

МЕХАНИЗМЫ НОРМАЛЬНОГО И ПАТОЛОГИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ ТКАНЕЙ

УДК 911.839:611.37

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СИМПАТИЧЕСКОЙ ИННЕРВАЦИИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫСЫ

© 2017 г. Е. И. Чумасов^{a, b, *}, Е. С. Петрова^a, Д. Э. Коржевский^{a, c}

^aИнститут экспериментальной медицины

197376 Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

^bСанкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины

196084 Санкт-Петербург, Черниговская ул., дом 5

^cСанкт-Петербургский государственный университет

199034 С.-Петербург, Университетская наб., д. 7-9

*E-mail: iemmorphol@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.06.2016 г.

Окончательный вариант получен 21.02.2017 г.

С помощью иммуногистохимических методов изучены морфологические особенности симпатических нервных структур в поджелудочной железе новорожденных, половозрелых и стареющих крыс. Описан нейронный состав интрамуральных ганглиев, в их составе выявлены хромаффинные клетки. Внутри многих ганглиев поджелудочной железы обнаружены одновременно два типа перичеслюлярных нервных аппаратов: тирозингидроксилаза-содержащие катехоламинергические синаптические терминалы и PGP 9.5-иммунопозитивные холинергические синапсы. Установлено, что плотность катехоламинергических структур в поджелудочной железе крыс с возрастом снижается.

Ключевые слова: поджелудочная железа, тирозингидроксилаза, иммуногистохимия, постнатальный онтогенез, периферическая нервная система, синаптофизин

DOI: 10.7868/S0475145017040036

ВВЕДЕНИЕ

Наличие разнообразия нервных аппаратов в поджелудочной железе (ПЖ) млекопитающих было продемонстрировано с помощью классических нейрофибрилярных методов и суправитальной окраски метиленовым синим еще в 19-ом столетии. В дальнейшем с помощью гистохимических исследований (флуоресцентной микроскопии с использованием глиоксалевой кислоты и реакции на ацетилхолинэстеразу) у различных видов животных в экзокринном и эндокринном отделах были выявлены холинергические и адренергические нервные волокна и сплетения (Coupland, 1958; Falck, Hellman, 1963; Елецкий, Шаширина, 1976; Yi et al., 2005 и др.). Ряд работ был выполнен с помощью иммуногистохимических методов и электронной микроскопии (Ushiki, Watanabe, 1997; Liu et al., 1997; Hahn von Dorsche, Falkmer, 2000; Persson-Sjögren et al., 2001; Yi et al., 2005 и др.). Эти исследования с еще большей убедительностью подтвердили наличие в ПЖ млекопитающих катехоламинергических и холинергических нервных волокон.

В настоящее время установлены основные источники нервного снабжения секреторных отделов ПЖ у животных и человека. Это центральное моторное ядро вагуса, эфферентные нейроны ган-

глиев верхнего брыжеечного, чревного, селезеночного сплетения, симпатического ствола грудного отдела и собственных интрамуральных парасимпатических ганглиев, а также чувствительные нейроны спинномозговых узлов (Ноздрачев, 1983; Sharkey, Williams, 1983; Ahrén, 2000; Salvioli et al., 2002; Yi et al., 2005; Taborsky, 2011; Иванова, Пузырев, 2011).

В процессе изучения особенностей иннервации эндокринного отдела ПЖ крысы и человека выяснилось, что панкреатические островки получают парасимпатические и симпатические нервные волокна из основного терминального сосудистого нервного сплетения (Чумасов и др., 2011, 2013, 2015). Иммуногистохимическими методами в сплетениях были выявлены немиелинизированные нервные аксоны, которые имеют различную медиаторную природу и вместе с ко-локализованными в них регуляторными пептидами участвуют в иннервации кровеносных сосудов, ацинусов, выводных протоков, островков Лангерганса (ОЛ) (Liu, Kirchgessner, 1997; Чумасов и др., 2013; Proshchina et al., 2014). С помощью иммуногистохимического метода выявления белка S100 были изучены глиальные элементы (нейролеммоциты) периферической нервной системы ПЖ человека

(Кривова и др., 2015). Ряд авторов отмечают, что ганглии, встречающиеся внутри ПЖ, принадлежат к парасимпатическому отделу ВНС, в то время как тела симпатических нейроцитов находятся за пределами органа (Liu, Kirchgessner, 1997). Предполагается, что парасимпатическая иннервация преобладает над симпатической (Елецкий, Шаширина, 1976; Liu, Kirchgessner, 1997; Gilon, Henquin, 2001). В этой связи дискуссионным является вопрос о мере участия двух упомянутых отделов автономной нервной системы (парасимпатического и симпатического, их ганглиев и постганглионарных волокон) в регуляции эндокринной функции ПЖ. Поэтому проблема изучения симпатической иннервации ПЖ на разных этапах онтогенезе является актуальной.

Нарастает число доказательств, свидетельствующих о том, что катехоламины симпатических нервных волокон играют важную роль в процессах развития эндокринного отдела ПЖ. Разрушение симпатических волокон и глиальных клеток вокруг островков Лангерганса (ОЛ) в поджелудочной железе наблюдались у больных с хроническими формами панкреатита и при моделировании диабета у животных (Mei et al., 2002; Winer et al., 2003; Persson-Sjögren et al., 2005; Чумасов и др., 2013; Proschchina et al., 2014). Опыты с использованием симпатэктомированных мышей показали, что у этих животных наблюдается выраженное ингибирование инсулиновой секреции и потеря толерантности к глюкозе при старении (Borden et al., 2013). Таким образом, изучение вопросов структурной организации и определения медиаторного статуса элементов симпатической нервной системы во взаимосвязи с развитием секреторных структур ПЖ в онтогенезе имеет теоретическое и прикладное значение.

Цель исследования – изучить морфологические особенности симпатических нервных структур в поджелудочной железе новорожденных, половозрелых и стареющих крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проведена на новорожденных ($n = 4$), половозрелых (3–4 мес.) ($n = 6$) и стареющих (18–19 мес.) ($n = 6$) крысах Вистар. Во всех экспериментах при эвтаназии крыс соблюдали международные правила Хельсинской декларации о гуманном обращении с животными и “Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных” (приказ № 775 от 12.08.1977 МЗ СССР). Животных умерщвляли парами этилового эфира, ПЖ отпрепаровывали целиком (вместе с окружающей жировой клетчаткой) и фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде (Korzhevskii et al., 2014). После заливки в парафин готовили срезы толщиной 5 и 15 мкм. Часть срезов окрашивали толуидиновым синим по Нисслию и гематоксили-

ном-эозином. Для иммуногистохимического выявления синаптофизина – специфического белка синаптических везикул и синаптофизин-положительных терминалей (СФПТ) (Колос и др., 2014) применяли поликлональные кроличьи антитела (MONOSAN, Нидерланды) в соответствии с разработанным ранее протоколом (Коржевский и др., 2014). Для идентификации катехоламинергических структур симпатической нервной системы применяли поликлональные кроличьи антитела к тирозингидроксилазе (ТГ) (1 : 1000, Abcam, Великобритания). Для выявления всех нервных структур ПЖ: нервных стволов и пучков, нервных сплетений и клеток без учета их медиаторной спецификации, а также эндокриноцитов островков Лангерганса, был применен маркер – белок PGP 9.5 (Коржевский, Колос, 2013). В сочетании с реакцией на ТГ на последовательных срезах маркер PGP 9.5 был использован для выявления несимпатических (то есть, парасимпатических) нервных структур. Для выявления белка PGP 9.5 были использованы поликлональные кроличьи антитела к (1 : 200, Spring Bioscience, США). В качестве вторичных реагентов использовали реактивы из набора Super Sensitive Polymer-HRP Detection System (Bio Genex, США). Для иммуногистохимических реакций использовали отрицательный контроль с нанесением на срезы вместо первичных антител их разбавителя (Dako, Дания).

Количественный анализ симпатических структур осуществляли на цифровых изображениях, полученных с помощью микроскопа Leica DM 750 (Leica, Германия) и цифровой камеры Leica ICC 50 (Leica, Германия). Определяли долю площади препарата с иммуногистохимической реакцией на ТГ. Подсчет проводили на единицу площади гистохимического препарата, используя программу Image J (NIH, США). Анализировали по 4 цифровых изображения на каждое животное при увеличении $\times 100$ (площадь изображения составляла 1.28 мм²). Для построения гистограммы подсчитывали процент площади, занимаемой иммунопозитивными структурами для четырех животных в каждой группе. Применив тест Крускала–Уоллиса, показали, что различия для трех групп сравнения достоверны ($p = 0.0116$). Для дальнейшего попарного сравнения использовали t -критерий и U -критерий. Различия считали значимыми при $p < 0.05$ и $p < 0.01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При изучении препаратов, окрашенных с помощью иммуногистохимической реакции на белок PGP 9.5, который является высокоэффективным методом выявления нервных элементов, было обнаружено, что он содержится не только в структурных компонентах нервной системы, но и эндокриноцитах островков Лангерганса (рис. 1а).

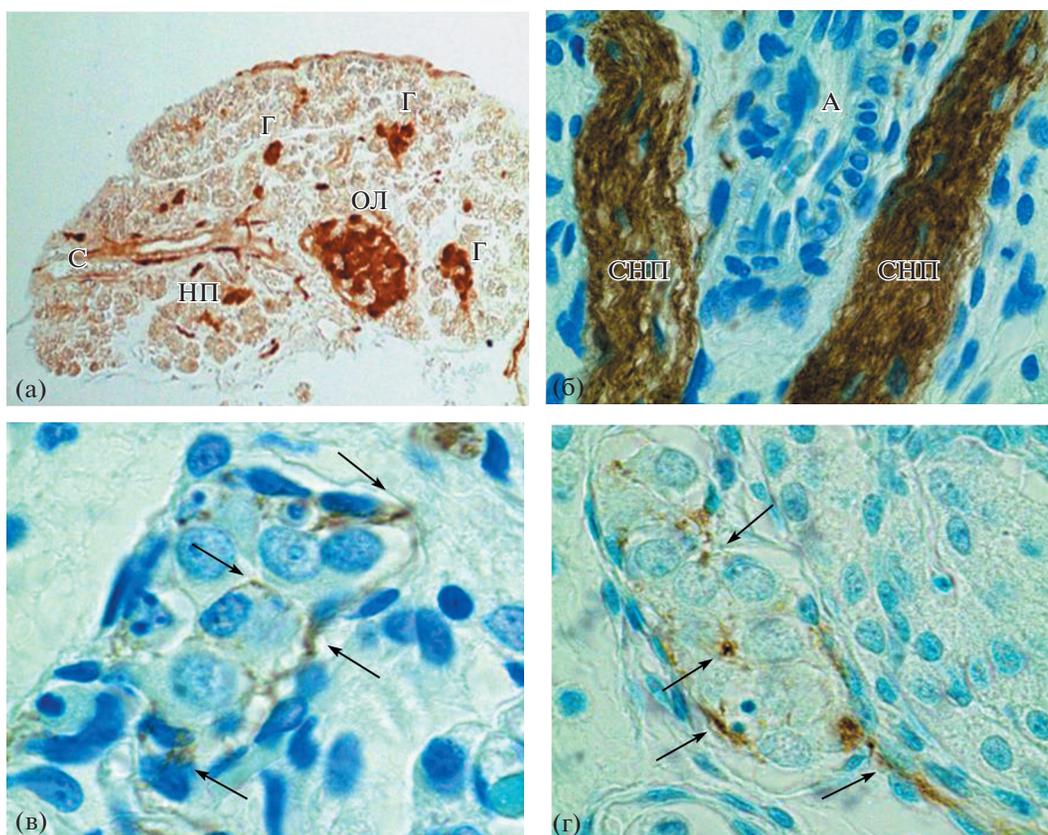


Рис. 1. Эндокриноциты островков Лангерганса и нервные элементы в поджелудочной железе новорожденной крысы. С – кровеносные сосуды; НП – нервные пучки; Г – микроанглии; ОЛ – островок Лангерганса; СНП – симпатические нервные пучки, сопровождающие артерию (А); стрелки – тирозингидроксилаза-содержащие претерминальные и терминальные элементы катехоламинэргических аксонов перичеселлярного нервного сплетения вокруг дифференцирующихся нейронов парасимпатических микроанглиев. Иммуногистохимическая реакция на белок PGP 9.5 (а) и тирозингидроксилазу (б, в, г). Докраска толуидиновым синим (б и г). Ув.: $\times 100$ (а); $\times 400$ (б, в, г).

Уже у новорожденных крыс с помощью иммуногистохимической реакции на PGP 9.5 можно видеть в пределах среза одной дольки плотно расположенные фрагменты разных нервно-тканевых структур: стволы и пучки нервного сплетения, микроанглии, а также тонкие тяжи аксонов ремковского типа, располагающиеся вокруг крупных и мелких сосудов, между ацинусами и формирующимися островками Лангерганса. Внутри сплетения встречаются небольшие группы (3–4) молодых нервных клеток и дифференцирующихся нейробластов, а также микроанглии до 10–17 мелких (размерами от 12 до 13.5 мкм) клеток. Форма молодых нейронов варьирует от округлой до вытянутой и грушевидной. Иногда видно, как от отдельных грушевидной формы нейронов отходят длинные отростки, формирующие тонкие пучки аксонов; они выявляются между ацинусами, прослеживаются вдоль кровеносных сосудов, и часто близко прилежат к группам эндокриноцитов и к формирующимся ОЛ.

С помощью реакции на ТГ у новорожденных крысят удалось избирательно выявить симпати-

ческие нервные элементы, дающие положительную, желтовато-коричневого цвета, реакцию. Два крупных нервных стволика (диаметром 15 мкм), состоящих целиком из ТГ+ тонких симпатических аксонов, были обнаружены вдоль центральной артерии, входящей в дольку. Встречаются также различного диаметра смешанные пучки (от 2 до 15 мкм), состоящие как из симпатических, так и парасимпатических волокон. Многие из них находятся в тесной связи со средними и мелкими артериальными сосудами и вместе с ними образуют нервно-сосудистое сплетение, фрагменты которого можно видеть в разных местах среза (рис. 1б). Немногочисленные симпатические нервные стволы и пучки различного диаметра (от 2 до 15 мкм), были обнаружены не только вблизи стенок кровеносных сосудов, но и формирующихся ацинусов, островков, выводных протоков. Одни из них целиком состоят из ТГ+ симпатических аксонов, другие входят в состав смешанных пучков; те и другие располагаются разреженно в разных местах срезов развивающейся ПЖ. Вместе с сосудами они образуют широкопетлистое нервно-сосуди-

стое сплетение. Следует отметить, что плотность расположения ТГ⁺ симпатических нервных волокон в некоторых смешанных пучках заметно ниже плотности PGP 9.5 + нервных проводников. Иногда приходилось видеть как часть ТГ⁺ тонких пучков и тяжей, выходящих из общего нервного сплетения, направляются в составе артериол, к ацинусам и к мелким группам эндокриноцитов.

Кроме ТГ⁺ волокон, сопровождающих кровеносные сосуды, были обнаружены также тонкие пучки симпатических нервных волокон следующих к ганглиям ПЖ. Как уже отмечалось у новорожденных крысят в нервном сплетении долек встречаются немногочисленные микроганглии, состоящие из молодых нейронов и дифференцирующихся нейробластов. Для этих клеток характерно отсутствие реакции на ТГ. Они не синтезируют катехоламины и относятся, по нашему мнению, к парасимпатическому отделу нервной системы. На рисунке (рис. 1в, 1г) видно как тонкие пучки и тяжи ТГ⁺ аксонов подходят к ганглию и проникают в него через тонкую соединительнотканную капсулу. Внутри ганглия ТГ⁺ аксоны ветвятся и формируют вокруг перикарионов молодых нейронов и дифференцирующихся нейробластов тончайшие концевые волокна — фрагменты так называемого перичеселлюлярного нервного аппарата. Обращает на себя внимание, что для молодых парасимпатических нейронов и нейробластов характерны крупные пузырьковидные ядра с одним хорошо выраженным ядрышком и слабо окрашенная светлая цитоплазма, бедная хроматофильным (нислевским) веществом. Вдоль терминальных веточек аксонов, при больших увеличениях можно видеть расширенные участки аксоплазмы (варикозности), имеющие вид разного диаметра пластинок, колечек или петелек (рис. 1в, 1г).

Неожиданной находкой явился также факт обнаружения в ПЖ новорожденных животных мелких, размерами 6—9 мкм, интенсивно окрашенных в черно-коричневый цвет ТГ⁺ клеток. Они легко идентифицируются на светлом фоне препарата, имеют разнообразную, в зависимости от места положения, форму: шаровидную, овальную, веретеновидную или неправильную. Иногда у них выявляются немногочисленные короткие цитоплазматические отростки, отходящие в разные стороны от сомы. На более тонких срезах в их цитоплазме и отростках определялась мелкая диффузная ТГ⁺ зернистость, четко определялась светлое ядро с 1—2-мя ядрышками. На первый взгляд казалось, что эти клетки располагаются в тканях ПЖ разреженно и беспорядочно. Однако при реакции на PGP 9.5 выяснилась их тесная связь с нервными элементами. Клетки локализируются, как правило, в PGP 9.5+ нервных сплетениях, а также внутри и вблизи парасимпатических микроганглиев (рис. 2). На срезах видно, что парасимпатические нервные

структуры (нервные пучки и нейроны), в отличие от мелких ТГ⁺ клеток, не окрашиваются при реакции на ТГ и характеризуются тирозингидроксилаза-иммунонегативностью (ТГ⁻). Компактные скопления ТГ⁺ мелких клеток (в количестве до 10—15) иногда располагаются под соединительнотканной капсулой ганглия небольшими группами или поодиночке (рис. 2а). При изучении последовательных срезов показано, что эти клетки дают иммуногистохимическую реакцию на синптофизин (рис. 2б, 2в, 2г). Эти клетки могут находиться в центре ганглия, среди молодых и дифференцирующихся нейронов и нейробластов. Некоторые из них вплотную прилежат к телам нейронов и нейробластов. В настоящем исследовании в одном случае хромаффинные клетки веретеновидной формы с выраженными цитоплазматическими отростками были выявлены внутри ТГ-пучка нервных волокон (рис. 2в). Создается впечатление, что они находятся в состоянии миграции. Следует отметить, что в островках Лангерганса такие клетки не встречаются.

Заслуживает внимания и другой не менее интересный факт. У однодневных животных с помощью иммуногистохимической реакции на СФ в тех же парасимпатических ганглиях ПЖ удалось выявить еще один тип нервных окончаний. Они более многочисленны, по сравнению с симпатическими, дают хорошо выраженную положительную реакцию на антитела к СФ; ранее они были нами описаны в ганглиях взрослых животных и человека и названы как синаптофизин-иммунопозитивные терминали (Чумасов и др., 2011). Окончания имеют разнообразную форму и представляют собой интенсивно окрашенные в черно-коричневый цвет четкообразные мелкие и крупные шаровидные и петельковидные структуры аксонов (рис. 2). Терминальные веточки их находятся на некотором расстоянии от сомы или вплотную прилежат к перикарионам молодых нейронов, окружая их с разных сторон. На основании анализа серийных срезов установлено, что этот тип синаптических окончаний является составной частью перичеселлюлярного нервного аппарата, образованного, по нашему мнению, преганглионарными парасимпатическими нервными волокнами, приходящими в ПЖ по ветвям вагусного нервного сплетения. Обращает на себя внимание, что данный метод кроме типичных интраганглионарных синапсов, выявляет также СФПТ *en passant* (касательные синапсы), прилежащие к гладкомышечным клеткам стенки сосудов. Как видно на иллюстрации, этот метод избирательно выявляет также эндокриноциты ОЛ (рис. 2б).

В результате исследования иннервации тканей ПЖ с помощью реакции на PGP 9.5 у 3—4-месячных животных (а также на основании полученного ранее клинического и экспериментального ма-

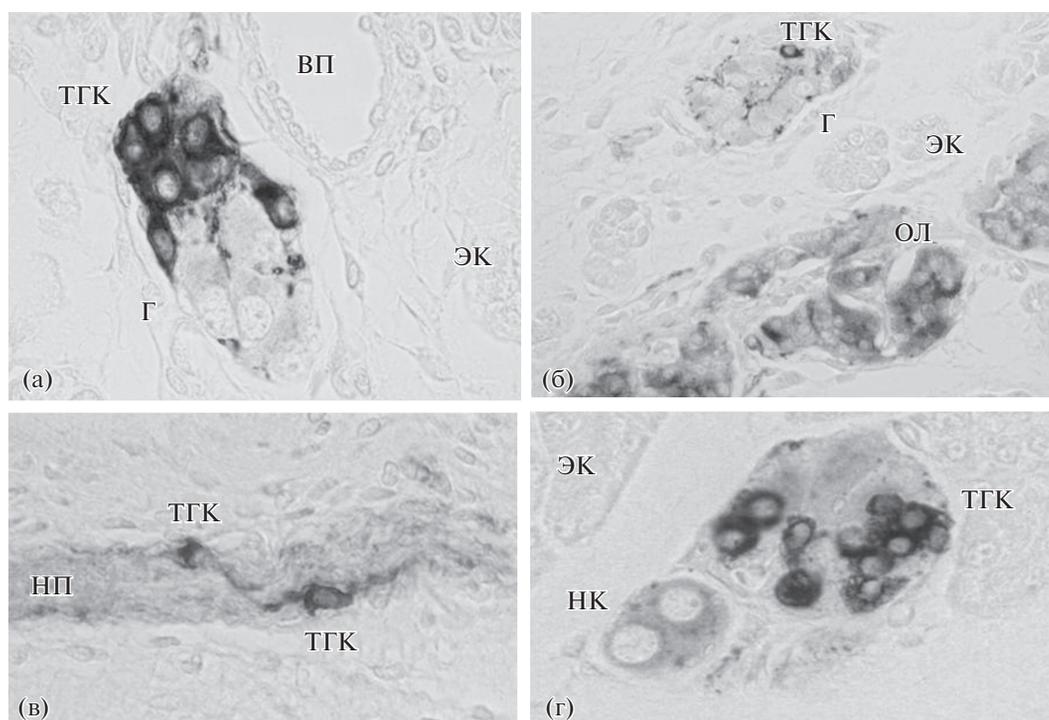


Рис. 2. Мелкие тирозингидроксилаза-позитивные (а) и синаптофизин-позитивные (б, в, г) клетки и их взаимосвязь с нервными пучками (в) и микроганглиями (а, б, г). НП – нервный пучок; Г – микроганглий; НК – нервные клетки; ВП – выводной проток; ОЛ – островок Лангерганса; ЭК – экзокриноциты; ТГК – тирозингидроксилаза-содержащие клетки. Иммуногистохимическая реакция на тирозингидроксилазу (а) и синаптофизин (б, в, г). Ув.: $\times 400$.

териала (Чумасов и др., 2011, 2013, 2015)) были обнаружены три нервно-сосудистых сплетения: наружное, из крупных сосудов и нервных стволиков, междольковое из средних и мелких артерий и нервных пучков и внутريدольковое – основное или терминальное сплетение (рис. 3а, 3б). При анализе последовательных серийных срезов удалось установить различия степени снабжения парасимпатическими и симпатическими нервными волокнами эндокринной ткани ПЖ (рис. 3в, 3г).

Было показано, что парасимпатические (RGP 9.5+) варикозные аксоны основного терминального сплетения, образующие касательные синапсы (*en passant*) с гладкомышечными клетками (ГМК) различного диаметра артериальных сосудов, прослеживаются на всем протяжении сосудистой стенки, вплоть до самых тонких артериол, и вместе с капиллярами проникают внутрь островка. В то же время симпатические волокна, выявляемые на ТГ, в том же самом терминальном сплетении, располагаются по ходу сосудов очень разреженно и неравномерно. Наибольшая их концентрация отмечается в местах дихотомического ветвления мелких и средних артерий, в то время как вокруг артериол, снабжающих кровью островки, они редко выявляются. Следует отметить также, что в ПЖ у взрослых животных, в отличие от неонатальных, отсутствуют также ТГ⁺ мелкие, ка-

толаминсинтезирующие клетки. Лишь в одном из многочисленных случаев удалось обнаружить небольшую группу этих ТГ⁺ клеток в парасимпатическом ганглии. Обращает на себя внимание, что внутри ганглия с ТГ⁺ клетками (взрослая крыса) симпатические перичеселлюлярные окончания, в отличие от новорожденных животных не выявляются. Возможно, это связано с возрастными изменениями симпатической иннервации ПЖ крысы. У стареющих крыс заметно снижается общая плотность иннервации сосудов, островков Лангерганса и выводных протоков (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Поджелудочная железа по данным литературы богато иннервирована симпатическими нервами, берущими свое начало от клеток паравerteбральных ганглиев, верхних брыжеечных ганглиев, ганглиев селезеночного сплетения и др. (Woods, Porte, 1974; Yi et al., 2005). Однако вопросы, связанные с динамикой развития симпатической иннервации ПЖ в онтогенезе, во многом не решены.

Использование комплекса иммуногистохимических нейрональных маркеров позволило нам изучить иннервацию поджелудочной железы крысы в разные периоды онтогенеза. Показано, что у новорожденных и половозрелых крыс боль-

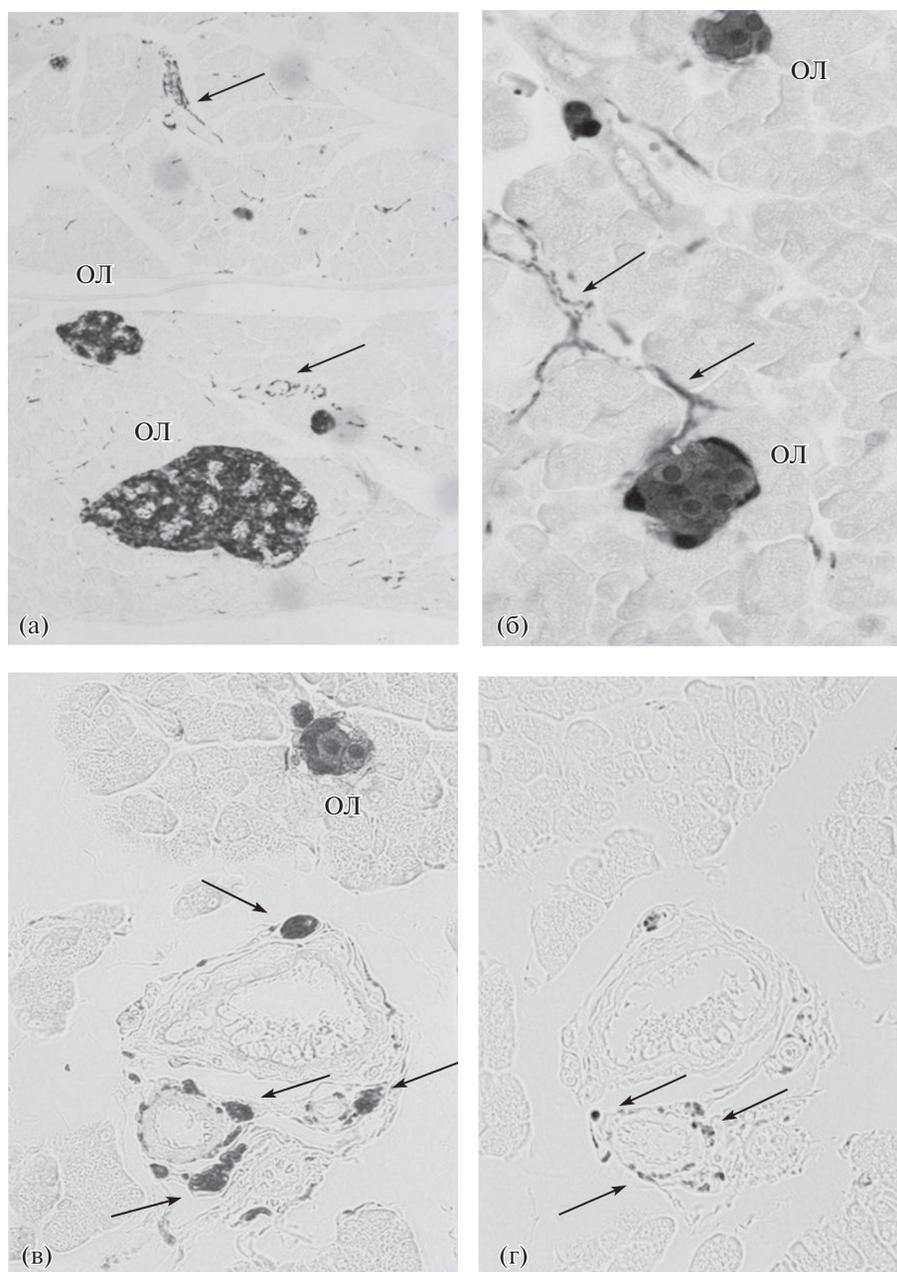


Рис. 3. PGP 9.5-иммунопозитивные (а, б, в) и TH-иммунопозитивные (г) нервные структуры в ПЖ половозрелых крыс. ОЛ – островки Лангерганса; стрелки – нервные пучки и терминалы. Иммуногистохимическая реакция на PGP 9.5 (а, б, в) и тирозингидроксилазу (г). Ув.: $\times 100$ (а); $\times 400$ (б, в, г).

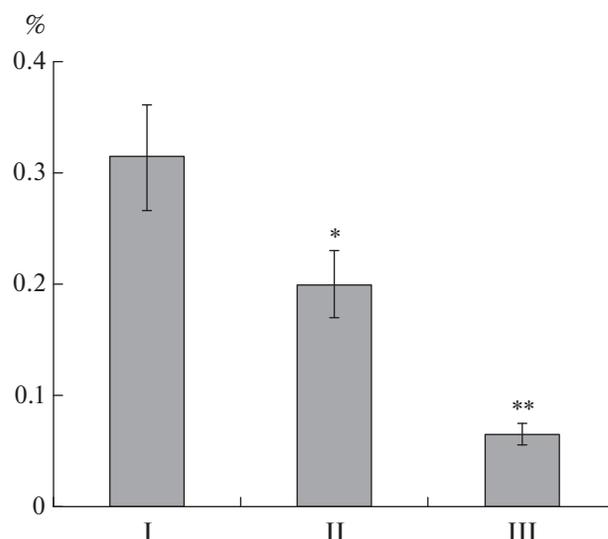
шое число симпатических постганглионарных волокон проникает в ПЖ в сопровождении артериальных сосудов. Они участвуют, главным образом, в иннервации гладкомышечных клеток средних и мелких артерий, и в меньшей степени островковых артериол, ацинусов, венозных сосудов и выводных протоков. Проведенный сравнительный морфологический анализ показал, что с возрастом интенсивность симпатической иннервации в ПЖ резко падает. У стареющих крыс ТГ+ аксоны в основном терминальном сплетении,

располагающемся вокруг артериол, вблизи островков и ацинусов, выявляются крайне редко, а ТГ+ мелкие клетки, синтезирующие катехоламины, практически не встречаются.

Значение симпатической иннервации ПЖ для ее нормального функционирования отмечено многими авторами. Предполагается, что в ОЛ симпатические волокна выполняют регуляторную функцию, ингибируя секрецию инсулина В-клетками и способствуя выделению глюкагона А-клетками (Woods, Porte, 1974; Ahrén, 2000). Установлено так-

же, что симпатическая иннервация регулирует уровень выработки тканями мишенями нейротрофинов и фактора роста нервов (ФРН), а последние в свою очередь стимулируют направленный рост аксонов (Teitelman, Lee, 1987; Gradwohl et al., 2000). Так, показано, что симпатическая иннервация ПЖ у мышей с врожденным недостатком фактора роста нервов редуцирована (Glebova, Ginty, 2005), в то время как повышение уровня ФРН в В-клетках приводит к гипериннервации островков Лангерганса (Edwards et al., 1989). Корреляция между выработкой клетками ОЛ поджелудочной железы крысы ФРН и иннервацией островков установлена в работе Cabrega-Vásquez et al. (2009). Авторы исследовали иннервацию ОЛ в разные периоды развития крысы. Показано, что клетки островков синтезируют и секретируют больше ФРН в эмбриональный и ранний постнатальный период, чем в более поздние сроки. Иннервация ОЛ также имеет тенденцию снижаться с возрастом, при этом выявлены особенности иннервации центральной и периферической частей островков. Уменьшение островковой иннервации прослежена авторами у крыс до половозрелого возраста. Изменения, происходящие в ПЖ стареющих крыс, не исследовались.

Начало симпатической иннервации совпадает со стадиями роста и дифференцировки ПЖ в эмбриогенезе (Burriss, Hebrok, 2007; Borden et al., 2013). Опыты с симпатоектомированными мышами показали, что у этих животных наблюдается выраженное ингибирование инсулиновой секреции и потеря толерантности к глюкозе на поздних стадиях жизни (Borden et al., 2013). Потеря симпатических нервных волокон наблюдается при различных патологиях ПЖ (Mei et al., 2002; Winer et al., 2003; Persson-Sjogren et al., 2005; Чумасов и др., 2013). Результаты нашего исследования дополняют данные, полученные другими авторами. Показано, что симпатические волокна у новорожденных крыс образуют нервные окончания, так называемые перичеселлярные синаптические аппараты вокруг молодых нейронов и дифференцирующихся нейробластов парасимпатических интрамуральных ганглиев. В одних и тех же интрапанкреатических ганглиях с помощью различных иммуногистохимических методов вокруг парасимпатических нейронов нами были обнаружены две разновидности перичеселлярных аппаратов. Одни из них симпатические, выявленные с помощью ТГ, представляют собой катехоламинергические эфферентные синапсы, другие, выявляющиеся с помощью белка PGP 9.5, являются холинергическими нервными окончаниями. Последние принадлежат либо к эфферентным преганглионарным, либо афферентным миелинизированным волокнам блуждающего нерва. Таким образом, в настоящем исследовании в интрамуральных нервных ганглиях ПЖ обнаружены не



* $p < 0.05$ (I, II)
 ** $p < 0.01$ (II, III)

Рис. 4. Изменение плотности симпатических структур в ПЖ крыс разного возраста. По оси абсцисс: I – новорожденные крысы; II – половозрелые крысы; III – стареющие крысы. По оси ординат – доля площади цифрового изображения, занимаемой ТГ+ структурами. Вертикальные отрезки – значения стандартной ошибки, звездочки – различия между показателями у крыс разного возраста. Между I и II столбиками различия значимы при $p < 0.05$; между II и III – при $p < 0.01$.

только парасимпатические, но и симпатические нервные окончания на нейронах. Это не согласуется с данными Лиу с соавт. (Liu et al., 1997), которые, используя иммуногистохимическую электронную микроскопию для выявления норадренергических везикул в ганглиях взрослых морских свинок, отметили наличие только холинергических синапсов. Присутствие отдельных симпатических волокон, локализованных на периферии ОЛ, на границе с А-клетками отмечается лишь в некоторых работах. Возможно, это противоречие обусловлено видовыми особенностями иннервации ПЖ.

Обсуждения требует вопрос, касающийся выявленных в данной работе ТГ+ мелких клеток, которые по всем признакам тождественны SIF клеткам. Известно, что SIF (или МИФ) (мелкие интенсивно флуоресцирующие) или SGC (мелкие гранулосодержащие) клетки часто встречаются в симпатических и парасимпатических ганглиях человека и животных. Морфология их достаточно хорошо описана в специальной литературе (Cooperland, 1958; Смиттен, 1972; Ноздрачев, Чумасов, 1999), а различия в названиях связаны лишь с различиями методов их обнаружения. С помощью комбинации флуоресцентной и электронной микроскопии было установлено сходство этих клеток с хромаффинными клетками (ХК) каро-

тидного тельца, параганглиев сердца и парааортальной области, коры надпочечников. Клетки с высоким содержанием катехоламинов были описаны ранее некоторыми авторами в ганглиях и нервных пучках ПЖ кролика и морской свинки с помощью флуоресцентной микроскопии и иммуногистохимического метода выявления ТГ (Oomori et al., 1994; Yi et al., 2005). По нашему мнению, выявленные нами у крысы мелкие ТГ+ клетки также относятся к ХК. Функция ХК изучена недостаточно. Некоторые авторы называют их “паранейронами” или “интернейронами” и предполагают, что они выступают в качестве релейных структур в передаче информации между нейронами интрамуральных. Другие исследователи считают их одновременно нейроэндокринными и рецепторными клетками, поскольку на них были обнаружены афферентные и эфферентные сигналы (Ноздрачев, Чумасов, 1999).

Ранее в нашей работе, посвященной изучению хромоаффинных клеток сердца, показано, что они выявляются одинаково хорошо с помощью иммуногистохимической реакции как на ТН, так и на синаптофизин (Чумасов и др., 2016). Известно, что синаптофизин является маркером не только синаптических контактов, но и нейроэндокринных клеток (Колос и др., 2015). Настоящее исследование дополняет имеющиеся в литературе данные о ХК. ТГ+ клетки обнаружены нами в ганглиях и в пучках нервного сплетения ПЖ у новорожденных крыс, у взрослых и стареющих животных они не встречались. Лишь в одном случае в интрапанкреатическом ганглии взрослого животного удалось обнаружить небольшую группу этих клеток.

Характеризуя симпатическую иннервацию ПЖ крысы, следует отметить ряд важных и интересных особенностей. На наш взгляд, наивысшего пика симпатическая иннервация ПЖ достигает на ранних стадиях постнатального онтогенеза. В этот период продолжается развитие тканей ПЖ: наблюдается активный рост постганглионарных симпатических волокон, устанавливается их связь с кровеносными сосудами, продолжается гистогенез парасимпатических ганглиев и островков ПЖ. Этот период совпадает с появлением мелких ТГ+ клеток, синтезирующих катехоламины. Именно в этот срок выявлено установление синаптических связей между постганглионарными симпатическими волокнами и нейронами парасимпатических ганглиев ПЖ, постганглионарные отростки которых, как известно непосредственно участвуют в регуляции секреторной активности и экзокринного, и эндокринного отделов изучаемого органа.

Показано, что у стареющих крыс на фоне возрастных дистрофических процессов, в тканях ПЖ наблюдается снижение общей плотности ин-

нервации кровеносных сосудов, островков, выводных протоков. Реже встречаются парасимпатические ганглии и крупные островки. Учитывая разницу в иннервации тканей ПЖ между парасимпатическими и симпатическими постганглионарными волокнами, а также отсутствие в органе симпатических ганглиев, можно с достаточным основанием высказать предположение о преобладании в ПЖ у половозрелых и взрослых животных парасимпатических элементов над симпатическими.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе показано, что в ранний постнатальный период, наряду с парасимпатическими волокнами и ганглиями, в формирующейся поджелудочной железе крыс обнаруживаются тирозингидроксилаза-позитивные симпатические нервные волокна и мелкие тирозингидроксилаза-содержащие клетки, которые, по мнению авторов, являются типичными хромоаффинными клетками симпатoadренальной системы. Используя современные иммуногистохимические методы, подтверждено, что симпатические нейроны в тканях поджелудочной железы отсутствуют, их перикарионы находятся вне органа. Показано, что клетки парасимпатических ганглиев новорожденных крыс представлены молодыми нейронами и нерообластами. В панкреатических ганглиях выявлены два типа нервных окончаний: тирозингидроксилаза-позитивные синаптические терминалы и RGP 9.5-содержащие холинергические синапсы. Установлено, что плотность катехоламинергических структур в поджелудочной железе крысы меняется с возрастом. Интенсивность симпатической иннервации более выражена у новорожденных животных, менее — у половозрелых и очень слабо — у старых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Елецкий Ю.К., Шаширина М.И.* Морфофункциональное состояние холинергической иннервации поджелудочной железы крыс после ваготомии // Бюл. экспер. биол. 1976. Т. 81. № 4. С. 492–494.
- Иванова В.Ф., Пузырев А.А.* Гастроэнтеропанкреатическая эндокринная система // Руководство по гистологии / Под ред. Данилова Р.К. 2-е изд., испр. и доп. СПб.: СпецЛит, 2011. Т. 2. С. 186–203.
- Колос Е.А., Григорьев И.П., Коржевский Д.Э.* Маркер синаптических контактов — синаптофизин // Морфология. 2015. Т. 147. № 1. С. 78–82.
- Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Петрова Е.С. и др.* Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии (руководство). СПб.: СпецЛит, 2014. 119 с.
- Коржевский Д.Э., Колос Е.А.* Белок RGP 9.5 и его использование в качестве функционального маркера

- в нейроморфологии // Мед. акад. журн. 2013. Т. 13. № 4. С. 29–35.
- Кривова Ю.С., Процина А.Е., Черников В.П. и др.* Иммуногистохимическое и электронномикроскопическое исследование глиальных клеток в поджелудочной железе человека у плодов и детей // Бюллетень экперим. биол. и медицины. 2015. Т. 159. № 5. С. 626–630.
- Майстренко Н.А., Чумасов Е.И., Довганюк В.С. и др.* Особенности патоморфоза хронического панкреатита в обосновании хирургических подходов // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 2013. Т. 172. № 4. С. 29–39.
- Ноздрачев А.Д.* Физиология вегетативной нервной системы. Л.: Медицина, 1983. 296 с.
- Ноздрачев А.Д., Чумасов Е.И.* Периферическая нервная система. СПб.: Наука, 1990. 281 с.
- Смиттен Н.А.* Симпато-адреналовая система в филогенезе позвоночных. М.: Наука, 1972. 348 с.
- Чумасов Е.И., Майстренко Н.А., Петрова Е.С. и др.* Морфологическое исследование поджелудочной железы при хроническом панкреатите с использованием иммуногистохимических маркеров // Мед. акад. журн. 2013. Т. 13. № 2. С. 71–77.
- Чумасов Е.И., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э.* Распределение и структурная организация автономных нервных аппаратов в поджелудочной железе крысы (иммуногистохимическое исследование) // Морфология. 2011. Т. 139. № 3. С. 51–58.
- Чумасов Е.И., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э.* Изменение островков и нервных элементов в поджелудочной железе у крысы при старении (иммуногистохимическое исследование) // Морфология. 2015. Т. 148. № 6. С. 64–69.
- Чумасов Е.И., Алексеенко А.Л., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э.* Исследование нервных аппаратов сердца и окологердечной области новорожденной крысы с помощью иммуногистохимических маркеров // Журнал международный вестник ветеринарии. 2016. № 3. С. 84–88.
- Ahrén B.* Autonomic regulation of islet hormone secretion—implications for health and disease // *Diabetologia*. 2000. V. 43. № 4. P. 393–410.
- Borden P., Houtz J., Leach S.D., Kuruvilla R.* Sympathetic innervation during development is necessary for pancreatic islet architecture and functional maturation // *Cell Rep*. 2013. V. 4. № 2. P. 287–301.
- Burris R.E., Hebrok M.* Pancreatic innervation in mouse development and beta-cell regeneration // *Neuroscience*. 2007. V. 150. № 3. P. 592–602.
- Cabrera-Vázquez S.C., Navarro-Tablors V., Sanchez-Solo C. et al.* Remodelling sympathetic innervation in rat pancreatic islets ontogeny // *BMC Dev. Biol*. 2009. V. 9. № 1. P. 34–41.
- Coupland R.E.* The innervation of pancreas of the rat, cat and rabbit as revealed by the cholinesterase technique // *J. Anat*. 1958. V. 92. № 1. P. 143–149.
- Edwards R.H., Rutter W.J., Hanahan D.* Directed expression of NGF to pancreatic beta cells in transgenic mice leads to selective hyperinnervation of the islets // *Cell*. 1989. V. 58. № 1. P. 161–170.
- Falck B., Hellman B.* A fluorescent reaction for monoamines in the insulin producing cells of the guinea-pig // *Acta Endocrinol. (Copenh)*. 1964. V. 45. № 1. P. 133–138.
- Gilon P., Henquin J.C.* Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function // *Endocrine Rev*. 2001. V. 22. № 5. P. 565–604.
- Glebova N.O., Ginty D.D.* Growth and survival signals controlling sympathetic nervous system development // *Annu. Rev. Neurosci*. 2005. V. 28. P. 191–222.
- Gradwohl G., Dierich A., LeMeur M., Guillemot F.* Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. № 4. P. 1607–1611.
- Hahn von Dorsche H., Falkmer S.* Ontogeny of human Langerhans islets. A review of some light- and electron-microscopical, immunohistochemical and functional data on fetal development of the endocrine pancreas // *J. Evol. Biochem. Physiol*. 2000. V. 36. № 6. P. 701–718.
- Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Gilerovich E.G. et al.* Advantages and disadvantages of zinc-ethanol-formaldehyde as a fixative for immunocytochemical studies and confocal laser microscopy // *Neurosci. Behav. Physiology*. 2014. V. 44. № 5. P. 542–545.
- Lammert E., Cleaver O., Melton D.* Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels // *Science*. 2001. V. 294. № 5542. P. 564–567.
- Liu M.T., Kirchgessner A.L.* Guinea pig pancreatic neurons: morphology, neurochemistry, electrical properties, and response to 5-HT // *Am. J. Physiol*. 1997. V. 273. № 1. P. 1273–1289.
- Liu H.P., Tay S.S., Leong S.K.* An ultrastructural study of the innervation of the guinea pig pancreas // *J. Hirnforsch*. 1997. V. 38. № 1. P. 107–117.
- Mei Q., Munding T.O., Lemmark A., Taborsky G.J., Jr.* Early, selective, and marked loss of sympathetic nerves from the islets of BioBreeder diabetic rats // *Diabetes*. 2002. V. 51. № 10. P. 2997–3002.
- Oomori Y., Luchi H., Ishikawa K. et al.* Immunocytochemical study of tyrosine hydroxylase and dopamine beta-hydroxylase immunoreactivities in the rat pancreas // *Histochemistry*. 1994. V. 101. № 3. P. 313–323.
- Persson-Sjögren S., Zashihin A., Forsgren S.* Nerve cells associated with the endocrine pancreas in young mice: an ultrastructural analysis of the neuroinsular complex type I // *Histochemical J*. 2001. V. 33. № 6. P. 373–378.
- Persson-Sjögren S., Holmberg D., Forsgren S.* Remodeling of the innervation of pancreatic islets accompanies insulinitis preceding onset of diabetes in the NOD mouse // *J. Neuroimmunol*. 2005. V. 158. № 1–2. P. 128–137.
- Proshchina A.E., Krivova Y.S., Barabanov V.M., Saveliev S.V.* Ontogeny of neuro-insular complexes and islets innervation in the human pancreas // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2014. V. 5. № 57. P. 1–8.
- Sharkey K.A., Williams R.G.* Extrinsic innervation of the rat pancreas: demonstration of vagal sensory neurones in

- the rat by retrograde tracing // *Neurosci. Lett.* 1983. V. 42. № 2. P. 131–135.
- Salvioli B., Bovara M., Barbara G. et al. Neurology and neuropathology of the pancreatic innervations // *JOP. J. Pancreas (Online)*. 2002. V. 3. № 2. P. 26–33.
- Taborsky G.J., Jr. Islets have a lot of nerve! Or do they? // *Cell Metab.* 2011. V. 14. № 1. P. 5–6.
- Teitelman G., Lee J.K. Cell lineage analysis of pancreatic islet development: glucagon and insulin cells arise from catecholaminergic precursors present in the pancreatic duct // *Dev. Biol.* 1987. V. 121. № 2. P. 454–466.
- Ushiki T., Watanabe S. Distribution and ultrastructure of the autonomic nerves in the mouse pancreas // *Microsc. Res. Tech.* 1997. V. 37. № 5–6. P. 399–406.
- Winer S., Tsui H., Song A. et al. Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive // *Nat. Med.* 2003. V. 9. № 2. P. 198–205.
- Woods S.C., Porte D., Jr. Neural control of the endocrine pancreas // *Physiol. Rev.* 1974. V. 54. № 3. P. 596–619.
- Yi E., Smith T.G., Love J.A. Noradrenergic innervations of rabbit pancreatic ganglia // *Auton. Neurosci.* 2005. V. 117. № 2. P. 87–96.

Age-Related Changes in the Sympathetic Innervation of the Pancreas

E. I. Chumasov^{1,2,*}, E. S. Petrova¹, and D. E. Korzhevskii^{1,3}

¹*Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376 Russia*

²*St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St. Petersburg, 196084 Russia*

³*St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia*

*e-mail: iemmorphol@yandex.ru

Received June 8, 2016; in final form, February 21, 2017

Using immunohistochemical methods, the morphological features of the sympathetic nerve structures in the pancreas of newborn, pubescent, and aging rats have been studied. The neural composition of intramural ganglia has been described. The intramural ganglia were shown to include chromaffin cells. In many ganglia of the pancreas, two types of pericellular nerve apparatuses have been detected simultaneously: tyrosine hydroxylase-containing catecholaminergic synaptic terminals and PGP 9.5-immunopositive cholinergic synapses. It was established that the density of catecholaminergic structures in the pancreas of rats decreases with age.

Keywords: pancreas, tyrosine hydroxylase, immunohistochemistry, postnatal ontogenesis, peripheral nervous system, synaptophysin