

ЦИТОАРХИТЕКТОНИКА ЭНДОКРИНОЦИТОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

¹Дилекова О.В.

¹ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный аграрный университет», Ставрополь, Россия, e-mail: Dilekova2009@yandex.ru

Было проведено иммуногистохимическое исследование поджелудочной железы крупного рогатого скота от 1-суточного до 3-летнего возраста на выявление гормонпродуцирующих клеток – инсулиноцитов, глюкагоноцитов, соматостатиноцитов и РР-клеток, синтезирующих панкреатический полипептид. В результате было выявлено, что в эндокринных островках основным цитотипом являются инсулиноциты количество которых совместно с клетками, секретирующими панкреатический полипептид, с возрастом у животных увеличивается. При этом отмечается снижение глюкагоноцитов и соматостатиноцитов. Количество β -эндокриноцитов в 3-летнем возрасте у животных составляет 75%, α -эндокриноцитов – 13,4%, δ - и РР-эндокриноцитов – по 5,8%. По цитоархитектонике в эндокринных островках у крупного рогатого скота до 1 года четко выделяются гемоцеллюлярная и гетероцеллюлярная зоны, а основным типом островков является плащевой. В 3 года отмечается структурная перепланировка клеток, при которой эндокриноциты перемещаются. α - и β -эндокриноциты имеют полюсное расположение на периферической части островков, что характеризует островки как плащевые биполярные.

Ключевые слова: поджелудочная железа, эндокринные островки, цитоархитектоника, инсулиноциты, глюкагоноциты, соматостатиноциты, РР-клетки.

CYTOARCHITECTONICS ENDOCRINE PANCREAS CATTLE IN POSTNATAL ONTOGENESIS

¹Dilekova O.V.

¹Stavropol State Agrarian University, Stavropol, Russia, e-mail: Dilekova2009@yandex.ru

Immunohistochemical study of the pancreas of cattle from 1-day to 3-years to identify cells insulin cells, glucagon cells, somatostatin cells and pp-cells produce pancreatic polypeptide. As a result, it was found that the endocrine islets of the main cytological views are insulin cells and pancreatic polypeptide. Their number increases with age. Occurs a reduction glucagon cells and somatostatin cells. The number of β -endocrinocytes a 3-year-old animal is 75%, α -endocrinocytes -13.4%, δ -and PP-endocrinocytes - 5.8%. In the endocrine islets of cattle up to 1 year clearly distinguished gemocellular and geterocellular area, and the main type of islets is the cloak. In 3 years, there has been a structural rearrangement cells in which the endocrinocytes moved. α -and β -endocrinocytes the located on the opposite poles of endocrine islets in the peripheral part. Endocrine islets are of the form cloak and bipolar.

Keywords: endocrine pancreas, islets, cytoarchitectonics, insulin cells, glucagon cells, somatostatin cells, PP-cells.

Поджелудочная железа, благодаря гормональной функции, принимает участие в формировании адаптивных реакций не только к изменяющимся параметрам внешней среды, но и является звеном общего адаптивного комплекса организма, который реагирует на изменение гомеостаза. Локальные изменения уровня инсулярных гормонов могут быть морфологической основой изменений экзокринной части поджелудочной железы [2, 7].

Для млекопитающих животных характерно наличие четырех типов эндокриноцитов, присутствующих в панкреатических островках поджелудочной железы и синтезирующих гормоны. Самые многочисленные клетки – это β -клетки или инсулиноциты, синтезирующие инсулин, значительно меньшее количество занимают α -клетки или глюкагоноциты, синтезирующие глюкагон, в единичном количестве присутствуют δ – клетки или

соматостатиноциты синтезирующие соматостатин и РР-клетки синтезирующие панкреатический полипептид. Имеются также единичные сведения о популяциях гормонпродуцирующих клеток в экзокринной части поджелудочной железы [1, 5].

Использование иммуногистохимических методов выявления цитоархитектуры и видового состава эндокриноцитов, их соотношения в экзокринной и эндокринной частях поджелудочной железы таких млекопитающих как человек, приматы, мыши, свиньи, нутрии позволило выявить не только межвидовые, но и возрастные их различия у особей [4, 10, 11]. Сведения структурного строения, клеточного состава эндокриноцитов поджелудочной железы крупного рогатого скота в настоящее время отсутствуют.

Цель настоящей работы – иммуногистохимическое исследование структурного строения, клеточного состава и количественных показателей эндокриноцитов панкреатических островков, а также выявление и изучение эндокриноцитов и их скоплений, диффузно распределенных в экзокринной части поджелудочной железы крупного рогатого скота в постнатальном онтогенезе.

Материал и методы. В работе исследована поджелудочная железа крупного рогатого скота айширской породы. Для исследований было отобрано 15 голов клинически здоровых животных в разные периоды постнатального онтогенеза: 1-суточные, 1-, 3-, 6-месячные и в возрасте 1 и 3 года (по 3 животных в каждой возрастной группе). Убой животных проводился в соответствии с Директивой 2010/63/EU ЕВРОПЕЙСКОГО ПАРЛАМЕНТА И СОВЕТА ЕВРОПЕЙСКОГО СОЮЗА по охране животных, используемых в научных целях.

У каждого животного проводили отбор целой поджелудочной железы, которую фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине. В области головки железы вырезали кусочки размером 1см³. Материал проводили с использованием гистологического процессора замкнутого типа Tissue-Tek VIP™ 5 Jr (Sakura (Япония)), а затем заливали в гистологическую среду «Гистомикс» (БиоВитрум (Россия)) на станции парафиновой заливки Tissue-Tek® TEC™ 5 (Sakura (Япония)). Из полученных блоков делали гистологические срезы толщиной 5 - 7 мкм.

Для иммуногистохимических реакций использовали антитела к гормонам поджелудочной железы: моноклональные мышьиные антитела к инсулину клон К36аС10 (Diagnostic BioSystems, Нидерланды 1:25 – 1:50), поликлональные кроличьи антитела к глюкагону (SpringBioScience, США), поликлональные кроличьи антитела к соматостатину (MONOSAN, Нидерланды) и кроличьи поликлональные антитела к панкреатическому полипептиду (DCS, Германия 1:25 – 1:50). Негативным контролем служили реакции с заменой первых антител раствором для разведения (SpringBioScience, США).

При проведении иммуногистохимических реакций депарафинированные и гидратированные срезы обрабатывали 3% раствором H_2O_2 в течение 10 мин. для блокирования эндогенной пероксидазы. Затем срезы подвергали высокотемпературной обработке в 0,01М цитратном буфере (pH 6,0) в течение 40 мин. Инкубация срезов с первичными антителами на инсулин, глюкагон, соматостатин и панкреатический полипептид проводили во влажной камере при температуре $27^{\circ}C$ в течение 24 часов. Со вторыми козьими антителами инкубацию проводили в течени 60 минут во влажной камере при температуре $27^{\circ}C$. После инкубации применяли высокочувствительную систему визуализации Reveal biotin-free polyvalent DAB (SpringBioScience, США). Микроскопию срезов проводили на световом микроскопе Olympus BX45 со встроенным фотоаппаратом.

С каждого препарата поджелудочной железы окрашенного позитивно на гормоны поджелудочной железы, выполняли по 10 цифровых снимков (в формате jpg, размером 3136×2352 пикселей в палитре 24 бит) случайно выбранных полей зрения при увеличении $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$ и $\times 1000$. Визуально при увеличении объектива $\times 200$ проводили подсчет позитивно окрашенных островков, и их клеток – β -, α -, δ -, и PP- при увеличении $\times 1000$.

Результаты исследований. У 1-суточных телят при иммуногистохимических исследованиях при увеличении $\times 200$ в дольке железы насчитывается от 5 до 13 панкреатических островков различных размеров, в которых клетки имеют позитивную реакцию на инсулин, глюкагон, соматостатин и панкреатический полипептид.

β -эндокриноциты в островке образуют клеточные скопления и расположены в основном по периферии в виде незамкнутых колец. Количество их в островке составляет от 4 до 22. Одновременно визуализируется значительное количество островков состоящих полностью их β -эндокриноцитов, позитивная реакция на глюкагон, соматостатин и панкреатический полипептид в них отсутствовала. Количество α -эндокриноцитов в островке составляет от 1 до 19 клеток. Они расположены диффузно между β -эндокриноцитами по периферии островка, но сосредоточены только на одном из его полюсов. δ -эндокриноциты расположены на границе с кровеносными капиллярами, оплетающими островок, в виде замкнутой цепочки клеток, лежащих в один ряд. Количество клеток варьирует от 2 до 19. PP-эндокриноциты расположены в островке диффузно в центральной его части. Их количество немногочисленное и составляет от 1 до 3 клеток.

Кроме островков β -, δ -, и PP-эндокриноциты были отмечены и в экзокринной части железы. β -, и PP-эндокриноциты встречаются как одиночные, так и в количестве от 2 до 4. Визуализируются чаще всего они в междольковых выводных протоках между эпителиоцитами и среди панкреатоцитов ацинусов экзокринной части железы. δ -клетки чаще одиночные и наблюдаются между панкреатоцитами ацинусов.

В 1-месячном возрасте у телят количество эндокринных островков остается на прежнем уровне и составляет от 5 до 13. Отмечается появление островков в которых регистрируется перемещение скоплений β -эндокриноцитов от периферии в центральную часть. Имеются единичные островки уже с центральным расположением инсулин позитивных клеток. Количество β -эндокриноцитов в этом возрасте увеличивается и составляет от 10 до 26 клеток. α -эндокриноциты не претерпевают структурных перемещений по отношению к островку, количественный их состав остается на прежнем уровне. δ -эндокриноциты в количественном составе снижаются и составляют от 5 до 10 клеток. Располагаются они преимущественно в центре островка в виде скоплений. Количество PP-эндокриноцитов в этом возрасте увеличивается и равно от 3 до 7, расположение клеток остается на прежнем уровне в центре островка.

Наряду с вышеописанным продолжают обнаруживаться единичные небольшие кластеры и одиночные клетки, лежащие в экзокринной части железы и состоящие из β -, и PP-эндокриноцитов. δ -эндокриноциты в 1-месячном возрасте телят вне островков выявлены не были. Отмечается появление одиночных и редких α -эндокриноцитов между ацинусами панкреатоцитов.

В 3-месячном и 6-месячном возрастах количество эндокринных островков в дольках резко снижается и составляет от 2 до 6. Визуализируются островки, в которых β -эндокриноциты расположены в основном в центральной части или смещены на один полюс островка. В 3-месячном возрасте количество инсулин позитивных клеток составляет от 3 до 41, а в 6-месячном – от 5 до 34. α -эндокриноциты продолжают располагаться диффузно на периферии островка, занимая один из его полюсов. Количество их в 3-месячном возрасте равно от 4 до 20, в 6-месячном от 4 до 22. δ -эндокриноциты в обеих возрастных группах составляют от 2 до 15 клеток в 3-месячном возрасте и от 2 до 13 в 6-месячном. Расположены они в основном диффузно по всему периметру островка, однако встречаются единичные островки, в которых клетки лежат поодиночке, повторяя рисунок расположения у 1-суточных телят. PP-эндокриноциты в 3-месячном возрасте составляют от 3 до 10 клеток, в 6-месячном – от 4 до 8. Отмечается, что единичные клетки в 6-месячном возрасте из центра переходят на периферию островка и находятся на границе с экзокринной частью и кровеносными капиллярами, оплетающими эндокринный островок.

В экзокринной части железы у телят в 3-месячном и 6-месячном возрасте наблюдаются единичные β -, α -, δ - и PP-эндокриноциты, лежащие между панкреатическими ацинусами. Единичные β - и PP-эндокриноциты иногда просматриваются вокруг междольковых выводных протоков.

В возрасте 1 года у крупного рогатого скота количество островков уменьшается и составляет в дольке железы от 1 до 2, к 3-летнему возрасту количество островков увеличивается и равно от 1 до 7. β -эндокриноциты в островке расположены диффузно и занимают периферическое положение. Количество инсулин позитивных клеток в годовалом возрасте составляет от 4 до 24 клеток, а к 3-летнему возрасту увеличивается от 7 до 39. Количественный состав α - и δ -эндокриноцитов по сравнению с вышеописанными возрастными существенно снижается, но остается на одном уровне от 1-года до 3-лет. Так, количество α -эндокриноцитов в годовалом возрасте составляет от 4 до 10 клеток, δ -эндокриноцитов – от 1 до 5, в 3-летнем возрасте – от 4 до 7 и от 1 до 3 соответственно. α -эндокриноциты лежат у одного из полюсов островка. δ -эндокриноциты расположены поодиночке, занимают центральное положение в островке. Просматриваются островки с одиночными соматостатин позитивными клетками, которые расположены на периферии островка. Количество PP-эндокриноцитов от годовалого возраста до 3-лет существенно уменьшается и составляет от 1 до 3. Расположены клетки диффузно. Встречаются островки, в которых клетки лежат в зоне перехода эндокринной части в экзокринную (Рис. 1, 2).

В экзокринной части железы в годовалом и 3-летнем возрасте встречаются только β -, δ - и PP-эндокриноциты, которые лежат поодиночке между панкреатическими ацинусами.

Обсуждение полученных данных. При иммуногистохимическом исследовании поджелудочной железы крупного рогатого скота от 1-суточного до 3-летнего возраста нами были выявлены некоторые особенности цитоархитектоники эндокриноцитов железы.

По данным Весниной И. А. (2001), Пузырева А. А. (2003) в поджелудочной железе у различных представителей позвоночных эндокринные островки состоят из 4 типов эндокриноцитов – β -, α -, δ - и PP-. Основным цитотипом являются инсулинообразующие клетки. Результаты наших исследований наглядно демонстрируют наличие вышеописанных клеток у крупного рогатого скота в составе эндокринных островков поджелудочной железы. Наибольшее количество в островке составляют β -эндокриноциты, содержание которых в 1-суточном возрасте составляет 35%, а к 3 годам увеличивается до 75%. Вторыми по количественному составу являются α - и δ -эндокриноциты, которые в 1-суточном возрасте составляют по 30%. Однако к 3-летнему возрасту количество их уменьшается. Так, содержание α -эндокриноцитов уменьшается до 13,4%, а δ -эндокриноцитов – до 5,8% от общего содержания клеток в островке. Самыми малочисленными клетками являются PP-эндокриноциты, количество которых в 1-суточном возрасте составляет 4,6% и 5,8% в 3-летнем возрасте крупного рогатого скота. Увеличение количества β -эндокриноцитов в постнатальном онтогенезе наблюдала Можейко Л. А. (2004) у кроликов. По ее данным, клеточный состав островков претерпевает наиболее сложную трансформацию, особенно

увеличивается содержание β -клеток, что связано с меняющимися адаптивными условиями существования и питания, когда происходит совершенствование существующих структур для реализации возможности полноценного функционирования органа в качественно новых условиях. Относительно сведений о количественных изменениях α -, δ - и PP-эндокриноцитов в постнатальном онтогенезе у животных и человека мы в доступной литературе не нашли. По нашему мнению, снижение α - и δ -эндокриноцитов у крупного рогатого скота к 3-летнему возрасту связано с их угнетающими эффектами на экзокринную часть железы, что приводит к уменьшению выработки ферментов, снижению расщепления белков и всасыванию аминокислот в кишечнике. Увеличение количества PP-эндокриноцитов связано с их функцией – регуляцией выработки панкреатического сока, а также фермента амилазы.

По цитоархитектонике, основным типом островков у крупного рогатого скота до 1 года постнатального онтогенеза является плащевой. В них по расположению клеток выделяются зоны: гемоцеллюлярная (центральная) в которой лежат β - и PP-эндокриноциты и гетероцеллюлярная (периферическая) содержащая α - и δ -эндокриноциты. Однако в 3 года отмечается структурная перепланировка клеток. Из гемоцеллюлярной зоны β -эндокриноциты перемещаются в гетероцеллюлярную, δ - и PP-эндокриноциты просматриваются как в центральной, так и в периферической части островков, α -эндокриноциты не меняют своего местоположения. Вышеописанные изменения полюсного расположения β - и α -эндокриноцитов в островке характеризуют их как плащевых биполярных. Из литературных источников известно, что плащевой тип эндокринных островков встречается у грызунов и кроликов Можейко Л. А. (2004, 2011), причем расположение β -эндокриноцитов центральное, сгруппированы они в инсулиновое ядро. У человека и приматов расположение эндокриноцитов мозаичное, однако Ульяновская С. А. (2013), Vocian-Sobkowska J. (1999), Кривова Ю. С. (2009), изучая развитие и цитодифференцировку островков Лангерханса у плодов человека, выявили, что островки с 20 недели развития плода относятся к биполярному типу. Начиная с 34-недели развития α - и β -клетки меняют свою структурную организацию. Происходит их перераспределение и формирование островков мозаичного типа.

Таким образом, изменения организации эндокринных островков на различных этапах постнатального онтогенеза могут рассматриваться как адаптивные в связи с совершенствованием существующих структур для реализации возможности полноценного функционирования органа. Изучение механизмов становления в постнатальном онтогенезе эндокринного аппарата поджелудочной железы – одного из звеньев эндокринной системы – имеет общебиологическое значение, так как дополняет имеющиеся сведения об ее уникальных свойствах.

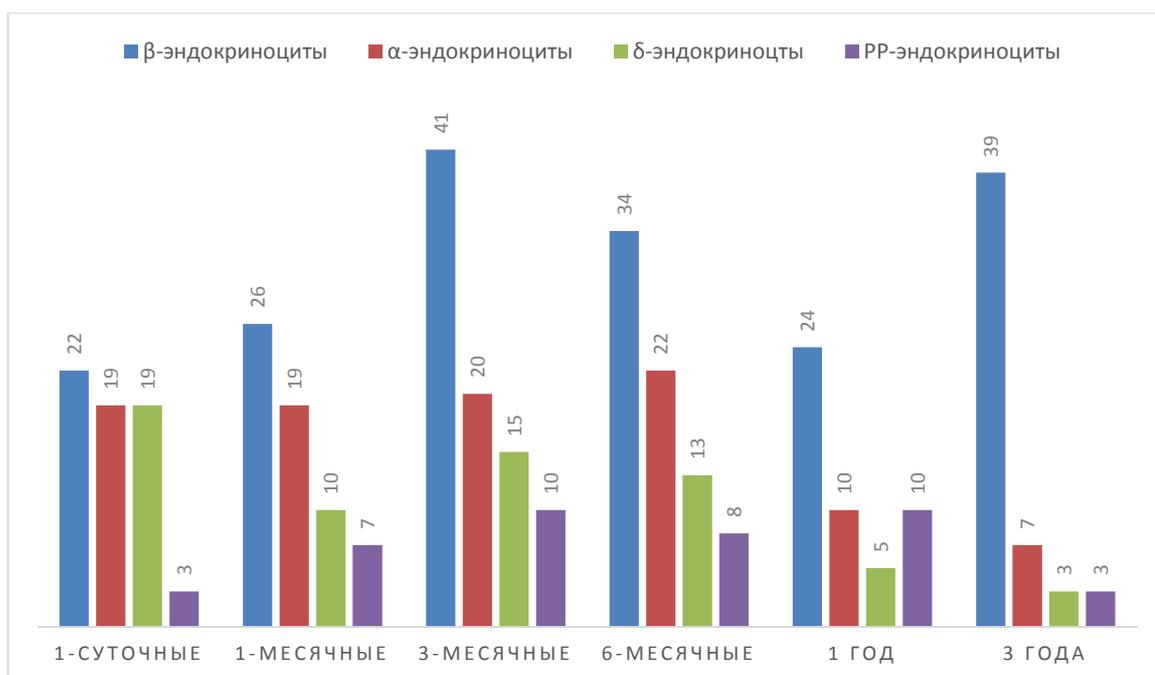


Рис. 1. Количественный состав эндокриноцитов в эндокринных островках крупного рогатого скота в постнатальном онтогенезе

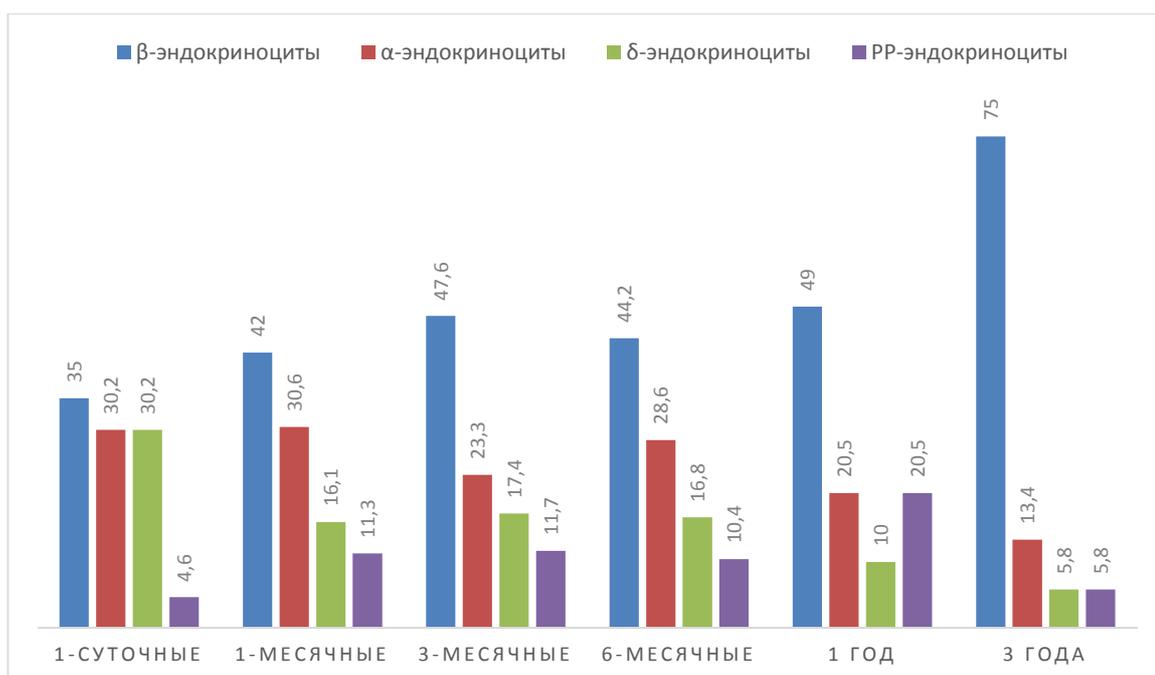


Рис. 2. Процентное соотношение эндокриноцитов в эндокринных островках крупного рогатого скота в постнатальном онтогенезе

Список литературы

1. Веснина И.А. Дифференцировка и цитогенез эндокриноцитов поджелудочной железы в условиях физиологической и нарушенной жизнедеятельности: Автореф. дис. канд. мед. наук. – СПб., 2001. – 18 с.

2. Можейко Л.А. Цитофункциональные параметры эндокринного аппарата поджелудочной железы в возрастном аспекте // Журнал Гродненского государственного медицинского университета – 2004. - №. 4 (8). – С. 7-11.
3. Можейко Л.А., Беленинова А.С. Морфофункциональная оценка эндокринного аппарата поджелудочной железы потомства крыс, родившихся в условиях холестаза // Журнал Гродненского государственного медицинского университета – 2011. - №. 1 (33). – С. 46-48.
4. Нейроэндокринные комплексы в поджелудочной железе нутрии (*Myocastor coypus*) (иммуногистохимическое исследование) / Ю.С. Кривова [и др.] // Морфология. – 2009. – Т.135, №. 3. – С. 59-62.
5. Прощина А.Е., Савельев С.В. Иммуногистохимическое исследование распределения α - и β -клеток в разных типах островков Ларгенганса поджелудочной железы человека // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – Изд. РАМН, 2013. – Т. 155, №. 6. – С. 763-767.
6. Пузырев А.А., Иванова В.Ф., Костюкевич С.В. Закономерности цитогенеза эндокринной гастроэнтеропанкреатической системы позвоночных // Морфология. – 2003. Т.124, №. 4. – С. 11-19.
7. Трухачев В.И., Орбец В.А., Позов С.А., Беляев В.А., Орлова Н.Е. Средства и методы диагностики и терапии внутренних болезней: учеб.-метод. пособие / Ставропольский государственный аграрный университет. – М.: Колос; Ставрополь: АГРУС, 2009. – 320 с.
8. Ульяновская С.А. Пренатальный и ранний постнатальный морфогенез поджелудочной железы человека // Фундаментальные исследования. – 2013. - №. 9. – С. 530-534.
9. Vocian-Sobkowska J., Zabel M., Wozniak W. Polygormonal aspect of the endocrine cells of the human fetal pancreas // Histochem-Cell-Biol. – 1999. Aug. 112 (2). – P. 147-153.
10. Maake C. and Reniecke M. Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor 1 and 2 in the endocrine pancreas of rat, dog, man end their coexistence with classjcal islet hormones // Cell Tissue Res. – 1993. Vol. 273. №. 2. – P. 249-259.
11. Jeon J., Correa-Medina M., Ricordi C., Edlund H., Diez J.A. Endocrine cell clustering during human pancreas development // J HistochemCytochem. – 2009. – Vol. 57. №. 9. – P. 811-824.

Рецензенты:

Квочко А.Н., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой физиологии, хирургии и акушерства ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный аграрный университет», г. Ставрополь;

Криворучко А.Ю., д.б.н., генеральный директор ООО НПО «Региональный центр Ветеринарной медицины», г. Ставрополь.