

© Савельева Е.С., 2013  
УДК: 591.477:599.4

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ ИНСУЛИН-, ГЛЮКАГОН-, СОМАТОСТАТИН-ПОЗИТИВНЫХ КЛЕТОК ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА В РАЗЛИЧНЫЕ ПЕРИОДЫ ГОДОВОГО ЦИКЛА БЕСХВОСТЫХ ЗЕМНОВОДНЫХ (ANURA)**

Е.С. Савельева

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

Проведено иммуногистохимическое исследование локализации типов эндокринных клеток (инсулин-, глюкагон- и соматостатин-продуцирующих) в островках Лангерганса у амфибий в различных периодах годового жизненного цикла. Работа выполнена на поджелудочных железах следующих видов амфибий: пипа суринамская (*Pipa Pipa* L. 1758), травяная лягушка (*Rana temporaria*, L. 1758) и озерная лягушка (*Rana ridibunda*, Pallas 1771). Выявлено, что соотношение количества различных типов эндокринных клеток не одинаково в зависимости от периода жизни.

**Ключевые слова:** поджелудочная железа, островки Лангерганса, иммуногистохимия, инсулин, глюкагон, соматостатин, амфибии, сезонные изменения.

Поджелудочная железа (ПЖ) исследована у относительно небольшого числа видов амфибий. Многими авторами в поджелудочной железе выявлены островки с четырьмя основными типами эндокринных клеток [2, 12, 14], а также кластеры и скопления [4, 8, 15]. Многочисленные исследования посвящены локализации эндокринных клеток относительно друг друга и их распределению в островках [6, 7, 13]. Однако расхождения в результатах, полученных различными авторами при исследовании одних и тех же объектов, позволили предположить наличие изменений в железе в различные периоды годичного цикла [1, 13]. В литературных данных исследования ПЖ в различные периоды годового цикла немногочисленны [3], а работы по сезонным изменениям у амфибий единичны [10, 11].

Пытаясь восполнить пробелы в работах других авторов, выполнено иммуногистохимическое исследование с целью оценки эволюционно-адаптивных закономерностей перестройки ПЖ амфибий в течение годового цикла.

**Материалы и методы**

В работе использована ткань поджелудочной железы 12 экземпляров следующих амфибий: пипа суринамская (*Pipa Pipa* L.

1758), травяная лягушка (*Rana temporaria*, L. 1758) и озерная лягушка (*Rana ridibunda*, Pallas 1771). Для исследований отбирались особи (травяная и озерная лягушка) одного возраста в разные периоды жизни: в период спаривания (май), в период активного роста и питания (июнь-август), в период подготовки к анабиозу (сентябрь-октябрь). Сбор материала происходил в Московской и Рязанской областях. Представители вида пипа суринамская (*Pipa Pipa* L. 1758) получены из коллекции лаборатории развития нервной системы и были зафиксированы в период спаривания и в период активного питания. После получения животных проводилась эвтаназия согласно международным правилам [5, 9]. Исследование проводилось с помощью гистологических и иммуногистохимических методов. Гистологические серийные срезы поджелудочной железы амфибий (5-10 мкм) окрашивали гематоксилин-эозином. При изучении эндокринных клеток ПЖ было предпринято иммуногистохимическое исследование на смежных срезах, по выявлению моноклональными и поликлональными антителами инсулина, глюкагона и соматостатина. Список использованных антител и их разведения представлены в таблице 1.

Таблица 1

**Использованные антитела и их иммунореактивность**

Название антител Вид	Антитела к инсулину	Антитела к глюкагону	Антитела к соматостатину
	Морской свинки поликлональные Sigma (1:300)	Кроличьи поликлональные Lab Vision (1:100)	Кроличьи поликлональные Abcam (1:750)
Пипа суринамская ( <i>Pipa pipa</i> , L. 1758)	+	+	+
Травяная лягушка ( <i>Rana temporaria</i> , L. 1758)	+	+	+
Озерная лягушка ( <i>Rana ridibunda</i> , Pallas 1771)	+	+	+

**Результаты и их обсуждение**

Поджелудочная железа амфибий как по нашим, так и по литературным данным образует компактный оформленный орган, прилежащий к желудку и тонкому кишечнику в первой его трети [2, 13]. Экзокринная ткань представлена ацинусами характерного для млекопитающих строения. Эндокринная ткань представлена в виде островков и кластеров клеток, рассеянных в толще железы [15].

Несмотря на общие закономерности в строении поджелудочной железы и распределение эндокринных клеток внутри островков, нами выявлены значительные различия в количестве типов эндокринных клеток в зависимости от периода годового цикла. Косвенные указания на наличие подобных различий объясняется работами посвященными колебаниям гормонов в крови у земноводных в различные периоды жизни [7, 10, 11]. Годовой цикл земноводных средней полосы состоит из четырех периодов: весеннего (выхода из спячки и размножения), летнего (активного питания), осеннего (подготовки к спячке) и зимнего (спячки, или анабиоза). В каждый период количество, качество и состав потребляемой пищи меняется. В процессе сбора материала нами получены самцы трех видов бесхвостых земноводных в брачный период: пипы суринамской, травяной и озерной лягушек. Нами выявлено, что у всех исследованных представителей земноводных сохраняется анатомическое строение поджелудочной железы, характерное для

особей данного вида. Гистологическое исследование также не выявило изменений в строении органа. У всех исследованных видов экзокринная часть ПЖ представлена разветвленным табулярным аппаратом с ясно видимыми ацинусами и экзокринными протоками. Эндокринная ткань представлена островками, островковоподобными структурами, конгломератами или тельцами Брокмана. Однако иммуногистохимическое исследование антителами к инсулину, глюкагону и соматостатину выявило явные различия в соотношении типов эндокринных клеток. Так, в состоянии активного питания в поджелудочной железе пипы суринамской обнаружено, что инсулин-позитивные клетки образуют скопления неправильной формы. Они распределены как в непосредственной близости от протоков, так и около капилляров. При этом отдельные клетки могут быть встроены и в протоки, и в капилляры. В период спаривания нами выявлено аналогичное распределение инсулин-позитивных клеток. При исследовании локализации глюкагон-продуцирующих клеток в период питания показало, что глюкагон-позитивные клетки компактизируются аналогично инсулин-продуцирующим, однако смешанные конгломераты с инсулин-продуцирующими клетками отсутствовали. В период размножения глюкагон-продуцирующие клетки выявлены не были, что, вероятно, указывает на отсутствие секреции данного гормона. Во все периоды нами обнаружены одиночные соматостатин-продуцирующие

клетки, рассеянные в экзокринной паренхиме. У травяной и озерной лягушки в период спаривания в тельцах Брокмана увеличивалось количество инсулин-продуцирующих клеток и полностью отсутствовала иммунопозитивная реакция с антителами к глюкагону. Количество и распределение соматостатин-позитивных клеток оставалось неизменным как в период активного питания, так и в период спаривания. Таким образом, можно заключить, что в период спаривания в поджелудочной железе исследованных видов бесхвостых земноводных происходит значительное уменьшение продукции глюкагона, вплоть до полной блокировки его выделения. Однако продукция соматостатина остается неизменной, а продукция инсулина может несколько возрасти.

В период активного питания (для лягушек средней полосы – июнь-август, для пипы суринамской все время вне периода размножения) распределение эндокринных клеток в островке типично для бесхвостых земноводных, что полностью подтверждается исследованиями других авторов [8, 12, 14, 15]. У пипы инсулин-позитивные клетки располагаются в центре псевдо-островка. Глюкагон-позитивные образуют тонкий слой по периферии псевдо-островка, а также формируют конгломераты или небольшие группы в экзокринной паренхиме. Одиночные соматостатин-позитивные клетки распределены в паренхиме железы. Подобное распределение клеток неоднократно описывалось в литературе, и принимается учеными как неоспоримый факт [6, 13]. У настоящих лягушек эндокринные клетки образуют тельца Брокмана, встраиваясь в окружение экзокринных протоков.

Период начала спячки (анабиоза) мы могли наблюдать только у земноводных средней полосы: представителей жаб и настоящих лягушек. В этот период также меняется соотношение типов эндокринных клеток. В поджелудочной железе жаб инсулин не выявляется как в псевдо-островках, так и в одиночных клетках, разбросанных по паренхиме железы. Однако говорить о полном отсутствии инсулин-

продуцирующих клеток нельзя, так как на пять полей зрения мы обнаружили две инсулин-позитивные клетки. У настоящих лягушек – травяной и озерной – инсулин-позитивные клетки практически отсутствовали, однако глюкагон-продуцирующие клетки выявлялись в полном объеме и в некоторых случаях располагались в структуре телец Брокмана по две-три клетки рядом. Иммунопозитивная реакция с антителами к соматостатину, так же, как и в период размножения, наблюдалась в единичных клетках.

### Выводы

На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что эндокринная ткань поджелудочной железы земноводных чрезвычайно пластична и распределение различных типов эндокринных клеток в островках подвержено изменениям в зависимости от физиологического состояния животного и влияния внешних факторов.

### Литература

1. Банников А.Г. Очерки по биологии / А.Г. Банников, М.Н. Денисова. – М.: Гос. учебно-педагогическое изд-во Министерства просвещения РСФСР, 1956. – 168 с.
2. Яглов В.В. Морфология эндокринной части поджелудочной железы амфибий / В.В. Яглов // Арх. анатомии. – 1976. – Т. 70, №3. – С. 73-78.
3. Algauhari A.E.I. Experimental studies on the blood sugar in reptiles. Effect of fasting, temperature and insulin administration in *Psammophis sibilans* / A.E.I. Algauhari // Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology. – 1967. – Vol. 54, №3. – P. 395-399.
4. An immunohistochemical study of endocrine cells in the pancreas of the Red-bellied frog (*Bombina orientalis*) / J-h. Lee [et al.] // European Journal of Histochemistry. – 2003. – Vol. 47, Is. 2. – P. 165-172.
5. Carbone L. Pain in Laboratory Animals: The Ethical and Regulatory Imperatives / L. Carbone // PLoS ONE (www.plosone.org). – 2011 – Vol. 6, Is. 9. – e21578. – URL:10.1371/journal.pone.0021578.

6. Cell composition and co-stored peptides in the endocrine pancreas of *Rana arvalis* / R. Putti [et al.] // *Eur J Histochem.* – 1995. – Vol. 39, Is. 1. – P. 59-68.
7. Characterization of pancreatic endocrine cells of the European common frog *Rana temporaria* / J.C. Etayo [et al.] // *Gen Comp Endocrinol.* – 2000. – Vol. 117, Is. 3. – P. 366-380.
8. Epple A. The Comparative Physiology of the Pancreatic Islets / A. Epple, J.E. Brinn. – Heidelberg: Springer-Verlag, 1987. – 223 p.
9. Hampson J. Law relation to animal experimentation / J. Hampson // *Laboratory animals: an introduction for new experimenters* / ed.: A.A. Tuffery. – Chichester, UK: J.Wiley and Sons Ltd, 1990. – P. 21-52.
10. Harri M.N.E. The Rate of Metabolic Temperature Acclimation in the Frog, *Rana temporaria* / M.N.E. Harri // *Physiological Zoology.* – 1973. – Vol. 46, №2. – P. 148-156.
11. Hutchison V.H. Glucose and lactate concentrations during activity in the leopard frog, *Rana pipiens* / V.H. Hutchison, L.D. Turney // *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology.* – 1975. – Vol. 99, №4. – P. 287-295.
12. Kaung H.C. Distribution and morphometric quantitation of pancreatic endocrine cell types in the frog, *Rana pipiens* / H.C. Kaung, R.P. Elde // *Anat Rec.* – 1980. – Vol. 196, Is. 2. – P. 173-181.
13. Trandaburu I. The immunocytochemical detection of gamma-aminobutyric acid (gaba) in the pancreas of *amphibian Rana esculenta*; light- and electron-microscopic observations / I. Trandaburu, W. Kummer, T. Trandaburu // *Studia Universitatis “Vasile Goldiș”, Seria Științele Vieții.* – 2010. – Vol. 20. – P. 5-11.
14. Trandaburu I. The occurrence and distribution of adrenomedullin (AM) in the endocrine pancreas of several poikilotherm vertebrates: An immunohistochemical study / I. Trandaburu, T. Trandaburu // *Studia Universitatis “Vasile Goldiș”, Seria Științele Vieții.* – 2010. – Vol. 20, Is. 4. – P. 27-33.
15. Trandaburu T. Distribution and ultrastructure of somatostatin-immunoreactive cells in the pancreas of *Rana esculenta* / T. Trandaburu, F. Nürnbergger, S.S. Ali // *Ann Anat.* – 1995. – Vol. 177, Is. 3. – P. 213-219.

#### INVESTIGATION OF INSULIN-, GLUCAGON-, SOMATOSTATIN-POSITIV CELLS LOCALIZATION IN THE LANGERHANS' ISLENDIS IN DIFFERENT PERIODS OF BIOCYCLE OF ANURA

*E.S. Savelieva*

**Article deals to immunohistochemistry investigation of endocrine cells (insulin, glucagon, somatostatin) localization in the amphibian Langerhans' islelds in different periods of biocycle. In the investigation were used pancreatic glands of three amphibian species (*Pipa Pipa* L. 1758, *Rana temporaria*, L. 1758, *Rana ridibunda*, Pallas 1771). Study showed relationship of quantity of different endocrine cells types is not equal depending on biocycle's period.**

**Key words:** *pancreas, Langerhans' islelds, immunohistochemistry, insulin, glucagon, somatostatin, amphibia, biocycle.*

Савельева Е.С. – научный сотрудник лаборатории развития нервной системы.  
117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3, ФБГУ НИИ Морфологии Человека РАМН, лаборатория РНС.  
E-mail: eslielsizoo@mail.ru.