.

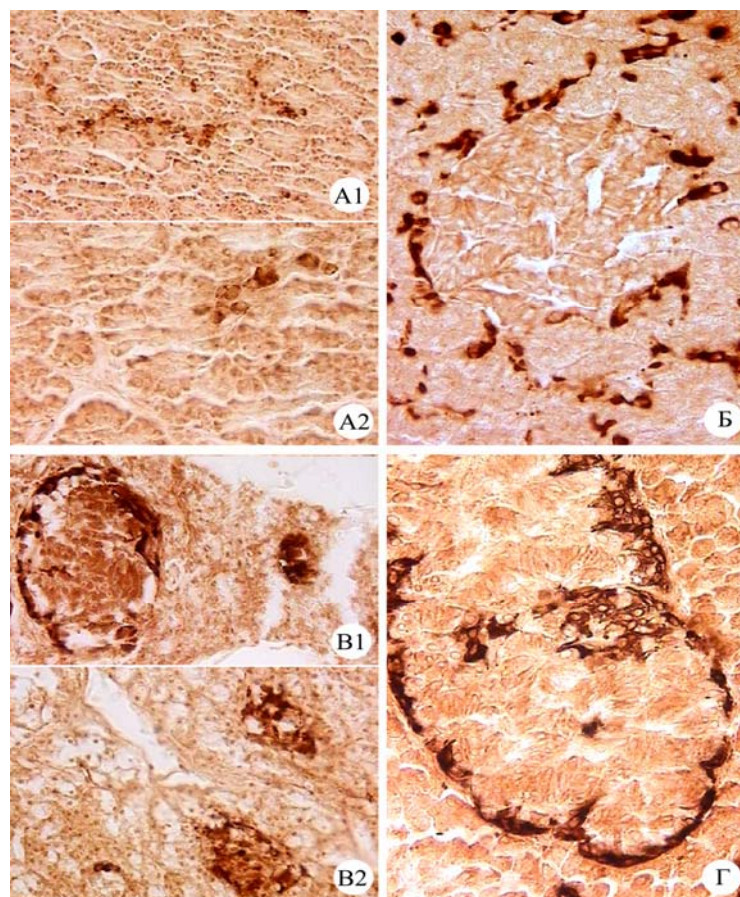


Рис. 2. Иммуногистохимическая реакция с антителами к нейропептиду Y в поджелудочной железе рыб: А – ската (*P. motoro*), А1 x 20, А2 x 40; Б – стерляди (*A. ruthenus*), x 40; В – угря (*A. anguilla*), x 40, В1 – островок

среднего размера и маленький островок, В2 – маленькие островки; Г – форели (*S. irideus*), х 40

Позитивное окрашивание на β -III тубулин позволяет охарактеризовать взаимодействие эндокринной ткани и нервного аппарата как нейроэндокринные комплексы. Также обнаружены одиночные клетки с немногочисленными отростками, располагающиеся преимущественно в эндокринной ткани. Таким образом, у скатов система иннервации усложняется появлением отдельных нервных клеток, расположенных в строме поджелудочной железы. Это первое эволюционное формирование обособленных нейронов, специализированных для функционального обслуживания ПЖ. Следовательно, можно заключить, что происхождение нервного аппарата ПЖ не зависит от уровня дифференцировки и морфологического обособления эндокринной и экзокринной ткани. Эти данные позволяют предположить, что эволюционное становление иннервации ПЖ происходило преимущественно под влиянием развития специфических механизмов регуляции углеводного обмена.

Еще более сложный вариант организации нервного аппарата ПЖ выявлен у угря с развитой структурой островков и ацинарной ткани.

Иммунопозитивная реакция с антителами к нейрон-специфическому β -III тубулину (рис. 1, Г) выявлена в нервах, пронизывающих ацинарную ткань ПЖ, но отсутствовала в островках. Аналогичное распределение можно наблюдать при иммунопозитивной реакции на S-100 в ПЖ стерляди. Иммунопозитивная реакция с антителами к NSE обнаружена в единичных клетках островков и некоторых нервных окончаниях, отходящих от артериол. NPY-позитивная реакция (рис. 2, В) наблюдается в нервах, сопутствующих артериям, единичных клетках в ацинарной ткани и островках.

Распределения NPY-позитивных клеток в островках различно. В небольших островках (до 200 мкм диаметром) они распределяются как по периферии, так и по всему объему островков. В островках около 300 мкм диаметром клетки преимущественно распределены по периферии, но единичные NPY-позитивные клетки встре-

чаются в центре островков. В крупных островках диаметром более 320 мкм иммунопозитивная реакция с антителами к NPY наблюдалась или по периферии островков, или полностью отсутствовала. Иммунопозитивная реакция с антителами к NSE тоже обнаружена в островках. Таким образом, при отсутствии специализированных нейронов ПЖ их функции по синтезу нейральных белков начинают выполнять эндокринные клетки. По-видимому, нехарактерные для ПЖ нейропептиды появились в эволюции для контроля за секреторной или морфогенетической активностью эндокринных клеток.

Наиболее сложная организация ПЖ была обнаружена у щуки и форели. Для этих рыб характерна архаичная иннервация железы в сочетании с глубокой дифференцировкой эндокринных островков по топологической специализации синтеза белков нервной ткани. В этих случаях β -III тубулин (рис. 1, Д) выявляется по всему объему островков. Более того, NPY-позитивная реакция была обнаружена у форели в зонах локализации глюкагон-позитивных клеток – по периферии островков (рис. 2, Г), а у щуки во всех клетках островка Лангерганса. NSE-позитивная реакция у форели отмечалась в тонких нервах и их отростках, а также внутри мелких островков. Реакция на антитела к нейрон-специфической энolahазе в ПЖ щуки была негативной. Эти данные подтверждают уже высказанное предположение о возможности различных вариантов нейропептидной регуляции углеводного обмена.

Выводы

По-видимому, у низших позвоночных в процессе эволюции появилось два механизма косвенного контроля за функциональной активностью ПЖ. Наиболее архаичный механизм построен на прямой регуляции активности эндокринных и экзокринных клеток со стороны периферической нервной системы. Этот вариант был обнаружен у акулы, стерляди и ската, в ПЖ которых были найдены специализированные нервные клетки, являющиеся

предшественниками нейроинсулярных комплексов млекопитающих.

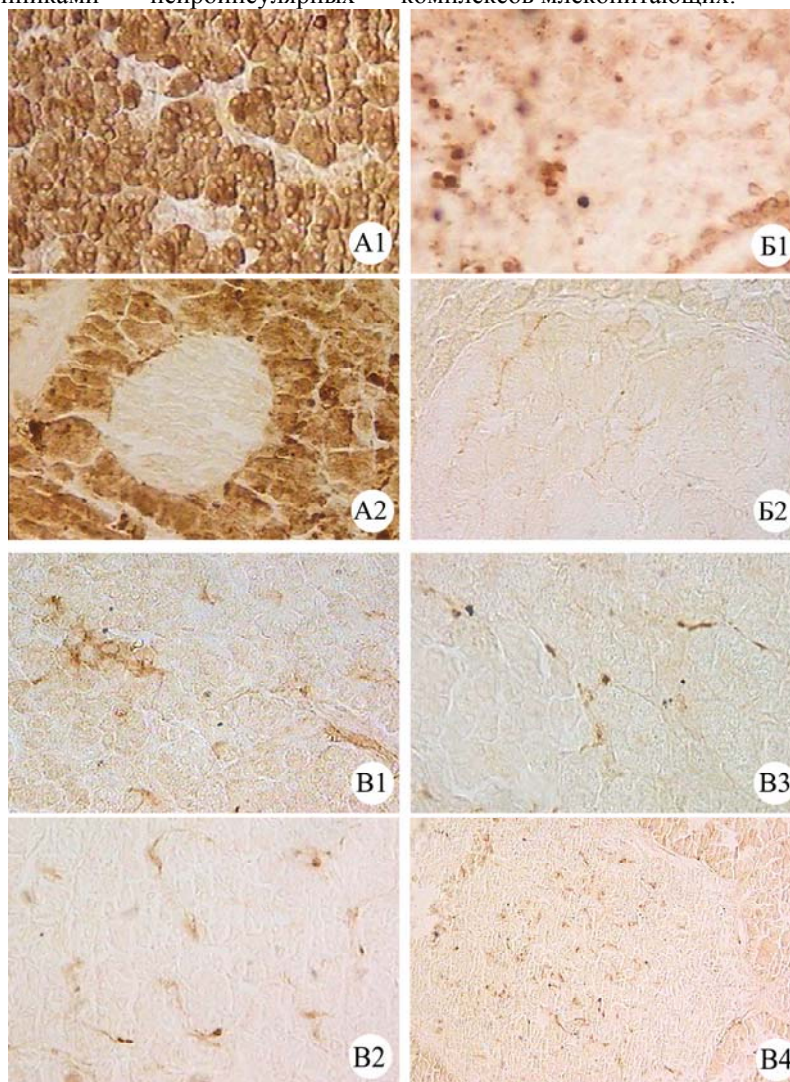


Рис. 3. Иммуногистохимическое исследование поджелудочной железы рыб (антитела к синаптофизину, NSE, S-100): А – синаптофизин-положительная реакция в ПЖ: А1 – ската (*P. motoro*), х 20; А2 – щуки (*E. lucius*), х 40; Б – NSE-положительная реакция в ПЖ, х 40: Б1 – акулы (*Ch. punctatum*), Б2 – форели (*S. irideus*); В – положительная реакция с антителами к S-100, х 40: В1 – ската (*P. motoro*), В2 – щуки (*E. lucius*), В3 – стерляди (*A. ruthenus*); В4 – положительная реакция с антителами к S-100 в ПЖ щуки (*E. lucius*) х 20

Другой механизм построен на том, что эндокринные клетки приобрели способность влиять на дифференцировку окружающей ткани за счёт синтеза сигнальных нейропептидов. Сам принцип взаимного влияния секреторных клеток при помощи нейропептидов пока не известен, что требу-

ет дополнительных исследований.

Литература

1. Нейроэндокринные комплексы в поджелудочной железе нутрии (*Myocastor coypus*) (иммуногистохимическое исследование) / Ю.С. Кри-

- вова [и др.] // Морфология. – 2009. – Т. 135, №3. – С. 59-62.
2. Неврогенные механизмы развития сахарного диабета 1-го типа / С.В. Савельев [и др.] // Архив патологии. – 2008. – Т. 70, №6. – С. 9-13.
 3. Яглов В.В. Морфология эндокринной части поджелудочной железы костистых рыб / В.В. Яглов // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1978. – Т.74, №1. – С. 111-115.
 4. Ahre N.B. Neuropeptides and the Regulation of Islet Function / N.B. Ahre, N. Wierup, F. Sundler // Diabetes. – 2006. – Vol. 55, №2. – P. 98-107.
 5. Carbone L. Pain in Laboratory Animals: The Ethical and Regulatory Imperatives / L. Carbone // PLoS ONE (www.plosone.org). – 2011. – Vol. 6, Issue 9. – P. e21578.
 6. El-Salhy M. Immunocytochemical investigation of the gastroenteropancreatic (GEP) neurohormonal peptides in the pancreas and gastrointestinal tract of the dogfish *Squalus acanthias* / M. El-Salhy // Histochemistry. – 1984. – Vol. 80. – P. 193-205.
 7. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research / C. Kilkenny [et al.] // PLoS Biology (www.plosbio-logy.org). – 2010. – Vol. 8, Issue 6. – P. e1000412.
 8. Vagal control of β -cell proliferation / J. Lausier [et al.] // Am J Physiol Endocrinol Metabolism. – 2010. – Vol. 299. – P. E786-E793.
 9. Noorden S. Vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity in nerves of the pancreatic islet of the teleost fish, *Gillichthys mirabilis* / S. Noorden, G.J. Patent // Cell and Tissue Research. – 1980. – Vol. 212, №1. – P. 139-146.
 10. The primary structure of peptide Y (PY) of the spiny dogfish, *Squalus acanthias*: Immunocytochemical localisation and isolation from the pancreas / J.-Z. Pana [et al.] // Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Comparative Biochemistry. – 1992. – Vol. 102, Issue 1. – P. 1-5.
 11. Putti R. An immunocytochemical study of intrapancreatic ganglia, nerve fibres and neuroglandular junctions in Brockmann bodies of the tompot blenny (*Blennius gattoruggine*), a marine teleost / R. Putti, M. Maglio, G. Odierna // The Histochemical Journal. – 2000. – Vol. 32. – P. 607-616.
 12. Innervation Patterns of Autonomic Axons in the Human Endocrine Pancreas / R. Rodriguez-Diaz [et al.] // Cell Metabolism. – 2011. – Vol. 14. – P. 45-54.
 13. Teff K. Townsend R. Early phase insulin infusion and muscarinic blockade in obese and lean subjects / K. Teff // American Journal Physiology Regul Integr Comp Physiol. – 1999. – Vol. 277. – P. R198-R208.
 14. Youson J. H. Ontogenetic and Phylogenetic Development of the Endocrine Pancreas (Islet Organ) in Fishes / J.H. Youson, A.A. Al-Mahrouki // General and Comparative Endocrinology. – 1999. – Vol. 116. – P. 303-335.

**INVESTIGATION OF PANCREAS NEUROENDOCRINE ORGANIZATION
OF SOME FISHES' SPECIES (*Pisces*)**

E.S. Savelieva, A.E. Proshchina, S.V. Saveliev

Immunohistochemical analysis of endocrine pancreas innervation of fishes was spent on 6 species (22 specimen) – Brown-banded cat shark (*Ch. punctatum* Müller and Henle, 1838), Motoro Sting Ray (*P. motoro* Müller & Henle, 1841), Sterlet (*A. ruthenus* L., 1758), Anguilla river (*A. anguilla* L., 1758), Trout rainbow (*S. irideus* L., 1758), Pike usual (*E. lucius* L., 1758). Antibodies to glucagon (Lab Vision), insulin (Sigma), neuron specific enolase (Lab Vision), neuron specific β -III tubulin (Abcam), S-100 (Lab Vision), synaptophysin (Abcam) and neuropeptide Y (Abcam) were used for immunohistochemical study. Two mechanism of control functional activity of pancreas were detected. One of them (archaic mechanism) is under construction on immediate regulation of activity endocrine and exocrine cells and functions by means of peripheral nervous system. The other operates by means of synthesis of signal endocrine cells' neuropeptides.

Key words: fishes, pancreas, immunohistochemistry, nervous system, neuropeptides.

Савельева Екатерина Сергеевна – научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ Морфологии Человека РАМН.

117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

E-mail: eslielsizoo@mail.ru.

Прощина Александра Евгеньевна – к.б.н., доц., ст. науч. сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ Морфологии Человека РАМН.

117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

E-mail: proshchina@yandex.ru.

Савельев С.В. – д.б.н., проф., заведующий лабораторией развития нервной системы ФГБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» РАМН.

E-mail: morfolhum@mail.ru.

Исследование поддержано специализированным фондом управления целевым капиталом для поддержки научно-исследовательских работ в области биологии и медицины «Фундаментальный».