Федеральное агентство научных организаций Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт морфологии человека»

на правах рукописи

Прощина Александра Евгеньевна

МОРФОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ ЭНДОКРИННОЙ ЧАСТИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация

на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор С.В.Савельев

MOCKBA – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	•••
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	••••
1.1 Морфологическая организация поджелудочной железы	
1.2 Становление эндокринной части поджелудочной железы	В
онтогенезе	
1.3 Иннервация поджелудочной железы	· • • •
1.3.1 Общие сведения	
1.3.2 Иннервация поджелудочной железы в пренатально	ЭМ
онтогенезе	
1.3.3 Нейро-инсулярные комплексы	.
1.3.4 Общие свойства эндокринных клеток поджелудочной железы	ίИ
клеток нервной системы	••••
1.4 Типы нарушений углеводного обмена	
1.4.1Сахарный диабет 1 типа	.
1.4.2 Сахарный диабет 2 типа	· • • •
1.4.3 Диабетическая фетопатия	
1.5 Заключительные положения обзора литературы	
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.	•••
2.1 Характеристика материала	•••
2.2 Методы	
2.2.1 Гистологическое исследование	· • • •
2.2.2 Иммуногистохимическое исследование	
2.2.3 Микроскопическое исследование гистологических	И
иммуногистохимических препаратов	· • • •
2.2.4 Морфометрическое исследование гистологических	И
иммуногистохимических препаратов	,
2.2.5 Определение концентрации в периферической крог	

глюкагона, С-пептида и антител к инсулину	
2.2.6 Статистический анализ	
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
3.1 Распределение гормон-содержащих клеток в эндокринной части	
поджелудочной железы человека	
3.1.1 Морфогенез эндокринной части поджелудочной железы в	
пренатальном периоде развития человека	
3.1.2 Распределение гормон-содержащих клеток в эндокринной	
части поджелудочной железы взрослых людей	
3.1.3 Морфометрические параметры организации эндокринной части	
поджелудочной железы	
3.2 Распределение пан-нейральных маркеров в поджелудочной	
железе человека	
3.2.1 Локализация пан-нейральных маркеров в структурах нервной	
системы поджелудочной железы человека	
3.2.2 Нейро-инсулярные комплексы поджелудочной железы в пре- и	
постнатальном онтогенезе человека	
3.2.3 Распределение NSE в эндокринной части поджелудочной	
железы	
3.2.4. S100+клетки в эндокринной части поджелудочной железы	
человека	
3.3 Особенности организации эндокринной части поджелудочной	
железы взрослых людей с нарушениями углеводного обмена и	
плодов от матерей с сахарным диабетом	
3.3.1 Морфо-функциональные особенности поджелудочной железы	
человека при нарушениях углеводного обмена	
3.3.2 Формы структурной организации эндокринной части	
поджелудочной железы при нарушениях углеводного	
обмена	

4 ОБСУЖДЕНИЕ	139
4.1 Морфогенетическая пластичность организации эндокринной	
части поджелудочной железы	139
4.2 Пластичность цитоархитектоники и клеточного состава	
эндокринной части поджелудочной железы	148
4.3 Источники происхождения новых клеток для роста островков и	
возобновления их популяции	166
4.4 Другие проявления пластичности эндокринной части	
поджелудочной железы	174
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	182
ВЫВОДЫ	186
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	189
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	190
ПРИЛОЖЕНИЕ	235

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы

Проблема пластичности эндокринной части поджелудочной железы (ПЖ) является олной ИЗ актуальнейших В современной морфологии. Пол понимают способность тканей пластичностью изменять структурнофункциональную организацию под влиянием экзогенных и эндогенных факторов. Эти изменения могут быть как приспособительными, компенсаторными, так и патологическими (Крыжановский Г.Н. Дизрегуляционная патология: Руководство для врачей и биологов, М.: "Медицина", 2002).

Долгое время считалось, что возможности ответа эндокринной части ПЖ на изменения в потребности инсулина организмом ограничены. В настоящее время появились доказательства ее пластичности. Основное внимание в работах, посвященных этому вопросу, уделяется В-клеткам, секретирующим инсулин (Аметов А.С., 2008; Bernard-Kargar C., Ktorza A., 2001; Bonner-Weir S., 2001; Chabra P. et al., 2011). Их количество изменяется под влиянием целого ряда физиологических параметров. Например, оно увеличивается при беременности и ожирении, а также при нормальном физиологическом росте (Кагат J.H., Grodsky G.M., Forsham P.H., 1968; Bonner-Weir S., 1994). В литературе пластичность В-клеток ПЖ обычно связывают с процессами пролиферации, клеточной гибели, неогенеза и изменения объема клеток, при этом механизмы изменения их количества до сих пор не достаточно изучены (Аметов А.С., 2008; Bernard-Kargar C., Ktorza A., 2001; Bonner-Weir S., 2001; Chhabra P. et al., 2011; Ziv O., Glaser B., Dor Y., 2013).

Однако эндокринная часть ПЖ состоит не только из В-клеток, но содержит еще несколько видов эндокриноцитов. Эндокринные клетки ПЖ сгруппированы в образования, называемые панкреатическими островками. Сведения о клеточном

составе, цитоархитектонике панкреатических островков у человека и вкладе различных видов гормон-секретирующих клеток в пластичность эндокринной части ПЖ противоречивы. До сих пор окончательно не решен вопрос о механизмах и последовательности формирования островков у человека (Кривова Ю. С., 2010; Jeon J. et al., 2009). Также недостаточно изучены изменения, возникающие в эндокринной части ПЖ в процессе нормального пре- и постнатального развития, в том числе, при старении, и при нарушениях углеводного обмена (Abdulreda M.H. et al., 2016). В связи с вышеизложенным изучение морфогенетической пластичности эндокринной части ПЖ является актуальной задачей.

На эндокринную часть ПЖ оказывает влияние также состояние экзокринной части ПЖ, кровеносной, лимфатической и нервной систем. Например, согласно некоторым авторам, структуры нервной системы являются первой мишенью аутоиммунной атаки при сахарном диабете 1 типа (Persson-Sjögren S., Zashihin A. and Forsgren S., 2001; Saravia F. and Homo-Delarche F., 2003; Winer S. et al., 2003;). В то же время относительно мало известно об иннервации островков ПЖ, особенно у человека (Rodriguez-Diaz R. et al., 2011).

Исследование механизмов компенсаторного ответа на увеличение потребности в инсулине чрезвычайно важно для понимания патогенеза сахарного диабета (СД) и разработки новых подходов к терапии этого заболевания. СД – очень широко распространен, он занимает третье место среди непосредственных причин смерти после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. Официальный показатель распространенности СД в Российской Федерации (85 регионов РФ) на 01.01.2015 г. – 4,094 млн больных, что составляет 2,8% населения РФ (на 01.01.2015 г. по оценке Росстата в РФ было зарегистрировано 146 310 418 постоянных жителей) (Дедов И.И., Шестакова М.В., Викулова О.К., 2015). Однако по данным международной диабетической ассоциации, в России на 2013 год насчитывалось около 11 000 000 человек, страдающих сахарным диабетом. При этом большая часть людей больна диабетом 2 типа, который долгое время может оставаться недиагностированным (IDF Diabetes Atlas, 6-th edition, Brussels, International Diabetes Federation, 2013). По прогнозам, к 2020 году число лиц, страдающих сахарным диабетом 1 и 2 типа (СД1 и СД2), составит во всем мире свыше 300 000 000 (Балаболкин М. И., Клебанова Е. М., Креминская В. М. Лечение сахарного диабета и его осложнений: Учеб. Пособие. М.: ОАО «Издательство «Медицина»», 2005; Assmann A., Hinault Ch., Kulkarni R. N., 2009). По данным международной федерации диабета к 2030 году около 10 процентов взрослого населения Земли будет страдать сахарным диабетом 1 или 2 типа. Количество заболевших составит около 522 миллионов человек. По сравнению с текущими показателями, смертность от него возрастет вдвое (IDF Diabetes Atlas, 5-th edition, Brussels, International Diabetes Federation, 2011).

В настоящее время накоплены доказательства того, что эффективный контроль течения СД может свести до минимума или предотвратить многие его осложнения. Однако, наряду с дальнейшим улучшением метаболического контроля, по-прежнему важной остается задача изучения фундаментальных основ болезни, определение риска развития сахарного диабета и его осложнений (Аметов А.С., Грановская-Цветкова А.М., Казей Н.С. Инсулиннезависимый сахарный диабет: Основы патогенеза и терапии., М.: Российская медицинская академия Минздрава России, 1995; Балаболкин М.И., Клебанова Е. М., Креминская В. М., 2005; Дедов И.И. и др., 2016). Колоссальные экономические затраты и социальный ущерб, связанные с высокой распространенностью сахарного диабета, ранней инвалидизацией и смертностью (Дедов И.И., Шестакова М.В., Викулова О.К., 2015; Дедов И.И. и др., 2016), обусловливают необходимость разработки методов возобновления естественного пула В-клеток для восстановления нормальной функции эндокринной части поджелудочной железы. Поэтому сейчас ведется разработка методов лечения СД при помощи пересадки ПЖ, островков или В-клеток островков ПЖ или конструкций, функционирующих на принципах гормональной регуляции углеводного обмена (Дедов И.И., Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., 2004). После введения свежевыделенных островков пациенты перестают нуждаться в инсулине. Однако этот положительный эффект после года сохраняется только у 44% пациентов, а после 5 лет - меньше, чем у 10 (Дедов И.И., Лисуков И.А., Лаптев Д.Н., 2014; Wang P., Medarova Z.A., 2011). Причины потери функции трансплантатом недостаточно ясны. Для выделения подходящих для трансплантации островков также необходимы детальные сведения об их физиологических и биохимических параметрах, клеточном составе, васкуляризации, иннервации.

Также перспективны поиски прогениторных клеток и эксперименты со стволовыми клетками, но источники происхождения эндокринных клеток ПЖ требуют уточнения (Chabra P. et al., 2011; Ziv O., Glaser B., Dor Y., 2013).

Приведенный выше краткий обзор актуальности и степени разработанности темы пластичности эндокринной части ПЖ, обусловливает необходимость детального изучения ее морфогенетических основ на различных уровнях. Это, помимо решения фундаментальных задач, приведет к более ясному пониманию патогенеза СД и разработке новых подходов к лечению этого заболевания.

Цели и задачи исследования

Целью исследования было изучить морфогенетическую пластичность эндокринной части поджелудочной железы человека в пре- и постнатальном онтогенезе и при нарушениях углеводного обмена. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- 1. Исследовать проявления пластичности в формировании и распределении разных типов структурной организации поджелудочной железы человека в развитии.
- 2. Провести анализ клеточного состава разных типов организации эндокринной части поджелудочной железы в пре- и постнатальном периодах онтогенеза.
- 3. Выявить проявления пластичности клеточной композиции островков поджелудочной железы человека.
- 4. Изучить нейроэндокринные взаимодействия в разные сроки развития поджелудочной железы человека. Реконструировать трехмерную структуру

интеграции эндокринных клеток поджелудочной железы с структурами периферической нервной системы.

5. Проанализировать морфофункциональные изменения эндокринной части поджелудочной железы у людей, страдающих сахарным диабетом 1 и 2 типов, и у плодов от матерей с сахарным диабетом различного генеза.

Научная новизна

Впервые охарактеризована морфогенетическая пластичность эндокринной части поджелудочной железы в пре- и постнатальном развитии человека и при сахарном диабете 1 и 2 типов. Установлено, что панкреатические островки всех типов обладают упорядоченной цитоархитектоникой. Распределение и количество А-, В- и D-клеток в островках поджелудочной железы человека определяется их размерами и степенью васкуляризации.

У взрослых людей описаны клетки с колокализацией инсулина и глюкагона в островках Лангерганса, что свидетельствует о неоднородности популяции инсулин- и глюкагон-содержащих клеток.

Получены новые данные о возрастной перестройке эндокринной части ПЖ, характеризующейся увеличением плотности распределения и размеров островков Лангерганса, изменением их цитоархитектоники и соотношения разных видов эндокриноцитов в процессе старения.

Впервые проведен количественный анализ нейроинсулярных комплексов I (островки, интегрированные с нервными ганглиями) и II (островки, связанные с нервными волокнами) типов в пре- и постнатальном развитии человека. Их наибольшая плотность выявлена в плодном периоде, во время активного морфогенеза островков. На основе трехмерных реконструкций впервые выявлены смешанные и переходные формы нейроинсулярных комплексов.

Обнаружено два вида S100-содержащих клеток в островках поджелудочной железы человека. Клетки, расположенные на периферии островков, имеют длинные отростки и являются частью нейроинсулярных комплексов. Более

крупные S100-позитивные клетки, расположенные внутри островка, не имеют отростков и не отличаются по своему строению от эндокринных клеток.

Получены новые данные об изменениях эндокринной части поджелудочной железы у взрослых людей в процессе развития сахарного диабета 1 и 2 типов. При нарушениях углеводного обмена возрастает относительное количество островков диаметром больше 200 мкм с повышенным содержанием А- и D-клеток, что объясняет сдвиг их процентного содержания по отношению к В-клеткам в сторону увеличения у лиц, страдающих СД.

Научно-практическая значимость

Выявленые закономерности морфогенетической пластичности эндокринной части поджелудочной железы человека в пренатальном развитии, процессе старения и при сахарном диабете и сформулированные на основе анализа этих закономерностей выводы являются фундаментальными и способствуют лучшему пониманию причин возникновения и характера течения нарушений углеводного обмена.

При проведении трансплантации островков лицам, страдающим сахарным диабетом следует учитывать сведения о различии цитоархитектоники островков в зависимости от их размера. Наиболее крупные островки поджелудочной железы не целесообразно использовать для трансплантации из-за высокой степени васкуляризации и повышенного содержания в них глюкагон- и соматостатин-содержащих клеток.

У части пациентов с длительно текущим сахарным диабетом 1 типа выявлена секреция инсулина, что свидетельствует о том, что у них сохраняется или восстанавливается популяция В-клеток. Эти данные необходимо учитывать при разработке новых подходов к терапии сахарного диабета 1 типа.

Тесная интеграция развивающихся островков с нервной системой открывает перспективы разработки принципиально новых подходов к коррекции нарушений

углеводного обмена с учетом роли нейроэндокринных взаимодействий на секрецию гормонов и формирование островков.

Полученные новые сведения о закономерностях морфогенеза эндокринной части поджелудочной железы в пре- и постнатальном онтогенезе человека и при нарушениях углеводного обмена могут быть использованы при обучении студентов на кафедрах медико-биологического профиля по специальностям гистология, цитология, эмбриология, физиология и эндокринология.

Положения, выносимые на защиту

- 1. Эндокринная часть поджелудочной железы у человека имеет несколько основных форм структурной организации, отличающихся по числу и расположению в них эндокринных клеток. Островки поджелудочной железы каждого типа у человека характеризуются выраженной упорядоченной цитоархитектоникой. Распределение и количество А-, В- и D-клеток зависит от размеров островков и их васкуляризации.
- 2. У взрослых людей, не страдающих нарушениями углеводного обмена, преобладают островки плащевого типа диаметром меньше 100 мкм. При старении и при нарушениях углеводного обмена различного генеза возрастает относительное количество смешанных островков диаметром больше 200 мкм. При длительном течении сахарного диабета 1 типа характерным является снижение секреции инсулина и глюкагона, при этом у части пациентов сохраняется популяция В-клеток.
- 3. В поджелудочной железе человека структуры нервной и эндокринной систем интегрированы и образуют нейроинсулярные комплексы. Плотность их распределения выше в плодном периоде во время активного морфогенеза островков.
- 4. Пластичность эндокринной части поджелудочной железы человека проявляется в процессе развития, при старении и нарушениях углеводного обмена в изменении плотности распределения разных форм ее структурной организации

и их соотношения, а также в изменении клеточного состава панреатических островков.

Диссертация соответствует Паспорту научной специальности 03.03.04 Клеточная биология, цитология, гистология согласно пунктам 1, 2, 3, 5 и 6.

Методология и методы исследования.

Методологически работа заключалась в системном подходе и комплексном анализе научных трудов как отечественных, так и зарубежных авторов, которые изучали строение и функцию эндокринной части поджелудочной железы человека и животных в нормальном развитии и при нарушениях углеводного обмена, и результатов работ полученными сравнением ИХ c данными, ходе диссертационного исследования. В работе использованы следующие методы: гистологическое И иммуногистохимическое окрашивание, световая, конфокальная флуоресцентная микроскопия, конкурентный И иммуноферментный и иммунорадиометрический анализ, морфометрические и статистические методы.

Внедрение результатов исследования.

Результаты исследования внедрены в лекционные курсы и семинарские занятия на факультете Биоинженерии и Биоинформатики Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова. Выявленные в работе сведения о закономерностях морфогенеза эндокринной части поджелудочной железы в пре- и постнатальном онтогенезе человека и при нарушениях углеводного обмена используются в работе патологоанатомического отделения ГБУЗ МО «Московский областной НИИ акушерства и гинекологии».

Степень достоверности и апробация работы

Степень достоверности результатов проведенных исследований подтверждается проработкой источников литературы по теме диссертации, использованием современных апробированных методов исследования, значительным объемом данных для каждой исследуемой группы, адекватным применением методов статистического анализа.

Основные положения и результаты диссертационной работы доложены и Всероссийской конференции с международным на «Заболевания поджелудочной железы» (2007), VIII Всероссийской конференции по патологии клетки (2010). Всероссийских научных конференциях "Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии" (2012, 2014, 2016), Международной научно-практическая конференции «Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли» (2010), на X, XI и XIII конгрессах Международной Ассоциации Морфологов (2010, 2012, 2016),на Научнопрактической конференции с международным участием "Терапевтическая школа С. П. Боткина и ее вклад в развитие отечественной клинической медицины" (2012), на IY Всероссийском съезде патологоанатомов (2013), на 15th International Congress of Immunology (2013), American Diabetes Association's 75th и 76th Scientific Sessions (2015, 2016), четвертой международной междисциплинарной конференции "Современные проблемы системной регуляции физиологических функций"(2015), научно-практической конференции с международным участием «Достижения и инновации в современной морфологии», посвященная 115-летию со дня рождения академика Д.М. Голуба (2016), межлабораторной конференции ФБГНУ "НИИ морфологии человека" (июнь, 2016).

Публикации

Результаты исследования опубликованы в **34** научных работах, **12** из них - в изданиях, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых

должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материала, методов и результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы и приложения. Текст изложен на 273 страницах машинописного текста, иллюстрирован 15 таблицами и 32 рисунками, которые включают 30 монтажей из 154 микрофотографий. Приложение содержит 15 таблиц и 2 схемы. Библиографический указатель включает 393 источника отечественной и зарубежной литературы.

Благодарности

Автор выражает благодарность специалистами из ФГБОУ ВПО "Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова" МО РФ, Санкт-Петербург и ФГУП «Анти-допинговый центр», Москва.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 15-04-03155а "Строение нейро-инсулярных комплексов и их роль в формировании островков Лангерганса поджелудочной железы человека"

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Организм характеризуется человека И животных относительным динамическим постоянством внутренней среды и устойчивостью основных функций. физиологических Поддержание ЭТОГО постоянства обусловлено пластичностью различных органов, тканей и отдельных клеток живых При этом под пластичностью понимают способность изменять организмов. структурно-функциональную организацию ПОД влиянием экзогенных эндогенных факторов (Крыжановский Г.Н., 2002). Установлено, что пластические процессы в различной форме осуществляются во всех клетках и тканях организмов. Следовательно, пластичность является универсальным общебиологическим процессом и ее проявления обнаруживают на самых различных уровнях: органном, тканевом, клеточном, субклеточном И молекулярном.

В отличие от адаптаций, пластичность действует как "слепая сила": изменения, происходящие в организме могут быть как приспособительными к изменившимся условиям, так и патологическими (Крыжановский Г.Н., 2002). Закрепляясь, эти перестройки, могут приводить к усугублению патологических состояний.

Таким образом, пластичность - это предел изменчивости структурнофункциональной организации. Особенно важно отметить, что пластичность может быть детерминирована гисто- и органогенезом или возникать под действием факторов окружающей среды.

Ведущую роль в регуляции гомеостаза у животных (и человека) играют нервная и эндокринная системы. Однако, в отличие от нервной системы, сведения о проявлениях пластичности эндокринной системы крайне отрывочны. Одним из важнеших компонентов внутренней среды организма является глюкоза, в регуляции уровня которой основная роль принадлежит эндокринной части поджелудочной железы (Елецкий Ю.К., Яглов В.В., Эволюция структурной организации эндокринной части поджелудочной железы позвоночных. М.: Наука,

1978). В тоже время проблема ее пластичности остается практически неразработанной, несмотря на то, что имеет важное медицинское значение, так как нарушения регуляции уровня глюкозы приводят к возникновению наиболее распространненой эндокринопатии - сахарному диабету.

Необходимо отметить, что среди современных работ, направленных на изучение пластичности эндокринной части ПЖ, морфогенеза панкреатических островков и возобновления популяции В-клеток, подавляющее большинство выполнено на экспериментальных животных и культурах клеток. Грызуны и, в частности, мыши (Mus musculus) являются наиболее часто используемой моделью для исследований поджелудочной железы (Dolenšek J., Rupnik M. S., Stožer A., 2015). Хотя находки в этой области обычно экстраполируются на человека, очень важно понимать как сходство, так и различия между этими двумя видами. Поэтому обзоре литературы ЭТОМУ аспекту проблемы пластичности эндокринной части ПЖ будет уделено особое внимание.

1.1 Морфологическая организация поджелудочной железы

Поджелудочная железа (ПЖ) большинства позвоночных - орган, совмещающий одновременно как эндокринную, так и экзокринную функцию. Оформленная ПЖ появляется в эволюции у хрящевых рыб (Елецкий Ю.К., Яглов В.В., 1978). При этом у одних видов позвоночных животных имеет вид компактного органа (pancreas compacta), а у других представлена гроздьями железистой ткани, разбросанной в брыжейке и других органах (pancreas dessimnata).

ПЖ человека — хорошо определяемый непарный удлиненный орган, в котором обычно выделяют три части: головку, тело и хвост (Юшков П.В., 2011). Между этими частями нет четко-обозначенной границы. ПЖ человека в среднем достигает 14-18 см в длину, 2-9 см в ширину и 2-3 см в толщину и весит 50–100г (Yaginuma N. et al., 1986; Veld In't P., Marichal M., 2010). Она окружена фиброзной капсулой, от которой отходят соединительнотканные перегородки, разделяющие паренхиму ПЖ на отдельные доли и дольки (Yaginuma N. et al., 1986; Veld In't P., Marichal M., 2010). Производные мезенхимы занимают 15-20% от общего объема

ПЖ и содержат значительное количество жировых клеток (Rahier J. et al., 1980; Rahier J., Wallon J., Henuin J.C., 1981). У грызунов (в том числе и мышей) границы ПЖ определяются не столь четко как у человека. ПЖ мыши древовидно распределена по брыжейке тонкого кишечника (pancreas dissemenata). В ней (двенадцатиперстную, выделяют три доли: кишечную дуоденальную), селезеночную и желудочную. Селезеночная часть ПЖ мыши имеет наибольшие размеры (примерно половина от всей ПЖ мыши) и является гомологом тела и хвоста ПЖ человека (Watanabe S. et al., 1995). Дуоденальная доля – гомолог головки ПЖ человека (Bock P., Abdel-Moneim M., Egerbacher M., 1997; Villasenor A. et al., 2010). Желудочная доля ПЖ мышей имеет меньшие размеры и гомологична пирамидальному выросту (ушку) ПЖ человека (наиболее вариабельной части ПЖ, которая встречается только у половины взрослых людей) (Nagai H., 2003; Hornblad A. et al., 2011).

ПЖ человека в целом получает приблизительно 1% кровотока (Lewis M.P., Reber H.A., Ashley S.W., 1998). Кровоснабжение различно для головки, тела и хвоста. Приток артериальной крови к головке ПЖ осуществляется из передней и задней артериальных дуг. Эти дуги образованы двумя верхними и двумя нижними панкреатодуоденальными артериями. От каждой из дуг в головку входит 3-7 артериальных ветвей. Тело и хвост ПЖ получают артериальную кровь из панкреатических ветвей селезеночной артерии (Юшков П.В., 2011; Wharton G.K., 1932; Woodburne R.T. and Olsen L.L., 1951; Bockman D.E., 1993; Mikami Y., Otsuka A., Unno M., 2008; Meyers M., Charnsangavej C., Oliphant M., 2011). Венозная кровь поступает в воротную вену (Wharton G.K., 1932). У мышей кровоснабжение ПЖ во многом сходно с человеком (Bunnag S.C., Bunnag S., Warner N.E., 1963).

Экзокринная часть ПЖ у большинства позвоночных представляет собой дольчатую железу. Функции экзокринной части ПЖ включают в себя синтез, накопление и выделение пищеварительных ферментов (протеазы, амилазы, липазы, нуклеазы) и проферментов (эластазы, прокарбоксипептидазы, трипсиноген, пепсиноген, дезоксирибонуклеазы, рибонуклеазы). Вместе со стромой, экзокринная часть ПЖ человека составляет 96-99% от общего объема

железы (Saito K., Iwama N., Takahashi T., 1978; Rahier J., Wallon J., Henguin J.C., 1981). Каждая доля ПЖ состоит из нескольких небольших долек. У людей дольки - 1-10 мм в диаметре (Yaginuma N. et al, 1986; Veld In't P., Marichal M., 2010), тогда как у мышей они составляют 0,5-1,5 мм в диаметре (Murakami T. et al., 1993; Murakami T. et al., 1997). У людей разграничение между дольками неполное, таким образом, паренхима железы представляет собой единое целое (Yaginuma N. et al., 1986; Watanabe T. et al., 1997). В каждой дольке при этом находится один крупный выводной проток. Артерии, однако, не проходят параллельно протокам, и в каждой дольке можно обнаружить от 2 до 9 артерий. Другими словами, каждая долька ПЖ человека состоит их нескольких первичных долек, каждая из которых имеет свою артерию (Watanabe T. et al., 1997). Дольки ПЖ состоит из структур, называемых ацинусами. Ацинус представляет собой концевой отдел железы - скопление пирамидальных ацинарных клеток, выделяющих секрет из апикального полюса в просвет, называющийся вставочным протоком. Вставочные протоки впадают во внутридольковые, а при выходе из долек сливаются в еще более крупные по диаметру междольковые протоки. Последние в свою очередь сходятся в главный проток ПЖ (Вирсунгов проток), который простирается вдоль всей ПЖ человека.

Эндокринная часть ПЖ человека занимает 1-4% от всего объема железы. Основная функция эндокринной части ПЖ - регуляция углеводного обмена. Специализированные эндокринные клетки сгруппированы В образования, называемые панкреатическими островками или островками Лангерганса (Saito K., Iwama N., Takahashi T., 1978; Rahier J., Wallon J., Henquin J.C., 1981; Veld In't P., Marichal M., 2010). ПЖ взрослого человека содержит от 100 000 до 2 000 000 островков (Atkinson M.A. and Maclaren N.K., 1993), каждый из которых, в свою очередь, содержит от нескольких сот до нескольких тысяч отдельных эндокринных клеток. Островки могут быть на срезе как округлой или овальной формы, так и иметь неправильную форму (лентовидную, звездчатую) (Юшков П.В., 2011). Большинство островков имеют диаметр 100-200 мкм. Каждый островок имеет развитую капиллярную сеть и окружен капсулой. Кроме

островков в экзокринной части рассеяны одиночные эндокринные клетки и их небольшие скопления (кластеры) (Bouwens L. and Pipeleers D.G., 1998; Rupnik M., 2009; Merkwitz C. et al., 2013). При этом и у человека, и у мыши, и у ряда других исследованных животных максимальный размер островка - около 500 мкм, что доказывает важность такого показателя как оптимальный размер островков для осуществления их функций (Hellman B., 1959; Saito K., Iwama N., Takahashi T., 1978; Jo J., Choi M.Y., Koh D-S., 2007; Kim A. et al., 2009; Veld In't P. and Marichal M., 2010; Kilimnik G. et al., 2012).

Островки млекопитающих (и человека) содержат 4 основных вида эндокринных клеток: В (бета) - клетки, секретирующие инсулин (5,800 daltons, 51 аминокислотный остаток), А (альфа) - клетки, секретирующие глюкагон (3,485 daltons, 29 аминокислотных остатков), D (дельта) - клетки, секретирующие соматостатин (1,640 daltons, 14 аминокислотных остатков) и РР-клетки, синтезирующие панкреатический полипептид - (4,200 daltons, 36 аминокислотных остатков). Часто выделяют еще пятый, вид эндокринных клеток – грелинсодержащие клетки (эпсилон), которые присутствуют в небольшом количестве в развивающейся поджелудочной железе, но исчезают после рождения (Wierup N. et al., 2002; Bonal P. and Herrera C.L., 2008; Scharfmann R. et al., 2008, Wierup N., Sundler F., Heller R.S., 2013). В ПЖ некоторых видов млекопитающих описано еще два вида клеток: ЕС-клетки, синтезирующие серотонин и G-клетки - гастрин. Однако эти клетки малочисленны и встречаются только на некоторых стадиях внутриутробного развития (Wierup N. et al., 2002; Wierup N., Sundler F., Heller R.S., 2013).

Эволюция структурной организации эндокринной части ПЖ берет свое начало от представителей бесчерепных. В эпителии слизистой оболочки кишечника и его печеночном выросте у современных видов класса ланцетников содержатся клетки гомологичные клеткам экзо- и эндокринной частей ПЖ. У круглоротых формируется инсулярный аппарат, представленный скоплениями эндокринных клеток, которые у некоторых видов перестраиваются в фолликулы Лангерганса (Елецкий Ю.К., Яглов В.В., 1978). У хрящевых рыб эндокринные

клетки находятся в ПЖ в ассоциированной с протоками островковой паренхиме, в стенках протоков железы или в виде одиночных клеток рассеяны в ацинарной паренхиме. Оформленные панкреатические островки у большинства изученных видов хрящевых рыб отсутствуют. У акул и скатов в ПЖ присутствуют все четыре основных вида эндокринных клеток (Савельева Е.С., 2013; Youson J.H., Al-Mahrouki A.A, 1999; Youson J.H. et al., 2006). Для костистых рыб характерно присутствие в поджелудочной железе оформленных панкреатических островков или (у ряда видов) телец Брокманна - скопления крупных островков, окруженных соединительнотканной капсулой (Яглов В.В., 1978; Савельева Е.С., 2013; Youson J.H., Al-Mahrouki A.A, 1999; Youson J.H. et al., 2006). Разнообразие вариантов структурной организации эндокринной части ПЖ рыб можно рассматривать как пример этапов филогенетического развития от отдельных эндокринных клеток к оформленным панкреатическим островкам (Елецкий Ю.К., Яглов В.В., 1978; Савельева Е.С., 2013; Youson J.H, Al-Mahrouki А.А., 1999; Youson J.H. et al., 2006).

составе панкреатических островков амфибий, рептилий, птиц и млекопитающих тоже выявляются все 4 основных вида эндокринных клеток. Однако цитоархитектура панкреатических островков различается между видами. Эндокринная часть ПЖ амфибий и рептилий представлен панкреатическими островками и отдельными эндокринными клетками, диффузно распределенными в ацинарной паренхиме (Яглов В.В., 1976а; Яглов В.В., 1976б; Савельева Е.С., 2013; Putti R. et al., 1992; Putti R. et al., 1997; Accordi F., Bracci M.A. and Ventola F., 1998; Etayo J.C. et al., 2000; Lee J.H. et al., 2003; Buono S., Odierna G. 2nd. and Putti R., 2006; Chandavar V.R. and Naik P.R., 2008). Для некоторых амфибий и рептилий характерно плащевое распределение клеток в островке (Putti R. et al., 1992; Lee J.H. et al., 2003). В ПЖ птиц ярко выражены различия в клеточном составе панкреатических островков. У многих представителей птиц выделяют островки нескольких типов: 1) островки типа А (содержат А- и D-клетки); 2) островки типа В (содержат В- и D-клетки); 3) островки смешанного типа (содержат A-, B- и D- клетки) (Яглов В.В., 1977a; Lucini C., Castaldo L. and Lai O., 1996; Simsek N., Ozüdoğru Z. and Alabay B., 2008).

У млекопитающих вариантов структурной выявлены несколько организации островков поджелудочной железы. Для ряда грызунов (например для мышей и крыс) характерны панкреатические островки плащевого типа, в которых В-клетки преобладают и занимают центральную часть островка, а остальные виды клеток (A-, D- и PP-клетки) локализованы на периферии (Яглов В.В., 1977 б ; Voss K.M., Lieselotte H., Kern H.F., 1978; Beatens D. et al., 1979; Cirulli V. et al., 1994; Esni F. et al., 1999; Gannon M. et al., 2000; Ku S.K. et al., 2001; Ku S.K., Lee H.S., Lee J.H., 2002; Cabrera O. et al., 2006). У человека, как в настоящее время считается большинством авторов, не наблюдается четкой анатомической организации островков Лангерганса (Brissova M. et al., 2005; Cabrera O. et al., 2006; Pisania A. et al., 2010), то есть клетки рассеяны в островках без определенных закономерностей - мозаично (Gromada J. T. et al., 2007). Однако, в целом ряде работ (Савельев С.В. и др., 2007; Bouwens L. and Pipeleers D.G., 1998; Bosco D. et al., 2010; Kilimnik G. et al., 2011) в ПЖ человека было выделено сразу несколько основных форм организации эндокринной части: одиночные клетки, небольшие кластеры инсулин-содержащих клеток, небольшие островки и крупные островки (диаметр свыше 100 мкм). В пренатальном развитии человека вывлены биполярные островки (В-клетки расположены на одном полюсе островка, а А- и D-клетки формируют другой). Интересно, что у коров основным типом островков ПЖ до 1 года постнатального онтогенеза является плащевой, однако в 3 года отмечается структурная перестройка, и основным типом становятся биполярные островки (Дилекова О.В., 2015). Кроме того у многих позвоночных выявляются одиночные ацино-островковые клетки (Яглов В.В., 1975).

Соотношение различных видов эндокринных клеток в панкреатических островках человека и приматов отличается от наиболее изученного в этом отношении грызунов - мышей. В островках мышей В-клетки составляют около 77% всех клеток, А-клетки — около 18% (Cabrera O. et al., 2006). У человека В-клетки составляют 53,9-55% всех клеток островка, А-клетки — 34.4-38% (Brissova M. et. al., 2005; Cabrera O. et al., 2006). Соотношение В- и А-клеток варьирует в

разных панкреатических островках: выявляются островки, в которых преобладают В-клетки, и островки, в которых преобладают А-клетки (Brissova M. et. al., 2005; Cabrera O. et al., 2006). В целом, у мышей соотношение В- к А-клеткам выше, чем у людей. D-клетки и PP-клетки встречаются в эндокринной части ПЖ гораздо реже (менее чем в 10% клеток у человека и меньше 5% клеток у мышей) (Rahier J., Wallon J., Henquin J.C., 1981; Kim A. et al, 2009; Brissova M. et al., 2005; Cabrera O. et al., 2006; Steiner D.J. et al., 2010). Однако, в головке ПЖ человека содержание PP-клеток может достигать 70% (Rahier J. et al., 1979; Rahier J., Wallon J., Henquin J.C., 1981; Stefan Y. et al., 1982).

Несмотря на то, что были обнаружены межвидовые различия в клеточной архитектуре островков (Wieczorek G., Pospischil A., Perentes E., 1998; Cabrera O. et al., 2006), есть веские основания полагать, что от строения островков зависят межклеточные взаимодействия между В-клетками и выделение инсулина (Halban P.A. et al., 1982; Ravier M.A. et al., 2005). Существует также мнение, что пластичность соотношения эндокринных клеток ПЖ может играть важную роль в регуляции метаболизма углеводов (Ninov N. et al., 2013). При этом гормоны, которые содержатся в наибольшем количестве эндокринных клеток ПЖ, играют в поддержании постоянства уровня Инсулин разную роль глюкозы. анаболический гормон. Он понижает уровень гликемии, способствует полимеризации глюкозы в гликоген, повышает проницаемость клеточных мембран и подавляет распад белков в клетке. Глюкагон выступает в качестве контринсулярного катаболического гормона: повышает уровень гликемии, ингибирует проницаемость клеточных мембран, стимулирет липолиз и распад белков в клетках. Соматостатин подавляет синтез белка в клетках и выделение секретов поджелудочной железы, т. е. выступает в роли универсального ингибитора белкового синтеза (Яглов В.В., Яглова Н.В., 2012).

Островки очень обильно васкуляризованы и получают примерно в 10 раз больше крови, чем экзокринная часть (Henderson J.R., Daniel P.M., Fraser P.A., 1981). И у людей и у мышей 1-5 артериол входят в каждый островок (в зависимости от его размера) и разделяются на фенестрированные капилляры,

которые напоминают из-за плотности расположения капиллярной сети гломерулярную систему почек (почечные клубочки) (Konstantinova I. and Lammert E., 2004; El-Gohary Y. et al., 2012), при этом капилляры занимают 7-8% объема островка (Saito K., Yaginuma N., Takahashi T., 1979).

У человека, из-за преимущественного расположения островков внутри долек, островковые капилляры приводят кровь к капиллярам окружающих их ацинусов, формируя так называемую инсуло-ацинарную воротную систему (Murakami T. et al., 1992, 1993, 1997; Merkwitz C. et al., 2013). Кровь из островков собирается в выносящих капиллярах, которые затем образуют вторичную капиллярную сеть, обеспечивающую ацинарные клетки.

мышей преимущественного из-за расположения островков междольковом пространстве венозная кровь из островков попадает сразу в междольковые вены, образуя так называемую инсуло-венозную систему. Гораздо менее многочисленные островки, расположенные внутри долек, отдают кровь в ацинарную капиллярную сеть или в междолковые вены (Murakami T. et al., 1992, 1993, 1997; Merkwitz C. et al., 2013). Особое внимание нужно обратить на то, что инсуло-ацинарная система является анатомическим субстратом для влияния эндокринной части ПЖ на ее экзокринную часть (Henderson J.R., Daniel P.M., Fraser P.A., 1981). Периинсулярные панкреатические ацинусы не только больше по размерам и содержат в целом больше пищеварительных ферментов, чем ацинусы, удаленные от островков (телеинсулярные), но и отличаются по соотношению ферментов, что свидетельствует о гетерогенности экзокринной части поджелудочной железы (Можейко Л.А., 2006, 2009).

Интересно, что у мышей кровь распределяется по специфическому микроциркуляционному паттерну в зависимости от вида клеток (Brunicardi F.C. et al., 1996; Konstantinova I. and Lammert E., 2004; Nyman L.R. et al. 2012). Принимая во внимание то, что у мышей характерным является плащевой тип расположения клеток в островках, кровоснабжение может осуществляться тремя возможными способами: от периферии к центру (т.е. кровь достигает вначале не А- и D-клетки) (Мигакаті Т. et al., 1993; Wayland H., 1997), от центра к периферии (т.е.

сначала к В-клеткам) (Nyman L.R. et al., 2008) и от одного полюса островка к другому (без четко выраженной иерархии) (Nyman L.R. et al., 2008; Nyman L.R. et al., 2010). Недавно было показано, что у мышей 66% островков снабжаются кровью из центра к периферии, в то время как в остальных островках этот процесс проходит от одного полюса до другого (Nyman L.R. et al., 2008). Есть некоторые данные в пользу того, что у человека также преобладает паттерн «от центра к периферии» (Stagner J.I. and Samols E., 1992). Однако, так как у людей клеточная архитектура островков менее упорядоченная, чем у грызунов, считается, что у человека нет столь жесткой привязки направления кровотока от вида клеток (Murakami T. et al., 1997; Cabrera O. et al., 2006).

Таким образом, анализ литературы показал, что данные о клеточном составе и цитоархитектуре островков Лангерганса и их роли в поддержании гомеостаза глюкозы у человека достаточно противоречивы. Это приводит к трудностям при описании проявлений пластичности на уровне структурной организации эндокринной части ПЖ, что обусловливает необходимость более четкого выделения ее форм структурной организации и одновременного описания их цитоархитектоники.

1.2 Становление эндокринной части поджелудочной железы в онтогенезе

Несмотря на то, что развитие эндокринной части ПЖ изучено достаточно подробно (Фалин Л.И., 1966; Бойко Ю.Г. и Прокопчик Н.И., 1987; Башкин А.Д., 1988; Бобрик И.И. и Давиденко Л.М., 1991; Калигин М.С., 2009; Кривова Ю.С., 2010; Молдавская А.А. и Савищев А.В., 2011; Ульяновская С.А., 2015; Larsson L.I., 1998; Bouwens L., 1997; Watanabe T. et al., 1999; Polak M. et al., 2000; Piper K. et al., 2004; Jeon J. et al., 2009), данные, полученные разными авторами, достаточно противоречивы.

Разветвление эпителия ПЖ человека с образованием групп клеток, объединенных системой протоков, начинается в ранний плодный период

(Милованов А.П., Савельев С.В., 2006; Piper K. et al., 2004; Jeon J. et al., 2009). На ранних этапах развития формирование экзокринной части железы происходит в тесном единстве с мезенхимой (F. Miralles, 1999). Мезенхима необходима для нормального развития экзокринной части поджелудочной железы (Глущенко И.Л., 2004). Данные F. Miralles et al. (1998) и J.М.W. Slack (1995) свидетельствуют об индуктивном эффекте мезенхимы для развития экзокринной части железы и её репрессивном эффекте на развитие эндокринных клеток.

В настоящий момент принято считать, что образование эндокринных и пренатальном экзокринных клеток В периоде происходит ИЗ клеток, расположенных В протоках поджелудочной железы (Slack J.M.W.,1995). периоде Существует вероятность, что И В постнатальном образование эндокринных клеток поджелудочной железы возможно из клеток протоков (Балаболкин М.И., 2000).

Данные о времени появления основных видов гормон-содержащих клеток противоречивы: часть авторов полагает, что первыми появляются глюкагон-(Бойко Ю.Г. Прокопчик Н.И., 1987: Л.М. содержащие клетки Давиденко, 1993, 1996) или даже соматостатин-содержащие клетки (von Dorsche H. H. and Falkmer S., 2000). Однако, в настоящее время большая часть авторов считает, что раньше можно обнаружить В-клетки. На 9-10 неделях гестационного развития (нед. гр) выявляются одиночные инсулин-позитивные клетки. Спустя неделю, на 10-11 неделе развития, в зачатке ПЖ обнаруживаются инсулин-, глюкагон- и соматостатин-позитивные клетки. РР-содержащие клетки были обнаружены на 11-12-й неделе развития (Polak M. et al., 2000; Piper K. et al., 2004). Данные, полученные в исследовании Jeon J. et al. (2009), сходны с приведенными выше: первые инсулин-позитивные клетки были выявлены на 10-й неделе развития, глюкагон-позитивные – на 11-й неделе развития, соматостатин-12-й позитивные на неделе развития. Однако, клетки, содержащие панкреатический полипептид, были выявлены этими авторами только на 17-й неделе развития. Несмотря на описанные различия во времени дифференцировки эндокринных клеток, которые могут быть объяснены разницей в использованных антителах или индивидуальной изменчивостью (Кривова Ю.С., 2010) последовательность появления четырех основных видов эндокринных клеток одинаковая: первыми выявляются В-клетки, затем А-клетки, D-клетки и, в последнюю очередь — РР-клетки.

Данные образовании об панкреатических островков человека немногочисленны и тоже достаточно противоречивы. Эндокринная часть ПЖ начинает развиваться раньше, чем экзокринные ацинусы. Островки обособляются на 10-12 неделе развития (Фалин Л.И., 1966). Надо отметить, что в пренатальном онтогенезе человека встречаются разные формы организации эндокринной части ПЖ, которые появляются по мере развития: одиночные эндокринные клетки, их небольшие скопления (кластеры), плащевые островки, биполярные островки (А- и В- клетки расположены на разных полюсах островка) и смешанные (зрелые, мозаичные) островки (Фалин Л.И., 1966; Кривова Ю.С., 2010; Jeon J. et al., 2009). На этом основании были сделаны неоднократные попытки представить схему морфогенеза островков в пренатальном развитии человека (Ferner H., 1952; Robb P., 1961; van Assche F.A. and Aerts L., 1979; von Dorsche H.H. et al., 1988; Jeon J. et al., 2009). Однако, до сих пор нет единого мнения о времени возникновения островков разных типов. В работе Robb P. (1961) были выделены следующие стадии развития: 1) стадия образования почек островков (10-14 нед.), 2) стадия кластеров эндокринных клеток с капилляром в центре (10-16 нед.), 3) стадия биполярных островков (после 16 нед.), 4) стадия островков плащевого типа (после 20 нед.) и, наконец, 5) стадия зрелых островков (после 30 нед.). По мнению van Assche F.A. and Aerts L. (1979) первая стадия по Robb P. (1961) возникает только в районе 16 нед. В исследованиях von Dorsche H.H. et al. (1988) было выделено 3 стадии развития островков в пренатальном онтогенезе: первая фаза (14-16 нед.) характеризуется образованием зачатков островков, во время второй фазы (17-20 нед.) происходит отшнуровывание почек островков от протоков и формируются плащевые островки, а во время третьей фазы (21-26 нед.) формируются островки с мозаичным распределением различных видов эндокринных клеток.

В исследовании Jeon J. et al. (2009) скопления из нескольких видов эндокринных клеток обнаружены в поджелудочной железе с 12-й недели развития. К 14-й неделе в поджелудочной железе формируются островки с Вклетками, расположенными центрально, и А-клетками - на периферии, т.е островки плащевого типа. В дальнейшем кольцо из А-клеток размыкается, и формируются островки, состоящие или только из В-клеток, или только из Аклеток. Эти островки составляют на 17-й неделе 10% от всех островков, на 18-й неделе – 62,5, на 19-20-й неделе – 33,3, на 21-й неделе – 13,3% (Jeon J. et al., 2009). В работе Кривовой Ю.С. (2010) первые В- и А-клетки были обнаружены среди эпителиальных клеток первичных протоков ПЖ уже на сроке 8 нед. после оплодотворения. Образование кластеров, состоящих из А- и В-клеток, наблюдалось с 10-11-й недель развития, с 12-й недели развития выявлялись островки плащевого типа. На гистологических препаратах в панкреатических островках 14-ти недельных плодов была показана капиллярная сеть, а также соединительнотканная капсула, отграничивающая эндокринные клетки островков от ацинарных клеток. То есть, к 14-й неделе развития в поджелудочной железе обнаружены оформленные панкреатические островки, которых эндокринные клетки связаны с сосудами и, по мнению автора, могли выделять гормоны в кровь. С 18-й по 32-ю недели гестационного развития наиболее многочисленными были островки с примерно одинаковым соотношением В- и Аклеток, что не характерно для ПЖ взрослого человека. В этой работе не удалось обнаружить гомогенные островки, состоящие из одного вида эндокринных клеток, которые по данным Jeon J. и соавт. (2009) присутствуют в ПЖ плодов с 17-й по 21-22-ю недели развития. Остается неясным, какие процессы, приводящие к формированию панкреатических островков с типичным для взрослого человека мозаичным распределением В- и А-клеток, происходят после 21-й недели развития (Кривова Ю.С., 2010). При этом, эндокринная часть ПЖ становилась близкой по своей организации к взрослому человеку только после 34-й недели развития.

Также важно отметить, что в эндокринных клетках развивающейся ПЖ человека наблюдается коэкспрессия нескольких гормонов. В исследованиях L.I. Larsson (1998) было показано, что развитие эндокринной части ПЖ предполагает наличие мультигормональной фазы дифференцировки клеток. Большинство авторов отмечают, что таких клеток очень мало (Piper K. et al., 2004; Jeon J. et al., 2009).

Некоторые исследователи полагают, что в ПЖ человека эти клетки могут являться клетками-предшественницами эндокринных клеток. Локализация клеток, коэкспрессирующих несколько гормонов, в одиночных клетках и небольших кластерах свидетельствует о том, что они присутствуют в образующихся островках (Jeon J. et al., 2009).

В исследованиях J. Bocian-Sobkowska et al. (1999) в ПЖ плодов 9-38 недель иммуногистохимическими методами выявлялись как эндокринные островков, так и свободно рассеянные гормон-содержащие клетки. Диффузно разбросанные клетки были полигормональными и содержали инсулин, глюкагон, соматостатин и панкреатический полипептид. В развитии островков авторы выделяют несколько стадий: 1) стадия одиночных полигормональных клеток (9-10 недель); 2) стадию незрелых полигормональных островков (11-15 недель); 3) стадия моногормональных инсулин-продуцирующих клеток, расположенных в центре островков плащевого типа (16-29 недель); 4) стадию полиморфных (после 30 недель), характеризующуюся островков наличием вырабатывающих отдельно глюкагон или соматостатин. В последнюю стадию в ткани железы обнаруживаются биполярные островки. В этом исследовании подтверждается факт единого происхождения клеток эндокринной природы из одной клетки-предшественника, расположенного в стенках протоков. J. Jensen et al. (2000) и М.С. Калигин с соавт. (2009, 2011) обнаружили существование одной общей мультигормональной клетки-предшественника ДЛЯ поджелудочной железы, которые позже дифференцируются в А- и В-клетки, синтезирующие соответствующие гормоны. Часть этих клеток остается в

эпителии протоков, а большинство их них располагается в островках и сохраняется там и в раннем постнатальном периоде.

Надо отметить, что дифференцировка эндокринной части проходит неравномерно в различных областях ПЖ (Кривова Ю.С., 2010; Polak M. et al., 2000; Piper K. et al., 2004). Эндокринные клетки появляются среди клеток центральных протоков развивающейся ПЖ человека. При дальнейшем увеличении массы эндокринных клеток их плотность также выше в центральной области ПЖ (вокруг главного протока - ductus pancreaticus), чем на периферии. Наиболее крупные панкреатические островки располагаются в центральной области ПЖ, небольшие одиночные эндокринные клетки И локализованы преимущественно на периферии (Кривова Ю.С., 2010; Piper K. et al., 2004; Jeon J. et al., 2009).

Еще одним недостаточно изученным вопросом остается, с каких сроков развития в ПЖ человека появляются зрелые эндокринные клетки, сходные с эндокринными клетками взрослого человека. C помощью иммуногистохимических исследований плодов 10-14 недель Н.Н. von Dorsche et al. (1991, 2000) показали, что В-клетки островков выполняют свою функцию уже на этом сроке. В исследовании Piper K. et al. (2004) было показано, что с 10-й недели развития В-клетки контактируют с CD34-позитивными клетками развивающихся капилляров, а к 14-й неделе островки пронизаны тонкой капиллярной сетью. По мнению Piper K. и соавт. это служит свидетельством сходства панкреатических островков на 12-14 неделе развития с островками взрослого человека. Однако в работе Jeon J. et al. (2009) показано, что типичные для взрослого человека крупные панкреатические островки смешанного типа формируются только после 21-й недели развития. В других работах, посвященных изучению, эндокринной части ΠЖ человека, начиная пренатального периода и до старости, утверждается, что островки Лангерганса, характерные для взрослых людей, формируются только в возрасте около 2 лет (Meier J.J. et al., 2008; Gregg B.E. et al., 2012). Это сопровождается увеличением числа В-клеток и занимаемой ими площади. При этом происходит увеличение

отношения числа В-клеток к А- клеткам, прежде всего за счет пролиферации В-клеток (Kassem S.A. et al., 2000; Meier J.J. et al., 2008; Gregg B.E. et al., 2012), а также увеличение отношения числа В-клеток к D- клеткам как из-за нарастания пролиферации В-клеток, так и за счет снижения числа D-клеток (Gregg B.E. et al., 2012). Индекс пролиферации В-клеток наиболее высок в течение первых двух лет после рождения и затем постепенно снижается (Meier J.J. et al., 2008; Gregg В.Е. et al., 2012). Схожие процессы были выявлены и во время постнатального развития мышей (Georgia S. and Bhushan A., 2004).

Главным механизмом у человека, начиная с неонатального периода, считается увеличение размера островков, а не их числа (Meier J. J. et al., 2008; Gregg B.E. et al., 2012), то есть 10% прирост массы В-клеток происходит в 10% за счет образования новых островков и в 90% за счет увеличения их размеров. Важно отметить, что в подростковом возрасте у человека не было выявлено никаких серьезных изменений ни в количестве, ни в клеточной архитектуре островков (Meier J.J. et al., 2008; Gregg B.E. et al, 2012).

В добавление, нужно отметить, что экзокринная часть ПЖ увеличивается с момента рождения в детском и подростковом периоде (до 20 лет) практически прямолинейно. Этот рост превышает рост эндокринной части, что приводит к уменьшению относительной площади и плотности распределения островков (Meier J.J. et al., 2008; Saisho Y. et al., 2007). В возрасте от 20 до 60 лет объем, занимаемый экзокринной частью ПЖ остается практически неизменным, но затем начинает уменьшаться (Saisho Y. et al., 2007). В отличие от этого как общий объем эндокринной части ПЖ, так и клеточная структура островков человека, как представляется, остается неизменной в возрасте от 20 до 100 лет (Rahier J. et al., 2008; Saisho Y. et al., 2013). Относительная площадь, занимаемая В-клетками в ПЖ тоже остается стабильной в возрасте от 20 до 60 лет, а затем начинает увеличиваться (Saisho Y. et al., 2013).

Несмотря на то, что у взрослых людей преобладают смешанные (мозаичные, зрелые) островки, следует подчеркнуть, что в ПЖ человека также обнаружены одиночные эндокринные клетки, их небольшие кластеры и островки

плащевого типа (Saisho Y. et al., 2013). Описанные способы распределения эндокринных клеток у взрослых людей, как считается, примерно соответствуют схеме пренатального развития, предложенной Ferner H. (1952) и Robb P.M. (1961а, б). В целом, от появления первых эндокринных клеток (10 нед. гестационного развития) и до 2 лет происходит постепенный сдвиг в сторону преобладания смешанных островков, но при этом это преобладание не полное (Robb P.M., 1961 а, б; Jeon J. et al, 2009; Meier J.J. et al, 2010; Gregg B.E. et al, 2012).

Морфогенез эндокринной части ПЖ грызунов отличается от описанного выше. У эмбрионов мыши на 9,5 день эмбрионального развития выявляются первые глюкагон-содержащие клетки; инсулин-, соматостатин- и PP-содержащие клетки выявляются с 10,5 дня (Bonal C. and Herrera P.L., 2008; Jorgensen M.C. et al., 2007). Однако ряд авторов считает, что PP-клетки появляются в поджелудочной железе только после рождения (Teitelman G. et al., 1993; Upchurch В.Н., Аропtе G.W. and Leiter A.B., 1994). Несколько позже (к 14,5 эмбриональному дню) в ПЖ эмбрионов мыши четко различимы ацинусы и выводные протоки.

У грызунов на ранних сроках развития (с 9,5 по 14,5 дни эмбрионального развития) коэкспрессия инсулина и глюкагона наблюдается во многих клетках (Teitelman G. et al., 1993; Larsson L.I., 1998; Oster A. et al., 1998; Jensen J. et al., 2000). Кроме того, во всех четырех видах эндокринных клеток на ранних сроках развития обнаружена экспрессия пептида YY. То есть, возможно, что все четыре вида эндокринных клеток дифференцируются из мультипотентных клеток-предшественниц, экспрессирующих пептид YY (Upchurch B.H, Aponte G.W. and Leiter A.B., 1994).

Первые эндокринные клетки, появляющиеся в зачатке поджелудочной железы, диффузно распределены среди эпителиальных клеток протоков. Подобная организация эндокринной части сохраняется в зачатке поджелудочной железы мышей до 16 дня эмбрионального развития. Кластеры эндокринных клеток, которые все еще отличаются от панкреатических островков взрослых животных, появляются ближе к концу гестации, с 18,5 дня. Образование панкреатических островков с типичной для грызунов цитоархитектурой,

васкуляризацией и иннервацией наблюдается в первые недели жизни (Cirulli V. et al., 1994; Esni F. et al., 1999; Johansson M. et al., 2006).

В исследованиях ПЖ мышей было показано, что плащевой тип островков преобладает у них в течение всей жизни (Sone H. and Kagawa Y., 2005; Rankin M.M. and Kushner J.A., 2009; Tschen S.I. et al., 2009; Stolovich-Rain M. et al., 2012). Кроме того, у мышей, которые ели ad libitum, в течение жизни не только повышалась масса тела, но и масса ПЖ, а также число В-клеток и занимаемый ими объем (Sone H. and Kagawa Y., 2005; Rankin M.M. and Kushner J.A., 2009; Tschen S.I. et al., 2009). В то же время, число островков у мышей возрастает в течение первых 3-4 недель, а затем остается стабильным (Miller K. et al., 2009; Jo J. et al., 2011). Это было также подтверждено в исследованиях, показавших низкую пролиферацию эндокринных клеток всех видов у годовалых мышей (Teta M. et al., 2005; 2007). При этом экзокринная часть ПЖ у мышей нарастает медленее, что приводит к увеличению относительного объема В-клеток с возрастом (Sone H. and Kagawa Y., 2005; Rankin M.M. and Kushner J.A., 2009).

Из данных приведенных в обзоре литературы следует, что вопрос о механизмах и последовательности формирования островков у человека до сих пор не решен. Межвидовые различия как морфологической организации, так и в развитии эндокринной части ПЖ у человека и у грызунов (основной экспериментальной модели) очень велики. Поэтому, изучение развития непосредственно поджелудочной железы человека имеет огромное значение.

1.3 Иннервация поджелудочной железы

1.3.1 Общие сведения

С тех пор как Фредериком Бантингом и Чарльзом Бестом был открыт инсулин, непрерывно продолжаются исследования, целью которых является выяснение механизмов контроля секреции гормонов ПЖ. На экспрессию инсулина и глюкагона влияет огромное количество химических факторов. Для регуляции секреции гормонов островка потенциально возможны ауто-, юкста-, и эндокринные способы. Кроме этого, co времен классических исследований Клода Бернара, о том, что укол в дно четвертого желудочка гиперкликемию, появилось большое число исследований, вызывает показывающих вовлеченность нервной системы в регуляцию эндокринной функции ПЖ и метаболический контроль (Woods S.C. and Porte D.J., 1974). Поэтому достаточно сложно отделить одни эффекты от других (Brunicardi F.C., Shavelle D.M., Andersen D.K., 1995).

Клеточная архитектура островка влияет на паракринную регуляцию, синхронизирует высвобождение инсулина (Halban P.A. et al., 1982; Stagner J.I. and Samols E., 1986; Bonner-Weir S., 1988; Santos R.M. et al., 1991). Все островки ПЖ согласованно секретируют гормоны примерно с 5 минутным интервалом (Tengholm A. and Gylfe E., 2009). Для создания этого паттерна секреции, активность инсулин-содержащих В-клеток ПЖ должна быть согласована как внутри отдельного островка, так и между островками. В то же время, секреторная активность других эндокринных клеток островка, таких как, например, глюкагонсекретирующие А-клетки, оказывающие противоположные эффекты на гомеостаз глюкозы, должна быть согласована с активностью В-клеток. Благодаря такому взаимодействию эндокринные клетки могут одновременно посылать сигналы, регулирующие эффективную доставку островковых гормонов в систему кровообращения и, в конечном счете, к печени, регулируя поддержание

гомеостаза глюкозы. Анатомические и функциональные дефекты, нарушают эту согласованную, ритмичную деятельность, и вероятно, снижают эффективность до того момента, когда они вносят вклад в патогенез диабета (например,одной из важнейших характеристик СД2 является потеря возможности быстрого ответа на повышение уровня сахара в крови) (Tengholm A. and Gylfe E., 2009).

Островки Лангерганса, однако, являются частью сложного комплекса согласованно работающих систем. Они подвергаются также воздействию гуморальных факторов, например, таких как циркулирующие в плазме гормоны (например, адреналин или инкретины, полученные из желудочно-кишечного тракта, которые модулируют вызванную глюкозой секрецию инсулина и глюкагона). Мозг также регулируюет секрецию гормонов островков при помощи вегетативной нервной системы (Rodriguez-Diaz R. and Caicedo A., 2013). Также достаточно проблематично отдифференцировать иннервацию эндокринной части ПЖ от иннервации экзокринной, так как применяемый для этих целей метод мечения (трассировки) относится к ПЖ в целом. Кроме этого активность как эндокринной, так и экзокринной частей ПЖ зависит от приема пищи и, поэтому неудивительно, что цефалическая фаза была описана для обеих частей. Хотя стимуляция вентромедиального гипоталамуса и эфферентных симпатических и парасимпатических нейронов влияет на секрецию гормонов островками (см. ниже), неизвестно влияет эта стимуляция напрямую через иннервирующие островок, или опосредованно путем активации других органов, которые, в свою очередь, оказывают влияние на секрецию инсулина и глюкагона (Rodriguez-Diaz R. and Caicedo A., 2013). Так в работах Акмаева с соавторами (Акмаев И.Г., 2005; Akmaev I.G., Rabkina A.E., 1977; Akmayev I.G., Vikhreva O.V., Konovalova L.K., 1981 a, б) показано, что гипоталамус способен стимулировать выделение инсулина ИЗ В-клеток панкреатических островков ПО нервнопроводниковому пути, который был назван «паравентрикуло-вагусным». Этот путь начинается от мелкоклеточных нейронов паравентрикулярного ядра (ПВЯ) гипоталамуса, синаптически переключается в продолговатом мозге на нейроны дорсального ядра блуждающего нерва и достигает в составе волокон

блуждающего нерва панкреатических островков. По нему к В-клеткам поступают стимулирующие сигналы. Тормозящие сигналы приходят от нейронов ПВЯ нейронах ПВЯ секретируется гуморальным путём: В рилизинг-гормон кортиколиберин, который стимулирует в гипофизе секрецию АКТГ и через его посредство секрецию глюкокортикоидов В коре надпочечников. Глюкокортикоиды тормозят выделение инсулина из В-клеток. Подобного рода двойной контроль, по мнению авторов, характерен для регуляции эндокринных функций. В последнее время появились данные существенно дополняющие эту концепцию: разные области гипоталамуса имеют различное влияние на секрецию инсулина и/или глюкагона. Эти области координировано регулируют метаболизм глюкозы в организме (Rosario W. et al., 2016). В свете всего вышесказанного, необходимо детальное изучение этой системы для дальнейшей идентификации как нейронов, так и функционально связанных с ними проекций в ЦНС, регулирующих функции островков.

ПЖ иннервирована автономной нервной системой у разных видов животных, в том числе у людей (Ahren B., 2000; Gilon P. and Henquin J.C., 2001; Lindsay T.H. et al., 2006; Love J.A., Yi. E., Smith T.G., 2007; Rodriguez-Diaz R. and Caicedo A., 2013; Dolenšek J., Rupnik M. S., Stožer A., 2015). Еще Кахаль (1891) показал в своих работах обильную иннервацию экзокринной части и кровеносных сосудов ПЖ. Лангерганс отмечал более богатую иннервацию островков, по сравнению с окружающей ацинарной частью. Позднее Gentes (1902) и Pensa (1905) описали нервную сеть в эндокринной части ПЖ у крыс, кошек и собак (цитировано по Coupland R.E., 1958; Sunami E. et al., 2001).

У людей в ПЖ выявлена сеть нервных волокон. Нервные окончания были обнаружены вокруг сосудов, на ацинарных клетках, клетках протоков и на эндокринных клетках панкреатических островков. В ПЖ мыши тоже было выявлено 4 типа сплетений: периваскулярные, перидуктальные, периацинарные и периинсулярные (Ushiki T. and Watanabe S., 1997). Сходные данные были получены при изучении ПЖ крысы (Чумасов Е. И., Петрова Е.С., Коржевский Д.Е., 2011), нутрии (Кривова Ю.С., Барабанов В.М., Савельев С.В., 2008). В ПЖ

выявлены как миелиновые, так и безмиелиновые нервные волокна, а также отдельные нервные клетки и нервные ганглии, которые локализованы, в основном, в междольковой соединительной ткани или между ацинусами.

Следует отметить, что большинство исследований выполнены на различных видах млекопитающих (иннервация ПЖ у разных видов сильно варьирует), при этом иннервация ПЖ человека изучалась лишь в отдельных работах. Природа, происхождение И точная локализация волокон, иннервирующих ПЖ у человека еще недостаточно полно изучены, несмотря на огромную клиническую важность (панкреатит, рак ПЖ, нарушение иннервации при диабете) (Abdulreda M.H. et al., 2016). Например у пациентов с такими заболеваниями, как рак поджелудочной железы, или панкреатит, боль является доминирующим клиническим симптомом в подавляющем большинстве случаев (73-93%) (Lindsay T.H. et al., 2006). Классические анатомические исследования, проводящиеся на трупном материале, к сожалению, не дают полной картины (Amella C. et al., 2008).

между нейронами обычно изучаются посредством мечения антероградных и ретроградных путей. Нейронные проекции ПЖ исследовали у различных видов животных с использованием разных методов трассирования с участием вирусов, холерного токсина В, пероксидазы хрена, True Blue или Dil . Считается, что нервные волокна входят (и выходят) в ПЖ в составе нервнососудистых стволов. Внутри ПЖ они также проходят вместе с кровеносными сосудами и заканчиваются (или, наоборот начинаются) рядом с стенкой капилляров и эндокринными клетками (Ushiki T. and Watanabe S., 1997). При этом они не образуют классических синапсов с клетками-мишенями, но высвобождают нейротрансмиттеры в межклеточное пространство, таким образом влияя больше, чем на одну цель единовременно (т.е. являются синапсами an passant) (Rodriguez-Diaz R. and Caicedo A., 2013).

Ретроградное мечение ПЖ связало центральные парасимпатические и симпатические нейроны в стволе головного мозга, среднем мозге, гипоталамусе и, даже, в переднем мозге (Акмаев И.Г., 2005; Beall C., Ashford M.L., McCrimmon

R.J., 2012; Osundiji M.A. and Evans M.L., 2013). Некоторые из этих центров мозга участвуют в контроле приема пищи или циркадианных ритмов, и было бы заманчиво предположить, что они посылают сигналы в ПЖ для адаптации секреции гормонов к поведенческому статусу. Однако центральная регуляция секреции гормонов ПЖ еще недостаточно изучена (Rodriguez-Diaz R. and Caicedo A., 2014).

Считается, что автономная иннервация опосредованно влияет на высвобождение инсулина в цефалическую фазу во время еды и также принимает участие в повышении выделения глюкагона и уменьшении выделения инсулина у человека и животных при симпатической стимуляции (Teff K.L., Mattes R.D., Engelman K.,1991; Havel P.J. and Ahren B., 1997; Taborsky G.J., Ahren B., Havel P.J., 1998; Ahren B., 2000; Gilliam L.K., Palmer J.P., Taborsky G.J., 2007).

Благодаря недавним достижениям (в том числе и в исследованиях изолированных островков, в толстых срезах и in vivo), был прояснен ряд вопросов, касающихся структуры и функций нервов в ПЖ, а также отличия в иннервации у человека и мыши (Takahashi N. et al., 2002; Speier S. and Rupnik M., 2003; Speier S. et al., 2008; Rodriguez-Diaz R. et al., 2011; Chiu Y.C. et al., 2012; Rodriguez-Diaz R. et al., 2012; Stozer A., Dolensek J., Rupnik M.S., 2013; Low J. et al., 2013).

ПЖ иннервируется волокнами как симпатической так и парасимпатической нервной системы (Love J.A., Yi. E., Smith T.G., 2007; Ahren B., 2012). В ПЖ взрослого человека обнаружены пучки нервных волокон различного диаметра и нервные ганглии (Fink T. et al., 1994; Castorina S., Romeo R., Marcello M.F., 1996, Кривова Ю.С., 2010). Эти структуры выявлялись при помощи антител к S-100, NSE, GAP-43, Pgp9.5, SNAP-25, NCAM, нейрон-специфическому β-III тубулину и периферину. В части тонких нервных волокон периферин не экспрессируется, что может свидетельствовать о гетерогенном белковом составе структур нервного аппарата поджелудочной железы (Кривова Ю.С., 2010).

Автономная нервная система регулирует выделение гормонов в эндокринной части ПЖ, тем самым, влияя на метаболизм глюкозы (Brunicardi

F.C., Shavelle D.M., Andersen D.K., 1995). В конце 20-го века интенсивно изучалась иннервация панкреатических островков постганглионарными адренэргическими и холинэргическими волокнами (Böck P., 1986; Cerf M., 2011). Для большинства видов характерно, что нервные волокна локализованы преимущественно периферии панкреатических образуя островков, на периинсулярную нервную сеть (Sunami E. et al., 2001). Внутри островков, между эндокринными клетками, выявляются лишь единичные нервные волокна. Тела ганглионарных нейронов также локализованы в панкреатических островках и непосредственно контактируют с эндокринными клетками (Kobayashi S. and Fujita T., 1969; Doney S., 1984; Sunami E. et al., 2001). Нервные волокна внутри островков, как правило, немиелинизированны, хотя иногда встречается и типичная миелиновая оболочка. Несколько нервных волокон часто погружены в перикарион одной Шванновской клетки. Это могут быть и как адренергические, так и холинергические волокна одновременно (Woods S.C. and Porte D. Jr., 1974).

Эфферентные симпатические волокна.

В упрощенной форме можно считать, что симпатическая иннервация ПЖ осуществляется волокнами чревного ствола, а парасимпатическая - блуждающего Тела нерва. нейронов, образующих эфферентные преганглионарные симпатические нервные волокна, локализованы в грудном и верхнем поясничном сегментах спинного мозга (T5-L1) (Furuzawa Y., Ohmori Y. and Watanabe T., 1996; Amella C.et al., 2008) или, по некоторым сведениям, в C8 - L3 (Brunicardi F.C., Shavelle D.M. and Andersen D.K., 1995, Osundiji M.A., Evans M.L., 2013). Миелинизированные аксоны этих клеток выходят через передние (вентральные) корешки спинного мозга и или оканчиваются на телах ганглионарных нейронов, лежащих в ганглиях паравертебральной симпатической цепочки, или проходят сквозь эту цепочку в составе n. splanchicus к чревному (celiac) и верхнему брыжеечному (mesenteric) ганглиям, нейронах, оканчиваются на локализованных в этих ганглиях (Salvioli B. et al., 2002, Cabrera-Vasquez S. et al., 2009). Преганглионарные системы волокна симпатической выделяют ацетилхолин (Ach). Постганглионарные нервные волокна идут к поджелудочной железе (Ahren B., 2000). Они выделяют норадреналин, который связывается с α и β адренорецепторами, а также нейропептиды: галанин и NPY (нейропептид Y) ((Brunicardi F.C., Shavelle D.M. and Andersen D.K., 1995; Ahren B., 2000; Myojin T. et al., 2000).

У людей тело и хвост ПЖ иннервируются нервными волокнами происходящими из чревного сплетения и сопровождающими 2 артерии: селезеночную артерию и поперечную артерию ПЖ. Недавно был описан нерв, входящий в ПЖ не из чревного сплетения. Этот нерв проходит возле главного панкреатического протока вместо того, чтобы сопровождать кровеносносные сосуды (Yi S.Q. et al., 2003). Головка ПЖ получает наибольшее число нервных волокон (Tiscornia O.M., 1977; Yi S.Q. et al., 2003). У мышей распределение симпатических нервов во многом гомологично человеку (Honjin R., 1956; Su H.S. et al., 1987), но плотность распределения нервов одинакова в разных долях (Lindsay T. H. et al., 2006).

В экзокринной части ПЖ симпатические аксоны контактируют по большей внутрипанкреатическими ганглиями, кровеносными сосудами протоками и опосредованно ингибируют выделение ферментов экзокринной частью ПЖ за счет подавления стимулирующих влияний от ганглиев и сужения (вазоконстрикции) сосудов, уменьшая тем самым приток крови (Love J.A., Yi E., Smith T.G., 2007). У мышей иннервация экзокринной части выражена меньше, чем у людей (Ushiki T. and Watanabe S., 1997). Основные нервы у мышей проходят вдоль междольковых артерий и образуют периинсулярное сплетение (Ushiki T. and Watanabe S., 1997). При этом аксоны симпатических нервов контактируют с А-клетками, а контакты с В-клетками не обнаружены. Также они иннервируют гладкомышечные клетки сосудов и периваскулярное пространство, образуя так называемый симпатический нейроваскулярный комплекс (Chiu Y.C. et al., 2012). У людей симпатические волокна очень редко контактируют напрямую с эндокринными клетками, а иннервируют гладкомышечные клетки сосудов (Rodriguez-Diaz R. et al., 2011). Стимуляция чревного нерва увеличивает выброс глюкагона и снижает высвобождение инсулина и соматостатина эндокринными

клетками ПЖ (Gilon P. and Henquin J.C., 2001; Rodriguez-Diaz R. et al, 2013; Dolenšek J., Rupnik M. S., Stožer A., 2015). Также считается, что симпатические нервы отвечают за ответную реакцию островков на гипогликемию, которая включает в себя увеличение секреции глюкагона и ингибирование секреции инсулина (Ahrén B., 2012). Общий симпатический эффект выражается в снижении концентрации инсулина в плазме (за счет повышения концентрации катехоламинов, которые ингибируют секрецию инсулина).

Эфферентные парасимпатические волокна.

Парасимпатическая иннервация ПЖ осуществляется ветвями блуждающего Тела нейронов парасимпатической образующих нерва. системы, преганглионарные нервные волокна, лежат в дорсальном моторном ядре блуждающего нерва (n.vagus X) (Rinaman L, Miselis RR1987; Chen X.H. et al., 1996; Browning K.N. et al., 2005) и, возможно, в двойном ядре (nucleus ambiguus) (Gilon P. and Henquin J.C., 2001; Love J.A., Yi E., Smith T.G., 2007; Ahren B., 2000). Оба этих центра находятся под контролем гипоталамуса. Преганглионарные парасимпатические волокна направляются к поджелудочной железе в составе ветвей блуждающего нерва (n.vagus). В поджелудочной железе парасимпатические волокна оканчиваются телах парасимпатических на нейронов, лежащих в интрамуральных ганглиях (Berthoud H.R. and Powly T.L., 1991; Cerf M., 2011). Макроскопическая антомия парасимпатической иннервации ПЖ у мышей схожа с таковой у людей (Honjin R., 1956). Волокна блуждающего нерва проходят вдоль артерий и достигают внутрипанкреатических нервных ганглиев. Эти ганглии содержат от 3 до 30 нейронов и расположенны обычно в междольковой соединительной ткани или внутри долек (Love J.A., Yi E., Smith Т.G., 2007; Kitagawa H. et al., 2008). Важным является то, что на нейронах этих ганглиев оканчиваются волокна не только от парасимпатической нервной системы, симпатической, но И OT также волокна ИЗ других внутрипанкреатических ганглиев и из мышечно-кишечного (Ауэрбаховского) сплетения (myenteric plexus) (Love J.A., Yi E., Smith T.G., 2007).

Преганглионарные парасимпатические волокна выделяют ацетилхолин (Ach), который связывается с никотиновыми рецепторами на мембране нейронов (Brunicardi F.C., Shavelle D.M., Andersen D.K., 1995). Постганглионарные парасимпатические волокна выделяют несколько нейромедиаторов: NO (оксид азота) и нейропептиды: VIP (вазоактивный (ацетилхолин), интестинальный пептид), GRP (гастрин-рилизинг пептид), PACAP (гипофизарный активирующий аденилатциклазу полипептид) (Love J.A. and Szebeni K., 1999; 2000; Myojin Т., 2000). Ряд авторов Ahren B., предлагают выделять пэптидэргические нервы и ганглии в отдельную категорию (Brunicardi F.C., Shavelle D.M. and Andersen D.K., 1995).

Короткие немиелинизированные постганглианарные волокна подходят к эпителиальным клеткам ацинусов и протоков, гладкомышечным протоков, периваскулярным сплетениям, а также к другим ганглиям в ПЖ. увеличивает высвобождение Стимуляция ЭТИХ волокон секрета клеток экзокринной части ПЖ и протоков, сужение протоков и расширение сосудов (Love J.A., Yi E., Smith T.G., 2007; Tiscornia O.M., (вазодилятацию) 1977). Отмеченная выше более скудная иннервация экзокринной части ПЖ у мышей, свидетельствовать большей роли гормонального тэжом 0 контроля перечисленных процессов у грызунов (Ushiki T. and Watanabe S., 1997). Постганглианарные нервные волокна осуществляют свои функции преимущественно за счет Асh, посредством связывания с мускариновыми рецепторами, обнаруженными в том числе и в эндокринных клетках островков. (Brunicardi F.C., Shavelle D.M. and Andersen D.K., 1995; Gilon P. and Henquin J.C., 2001).

У постганглионарные парасимпатические мышей нервные волокна иннервируют все типы клеток в островках (Rodriguez-Diaz R. et al, 2011; Ahren B., 2000,2012). Недавно было доказано, что парасимпатическая иннервация островков у людей отличается от таковой у мышей: во-первых, было показано, что только незначительное количество таких волокон проникает у людей внутрь островков (большая часть аксонов заканчивается в экзокринной части ПЖ)

(Rodriguez-Diaz R. et al., 2011), во-вторых, было показано, что на стимуляцию ацетилхолином отвечают преимущественно В- и D-клетки, в то время как А-клетки реагируют гораздо слабее (Molina J. et al., 2014). Тем не менее, это не исключает возможности, ответа А-клеток на нейропептиды, высвобождаемые из парасимпатических волокон (Ahren B., 2000; Ahren B. and Taborsky G.J., 1986). Интересно, что А-клетки сами являются основным источником ацетилхолина в островках человека (Rodriguez-Diaz R. et al., 2012). По всей видимости, этот классический нейротрансмиттер регулирует в островках человека активность остальных видов клеток паракринным образом.

В целом, парасимпатическая стимуляция, как полагают, увеличивает высвобождение инсулина, глюкагона, соматостатина и панкреатического полипептида у самых разных видов (Ahren B., 2000, 2012; Eberhard D. and Lammert E., 2009; Rodriguez-Diaz R. and Caicedo A., 2013; Dolenšek J., Rupnik M. S., Stožer A., 2015).

В ряде работ предполагается, что иннервация ПЖ может осуществляться при помощи т. н. метасимпатической нервной системы (энтеральная нервная система, энтеро-панкеатическая нервная система) (Gilon P. and Henquin J.C., 2001). Внутрипанкреатичекие ганглии связаны с автономными ганглиями кишечных нервных сплетений (Kirchgessner A.L. and Gershon M.D., 1990; Kirchgessner A.L. and Pintar J.E., 1991; Love J.A. and Szebeni K., 1999). Нейротрансмиттерами нейронов этих ганглиев ПЖ являются, в том числе, и серотонин и оксид азота (NO) (Kirchgessner A.L. and Gershon M.D., 1990). Однако, господствующая точка зрения относит интрамуральные нейроны ПЖ к парасимпатическому отделу нервной системы.

Парасимпатические нервы отвечают за раннюю фазу секреции инсулина, в том числе и цефалическую фазу (т.е. выделение инсулина, которое происходит в предвкушении приема пищи).

Таким образом, общий парасимпатичекий эффект выражается в увеличении выделения инсулина. Однако, этот эффект является результатом суммарного воздействия ряда медиаторов, выделяемых постганглионарными

парасимпатическими волокнами. Кроме того, стимуляция блуждающего нерва приводит к возрастанию высвобождения глюкагона и панкреатического полипептида (Ahren B., 2000; Gilon P. and Henquin J.C., 2001).

Афферентные волокна.

Кроме эфферентных симпатических и парасимпатических нервных волокон в панкреатических островках человека и грызунов присутствуют афферентные (сенсорные) нервные волокна (Brunicardi F.C., Shavelle D.M. and Andersen D.K., 1995; Ahren B., 2000; Gilon P. and Henguin J.-C., 2001; Salvioly B. et al., 2002). Пучки сенсорных нервных волокон выходят из поджелудочной железы в составе чревного и блуждающего нервов. Тела сенсорных симпатических нейронов локализованы в ганглиях задних (дорсальных) корешков спинного мозга преимущественно на уровне нижних грудных сегментов (так называемые спинальные афференты) (Furuzawa Y., Ohmori Y. and Watanabe T., 1996; Won M.H. et al., 1998), проецируясь на интернейроны I и IV пластинок спинного мозга. Для парасимпатической системы тела афферентных нейронов локализованы в нижнем ганглии блуждающего нерва (ganglion nodosum), посылая информацию в ядро одиночного пути (nucleus tractus solitarii) (Gilon P. and Henquin J.C., 2001; Salvioly B. et al., 2002). Нейромедиаторами в сенсорных нервных волокнах служат CGRP (кальцитонин-ген связанный пептид) и SP (субстанция Р). Большинство афферентных симпатических И парасимпатических нервов являются чувствительными к капсаицину (Rodriguez-Diaz R. and Caicedo A., 2013). Капсаициновые (ванилиновые) рецепторы в основном передают информацию о боли (Szallasi A. and Blumberg P.M., 1999). Из чувствительных рецепторов в ПЖ описаны тельца Фатер-Пачини (Standop J. et al., 2001; García-Suárez O. et al., 2010).

Сенсорные нервы также вовлечены в регуляцию секреции гормонов эндокринными клетками ПЖ (Ahren B., 2012). При химическом разрушении сенсорных нервов (обработка капсаицином) у мышей наблюдается увеличение секреции инсулина в ответ на глюкозу по сравнению с контролем (Karlsson S. et al., 1994). Также в ПЖ, и в панкреатических островках в частности, иммуногистохимически выявляются нервные волокна, выделяющие такие

нейромедиаторы как холецистокинин, серотонин, метионин-энкефалин. Эти нейромедиаторы могут также влиять на уровень секреции инсулина: холецистокинин стимулирует выделение инсулина, в то время как эффект серотонина и метионин-энкефалина зависит от концентрации медиатора (Karlsson S. and Ahrén B., 1992; Peschke E. et al., 1997).

В заключении следует добавить, что иннервация островков изучена недостаточно, особенно у человека (Rodriguez-Diaz R. et al., 2011; Abdulreda M.H. et al., 2016), несмотря на сведения о ее поражениях при сахарном диабете (см. ниже). Интересно, что иннервация островоков очень пластична: было показано, что островки пересаженные в воротную вену крыс с диабетом были реинервированы нервами печени (Gardemann et al., 1994). Это обусловливает необходимость дальнейшего изучения роли иннервации в регуляции гомеостаза глюкозы и пластичности эндокринной части ПЖ.

1.3.2 Иннервация поджелудочной железы в пренатальном онтогенезе

Данные литературы указывает на то, что у взрослых людей островки иннервированы гораздо слабее по сравнению с грызунами (Fink T. et al., 1994; Castorina S., Romeo R., Marcello M.F., 1996; Pour P.M. and Saruc M., 2011; Rodriguez-Diaz R. et al., 2011). Однако, ПЖ человека обильно иннервирована во время гестационного периода, показывая своеобразную динамику роста (Amella C. et al., 2008). Обильная иннервация островков Лангерганса человека во время плодного периода была описана также в работе Кривовой Ю.С. (2010). В этой же работе было впервые показано наличие нейро-инсулярных комплексов обоих типов (см. ниже) в развивающейся ПЖ человека.

При этом сведения о развитии иннервации эндокринной части ПЖ в литературе крайне немногочисленны. Работы были проведены, в основном, на грызунах и посвящены, по большей части, симпатической нервной системе (Burris R. and Hebrok M., 2007; Cabrera-Vasquez S. et al., 2009; Borden P. et al., 2013). Известно, что симпатические волокна иннервируют развивающуюся ПЖ мыши,

начиная с 15 дня эмбрионального развития (Borden P. et al., 2013). В дальнейшем степень симпатической иннервации увеличивается до 20-го дня постнатального развития (Cabrera-Vasquez S. et al., 2009). При недостатке фактора роста нервов NGF симпатическая иннервация ПЖ не развивается в должной степени (Borden P. et al., 2013). Мы не смогли найти работ, посвященных развитию парасимпатической иннервации ПЖ у млекопитающих.

Развитие иннервации ПЖ человека описано в единичных исследованиях. Источниками нервных элементов служат волокна блуждающего (*n. vagus*) и чревного (*n.splanchnicus*) нервов, врастающие в развивающуюся поджелудочную железу, а также нейроны, которые дифференцируются из мигрировавших в железу клеток нервного гребня. Д. М. Голуб (1940) при исследовании развития иннервации ПЖ у эмбрионов человека нашел, что нервные клетки ее выселяются из солнечного сплетения, из узлов, расположенных в стенке двеннадцатиперстной кишки и по ветвям блуждающего нерва (главным образом правого). При этом было достоверно показано наличие нейробластов среди ходов ПЖ у зародыша длинной 20 мм, причем даже у новорожденных нервные клетки имели нейробластический характер (Цит. по Жаботинский Ю.М., 1953).

Врастание нервов в закладку ПЖ у человека начинается на самых ранних этапах (с 6 недели развития); дальнейший морфогенез иннервационного аппарата ПЖ характеризуются увеличением количества источников иннервации и степенью дифференцировки нервных элементов (Первушин В.Ю., Ставрова Н.П., 1973; Башкин А.Д., 1988). Применение иммуногистохимических методов показало, что уже с 8-й недели после оплодотворения в зачатке ПЖ присутствует значительное число нервных волокон, проходящих между формирующимися протоками, и нервные ганглии, состоящие из групп слабодифференцированных нейронов (Кривова Ю.С., 2010). ПЖ плодов иннервируется к концу 9-й недели развития практически из всех источников, характерных для взрослых людей (чревное сплетение, верхнее брызжеечное сплетение, задний блуждающий ствол) (Башкин А.Д., 1988).

Примитивные свободные нервные окончания выявляются в поджелудочной железе только с 12-й недели развития. К 20-й неделе развития нервные волокна формируют междольковые, околососудистые, околопротоковые И околоостровковые сплетения, образуются многочисленные нервные окончания во всех отделах железы (Башкин А.Д., 1988). При иммуногистохимическом исследовании развития иннервации ПЖ плодов человека с использованием антител к белку S-100 плотность расположения структур нервной системы головке железы была выше, чем в теле и хвосте. При развитии поджелудочной железы было выявлено два пика нарастания количества структур нервной системы в головке железы: к 14-й и 22-й неделям. В то время как в теле и хвосте железы количество нервных структур нарастает к 20-й неделе (Amella C. et al., К 30-32-й неделе развития количество нервных окончаний на единицу площади уменьшается, по сравнению с предыдущими сроками (Башкин А.Д., 1988).

По мнению Кривовой Ю.С. (2010), формирование нервного аппарата при развитии поджелудочной железы человека можно условно разделить на три этапа. На первом этапе (с 8-й по 12-ю недели после оплодотворения) нервный аппарат поджелудочной железы представлен слабо разветвленными пучками нервных волокон и нервными ганглиями, которые локализованы в мезенхиме. Второй этап развития нервного аппарата поджелудочной железы (с 14-й по 32-34-ю гестационного развития) характеризуется постепенным разветвлением нервной сети и образованием связей между структурами нервного аппарата и экзокринной и эндокринной частью железы.

На поздних сроках развития (после 34-й недели) при увеличении размеров поджелудочной железы распределение структур нервной системы (нервных волокон, нервных ганглиев, паренхиматозной сети тонких нервных волокон) становиться более разреженным. Но при этом ПЖ плодов человека на всех сроках развития иннервирована гораздо обильнее, чем у взрослых людей (Кривова Ю.С., 2010).

1.3.3 Нейро-инсулярные комплексы

У ряда млекопитающих (в том числе и у грызунов) эндокринные клетки панкреатических островков и структуры нервной системы (нервные волокна, тела нейронов, глиальные клетки) объединены в сложноорганизованные комплексы, которые были названы нейро-инсулярными (Кривова Ю.С., 2007; Donev S., 1984; Persson-Sjögren S., Zashihin A., Forsgren S., 2001; Sunami E. et al., 2001; Burris R. and Hebrok M., 2007; Pour P.M. and Saruc M, 2011). Simard (1937) обследовал ПЖ людей разного возраста и выявил такие комплексы на всех исследованных образцах (по Fujita T., 1959). Fujita T. (1959) выделил два типа нейро-инсулярных комплексов. Нейро-инсулярные комплексы І типа представляют собой островки, интегрированные с нервными ганглиями. Нейро-инсулярные комплексы II типа островки, связанные с нервными волокнами. В дальнейшем была выявлена целая нейро-инсулярных серия различных структур И была предложена их классификация (Таблица 1).

Кроме этого у целого ряда млекопитающих (мыши, крысы, кролики и т.д.) на периферии панкреатических островков при помощи иммуногистохимических методов и электронной микроскопии были обнаружены глиальные клетки. Эти белку S100 и GFAP клетки являются иммунопозитивными к антителам к (глиальному фибриллярному кислому белку) (Sunami E. et al., 2001, Winer S. et al., Тела этих клеток образуют уплощенные отростки, покрывающие 2003). эндокринные клетки и отграничивающие их от экзокринной части ПЖ (Sunami E. et al., 2001, Winer S. et al., 2003). Отростки этих клеток покрывают островок не (Sunami Ε. 2001). полностью, образуя прерывистую капсулу et al., Предполагается, что это - Шванновские клетки.

Таблица 1 Классификация нейро-инсулярных структур в ПЖ (Böck P., 1986)

Ганглий автономной нервной системы	Нет эндокринных клеток		
Нейро-инсулярный комплекс I типа	а. Небольшое число эндокринных клеток в		
	ганглии		
	б. Небольшое число нервных клеток в		
	островке		
Нейро-инсулярный комплекс II типа	а. Одиночные или небольшое количество		
	эндокринных клеток, ассоциированных с		
	пучком нервных волокон		
	б. Сильно иннервированные островки		
Классический островок Лангерганса	а. Иннервированный		
	б. Неиннервированный		

Таким образом, в ПЖ многих млекопитающих были обнаружены сложные нейроинсулярные комплексы. В состав комплексов входят гормон-содержащие клетки и структуры нервной системы: нейроны интрамуральных ганглиев, нервные волокна и глиальные клетки. Функциональная роль нейроэндокринных комплексов до конца не ясна (Кривова Ю.С., 2010; Persson-Sjögren S., Zashihin A., Forsgren S., 2001). Работы по исследованию нейроинсулярных комплексов у человека единичны.

1.3.4 Общие свойства эндокринных клеток поджелудочной железы и клеток нервной системы

Клетки эндокринной части ПЖ причисляют к дисперсной (диффузной) эндокринной эпителиальной системе (Яглов В.В., Михайлюк И. А., Яглова Н.В., Биология диффузной эндокринной эпителиальной системы., Ивано-Франковск: Симфония фортэ, 2013). Эта система представлена комплексом рецепторно-эндокринных клеток, основная масса которых находится в эпителиальных тканях

органов пищеварительной, дыхательной, мочеполовой систем и кожи. Клетки дисперсной эндокринной системы входят в состав, так называемой, APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation) серии (цит. по Яглов В.В., Михайлюк И. А., Яглова Н.В., 2013). Эти клетки объединяет их сходство в способности к захвату и депонированию предшественников аминов и синтезу из них, при помощи декарбоксилаз, биогенных аминов (Pearse A.G.E., 1976, цит. по Кривова Ю.С., 2010). В то время, когда концепция APUD находилась в стадии формирования, полагали, что клетки этой серии являются производными нейроэктодермы. Поэтому такие клетки стали называть нейроэндокринными. Были выделены маркеры, которые служат для идентификации таких "нейроэндокринных" клеток в нормальных тканях и опухолях: например, синаптофизин и хромогранин А, а также гликолитический фермент — нейрон-специфическая энолаза (neuron specific enolase, NSE) (Portela-Gomes G.M., Hacker G.W., Weitgasser R., 2004; Tomita T., 2002). Эти маркеры присутствуют во всех видах эндокринных клеток ПЖ.

В рамках APUD концепции считалось, что эндокринные клетки желудочнокишечного тракта и ПЖ развиваются из клеток-предшественниц, которые в процессе развития мигрируют из нейроэктодермы и впоследствии поселяются в зародышевой кишке. При развитии ПЖ из примитивной кишки эти клетки дифференцируются в основном в секретирующие гормоны клетки панкреатических островков (Pearse A.G.E., 1976, цит. по Кривова Ю.С., 2010).

В дальнейшем концепция APUD была расширена: Фуджита (Fujita T., 1976) концепцию «паранейрона», которой предложил цитохимическим эмбриологическим критериям клеток APUD серии добавлены некоторые морфологические И физиологические характеристики. Важнейшими характеристиками «паранейронов» согласно этой концепции являются: продукция биогенных аминов (гистамина, серотонина, катехоламинов) пептидных гормонов; 2) в «паранейронах» содержатся пузырьки, сходные с синаптическими везикулами и/или нейросекреторные гранулы, большинство клеток содержимое ЭТИХ гранул без нарушения выделяет целостности плазмолеммы; 3) «паранейрон» – это рецепторно-секреторная клетка (выделяет секрет в ответ на адекватные стимулы, действующие на рецепторы на плазматической мембране); 4) «паранейрон» имеет сходное с нейроном происхождение, т.е. нейроэктодермальное (цит. по Кривова Ю.С, 2010; Яглов В.В., Михайлюк И. А., Яглова Н.В., 2013).

В настоящие время показано, что эндокринные клетки ПЖ обнаруживают с нейронами сходство по целому ряду параметров:

- 1. В эндокринных клетках панкреатических островков экспрессируется целый ряд белков, характерных для нервной системы: GAD (глутамат декарбоксилаза), NPY (нейропептид Y), NCAM (молекула адгезии нервных клеток), SNAP-25 (белок синаптосом), GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок), ТН (тирозин гидроксилаза), beta-III tubulin (бета-III тубулин), факторы роста нервов и их рецепторы и другие (Кривова Ю.С., 2010; Von Dorsche H.H. et al., 1989; Kim J. et al., 1993; Teitelman G. et al., 1993; Tezel E. et al., 2001; Tsui H. et al., 2003; Winer S. et al., 2003). А-клетки содержат ацетилхолин (Rodriguez-Diaz R. et al., 2012).
- 2. В-клетки имеют два типа гранул: секреторные гранулы, которые содержат инсулин, карбоксипептидазы H, бетагранин, панкреастатин, и катепсин B; и сходные с синаптическими микровезикулы (SLMVs), которые содержат гамма-амино масляную кислоту (GABA), глутамат декарбоксилазу (GAD) и синаптофизин. В нейронах также содержатся два различных типа везикул. (Atkinson M.A. and Maclaren N.C., 1993).
- 3. Целый ряд транскрипционных факторов, которые являются характерными для клеток нервной системы, экспрессируются во время дифференцировки эндокринных клеток ПЖ (Naya F.J. et al., 1997; Apelqvist A.et al., 1999; Gradwohl G. et al., 2000; Jensen J. et al., 2000; Schwitzgebel V.M. et al., 2000; Grapin-Botton A., Majithia A.R. and Meltom D.A., 2001; Heremans Y. et al., 2002; Henseleit K.D. et al., 2005; Bonal C. and Herrera P.L., 2008).

В пользу гистогенетической близости эндокринных клеток ПЖ к нервным клеткам говорят и филогенетические данные. У многих беспозвоночных клетки, секретирующие гормоны ПЖ, были обнаружены в нервной системе (Slack J.M.,

1995). Таким образом, эндокринные клетки поджелудочной железы, по мнению Fujita T. (1976), являются «паранейронами». Более того, была высказана гипотеза, что островки Лангерганса являются модифицированными ганглиями, и предложена постепенная цепочка превращений: ганглий — нейро-инсулярный комплекс 1 типа — нейро-инсулярный комплекс II типа — островок (Fujita T., 1959, Serizawa Y., Kobayashi S., and Fujita T., 1979).

Однако, в целом ряде экспериментов с использованием химерных зародышей, а также по культивированию зачатка ПЖ *in vitro* (Andrew A., 1976; Pictet R.L. et al., 1976; Fontaine J. and Le Douarin N., 1977; Slack J.M., 1995) нейроэктодермальное происхождение эндокринных клеток ПЖ было отвергнуто и показано, что эндокринные клетки имеют энтодермальное происхождение.

Кроме этого в ПЖ были обнаружены ацино-островковые клетки. Эти клетки одновременно содержат гранулы, содержащие гормоны (инсулин, глюкагон, соматостатин), и гранулы с пищеварительными ферментами. Представление о развитии эндокринных клеток ПЖ из нервного гребня исключает возможность существования ацино-островковых клеток (Яглов В.В., 1975; Яглов В.В., Ломоносова Г.А., 1985; Яглов В.В., 1989).

Тем не менее, очевидное сходство между панкреатическими эндокринными клетками и нервной тканью оставляет вопрос о его причинах открытым. Есть основания полагать, что пептидергические нейроны вегетативной нервной системы и диффузная эндокринная система в функциональном отношении выступают как единая нейро-эндокринная система регуляции (Яглов В.В., Михайлюк И. А., Яглова Н.В., 2013). Однако данные о начале экспрессии нейральных белков клетками эндокринной части ПЖ человека в пренатальном онтогенезе в доступной литературе оказались достаточно отрывочными и противоречивыми. Так в ряде исследований показано, что появление первых клеток с позитивной реакцией на нейральные маркеры среди эпителиоцитов протоков ПЖ можно наблюдать уже на сроке 8-10 недель гестационного развития (Gaidar Y.A. et.al, 1998). В работе von Dorsche Н.Н. и Falkmer S. (2000) NSE была выявлена в эндокринных клетках, начиная с 10 недель, а β-эндорфин, начиная с 15

недели. В то же время в работе Кривовой Ю.С. (2010) было показано, что NCAM и нейрон-специфический β-III тубулин выявляются в эндокринных клетках ПЖ человека начиная с 14-ой недели, а экспрессия в них SNAP-25 была обнаружена только на 16-й.

Подводя итог этому разделу литературного обзора, следует подчеркнуть, что данные об иннервации эндокринной части ПЖ млекопитающих и человека (особенно в пренатальном развитии) противоречивы и отрывочны, что делает необходимым ее комплексное изучение с использованием как маркеров эндокринных клеток островков, так маркеров нервной системы. Тесная взаимосвязь нервной и эндокринной систем обусловливает необходимость дальнейшего изучения роли иннервации в пластичности эндокринной части ПЖ как при становлении эндокринной функции, так и при нарушениях углеводного обмена (см. ниже).

1.4 Типы нарушений углеводного обмена

Гомеостаз глюкозы - это процесс, стабилизирующий ее уровень в крови в ответ на изменения внутренних и внешних условий. Нарушение гомеостаза глюкозы является опасными для жизни. Центральное место в гомеостазе глюкозы занимает секреция гормонов инсулина и глюкагона эндокринной частью ПЖ. Эти гормоны предотвращают повышение и понижение уровня глюкозы в крови (гипергликемия и гипогликемия, соответственно) даже при экстремальных условиях, таких как длительное голодание или интенсивные занятия спортом.

Сахарный диабет (СД) - группа эндокринных заболеваний, развивающихся вследствие абсолютной или относительной недостаточности гормона инсулина, вырабатываемого В-клетками островков Лангерганса. СД является одним из самых распространенных заболеваний в мире (Дедов И.И. и Шестакова М. В., 2011). Главным характерным признаком СД является повышение уровня глюкозы в крови. Не претендуя на полный охват темы нарушений углеводного обмена, в

этом разделе будут приведены основные сведения о некоторых из них, затронутых в данном диссертационном исследовании.

1.4.1 Сахарный диабет 1 типа

При сахарном диабете 1 типа (СД1) число В-клеток сокращается, при этом островки — атрофичны и функционально неактивны и часто состоят только из глюкагон- и соматостатин-содержащих клеток (Gepts W. and Lecompte P.M., 1981). Тяжелая недостаточность инсулина при отсутствии его заместительного введения приводит к гипергликемии и кетоацидозу — биохимическим признакам СД1.

К середине 80-х годов в диабетологии сложилась концепция аутоиммунного патогенеза СД1, основное положение которой сводится к тому, что причиной гибели В-клеток, содержащих инсулин, является аутоиммунная агрессия против них (Один В. И. Аутоиммунный сахарный диабет, СПб.:ВМедА, 2003.; Балаболкин М. И., Клебанова Е. М., Креминская В. М., 2005; Moberg L., Korsgren О., Nilsson В., 2005). У больных с недавно выявленным СД1 аутоиммунные процессы проявляются в форме инсулита – хронической воспалительной инфильтрации мононуклеарными клетками остаточных В-клеток в островках ПЖ (Уильямз Г. и Пикап Д., Руководство по диабету., М.: МЕДпресс-информ, 2003.; Gepts W. and Lecompte P.M., 1981). Феномен инсулита был описан в 1965 году (Gepts W., 1965) и был подтвержден в дальнейших работах на животных. Мононуклеарные включают преимущественно активированные клетки лимфоциты (CD4+, CD8+), т. е. имеющие экспрессию рецептора интерлейкина-2, а также макрофаги. Присутствуют также и В-лимфоциты (Один В.И., 2003). При инсулите наблюдается селективная гибель В-клеток ПЖ, в то время как другие эндокринные клетки остаются интактными. Инсулит характерен для островков, в которых сохранилась значительная часть В-клеток. В основном считается, что инсулит характерен для детей и подростков с впервые выявленным СД1 (Gepts W., 1965; Veld In't P., 2011). У взрослых с продолжительным течением диабета он

выявляется редко (Waguri M. et al., 1997; Veld In't P. et al., 2007; Veld In't P., 2011). Описаны случаи инсулита и после 8 лет длительности СД1 (Coppieters K.T. et al., 2009). Однако, хотя инсулит и считается характерным для начальных стадий СД1, гистологически и иммуногистохимически он был выявлен только примерно в 150 случаях за 100 лет изучения (Veld In't P., 2011).

Общепринята точка зрения, которая предполагает необратимость разрушения В-клеток и дальнейшую аутоиммунную агрессию по отношению к дифференцирующимся инсулин-секретирующим клеткам Лангерганса (Carlotti F. et al., 2011). После клинического проявления СД 1 даже частичное восстановление секреции инсулина считается невозможным, поскольку большая часть В-клеток к этому моменту уже погибла. Иммуносупрессорная терапия задерживает разрушение В-клеток и замедляет развитие осложнений СД1, однако не оказывает существенного влияния на развитие болезни. Таким СД1 образом, при развитии ключевыми вопросами являются природа аутоиммунного разрушения В-клеток и отсутствие регенерационных процессов в ПЖ (Panero F. et al., 2009; Carlotti F. et al., 2011).

Надо сказать, что изучение функций В-клеток у пациентов, получающих инсулин, затруднено тем, что при прямом измерении уровня инсулина невозможно разделить секретируемый и экзогенный инсулин (Yoon H.J. et al., 2012). С-пептид образуется при расщеплении проинсулина. С-пептид и инсулин секретируются в эквимолярном количестве из В-клеток поджелудочной железы в ответ на стимуляцию глюкозой. Большая часть секретируемого инсулина изымается из общего кровотока при прохождении крови через печень, в то время как количество С-пептида изменяется мало (Panero F. et al., 2009; Yoon H.J. et al., 2012). Таким образом, измерение уровня С-пептида в сыворотке крови является более корректным способом изучения функции В-клеток ПЖ, чем измерение уровня инсулина. Оценка уровня С-пептида в периферической крови позволяет определить уровень остаточной секреции инсулина и рассчитать индивидуальную физиологическую дозу при его экзогенном введении. Традиционным критерием завершения аутоиммунного разрушения В-клеток эндокринных островков

считается отсутствие С-пептида (Yoon H.J. et al., 2012). Предполагается, что наличие С-пептида в крови замедляет развитие осложнений, а его экзогенное введение сможет облегчить страдание пациентов (Sima A.A., Zhang W. and Grunberger G., 2004; Wahren J., Ekberg K. and Jörnvall H., 2007; Nordquist L., Palm F. and Andresen B.T., 2008).

В последнее время во многих исследованиях получила поддержку гипотеза о том, что В-клетки способны сохранять или восстанавливать свои функции у пациентов с СД1 (Liu E.H. et al., 2009; Panero F. et al., 2009; Keenan H.A. et al., 2010; Wang L., Lovejoy N.F. and Faustman D.L., 2012; Oram R.A. et al, 2015). Bклетки сохраняются в ПЖ человека спустя долгие годы после манифестации СД1 несмотря на аутоиммунную атаку, направленную против них (Liu E.H. et al., 2009; Oram R.A. et al, 2015). Для объяснения этого феномена предлагаются разные гипотезы. Например, исследования подтвердили, что общее количество В-клеток регулируется в течение жизни человека (Bonner-Weir S. et al, 2010; Montanya E., 2014). Увеличение их числа (предположительно за счет пролиферации) было показано как при нормальном физиологическом росте, так и при состояниях, требующих повышенного количества инсулина, например, беременность и ожирение. Понимание механизмов компенсаторного ответа является основополагающим для выяснения патофизиологии диабета и способов его Кроме лечения. этого, сейчас активно рассматриваются гипотезы трансдифференцировке зрелых A- и D- клеток в B-клетки (Bonner-Weir S. et al, 2010; Thorel F. et al., 2010; Lima M.J. et al., 2013), а также неогенезе В-клеток из прогениторных клеток (Bonner-Weir S. et al., 2010; Montanya E., 2014). Однако, все эти гипотезы не объясняют прекращения аутоиммунной атаки в некоторых случаях СД1.

1.4.2 Сахарный диабет 2 типа

Сахарный диабет 2 типа (СД2) – метаболическая болезнь, возникающая вследствие относительной нехватки инсулина. Постепенное развитие заболевания затрудняет диагностику его начала. В настоящее время диагноз подтверждается только, когда у пациента развивается хроническая гипергликемия, которая сопровождается такими симптомами как сильная жажда, частое мочеиспускание, повышенная утомляемость, ухудшение зрения и потеря веса. Так как начало СД2 идентифицировать, сложно многие аспекты развития болезни недостаточно, что затрудняет лечение этого заболевания. Levetan et al. сообщает, что около 40% госпитализированных пациентов с СД2 не имели этого диагноза (Levetan C.S. et al., 1998). Предполагается, что большинство больных СД2 остаются невыявленными в течении 10 лет от начала болезни (Harris V.C. and Eastman R.S., 2000).

В этиологию СД2 вовлечена также инсулинрезистентность тканей, что приводит к увеличению уровня инсулина для контроля уровня сахара. Такой стресс от повышенного требования инсулина приводит к постепенной потере функциональности В-клеток (Rahier J. et al.,1983; Prentki M. and Nolan C.J., 2006; Matveyenko A.V. and Butler P.C., 2008; Marchetti P. et al., 2010). Когда потребность в инсулине превосходит компенсаторные возможности организма, возникает хроническая гипергликемия, которая определяется как сахарный диабет.

Изменения, наблюдаемые при СД2, более разнообразны чем при СД1. Сокращение числа В-клеток наблюдается у многих пациентов СД2, но оно более умеренное, чем при СД1 и не объясняет возникновение заболевания. Считается, что сходное уменьшение числа В-клеток наблюдается и у многих лиц пожилого и старческого возраста без клинических проявлений диабета. У многих лиц с СД2 наблюдаются также цитологические изменения В-клеток, свидетельствующие о нарушении ответа на гипергликемию. При СД2 также часто обнаруживают островковый фиброз и амилоидоз, что, однако, не объясняет причины секреторной дисфункции В-клеток (Gepts W. and Lecompte P.M., 1981).

Неясный патогенез приводит к неполному пониманию течения болезни. В то время как для СД1 установлено, что он возникает в результате избирательной деструкции В-клеток, вследствие аутоиммунного процесса, вокруг механизма СД2 идут споры об уменьшении количества В-клеток (Matveyenko A.V. and Butler P.C., 2008; Marchetti P. et al., 2010). Решение этого вопроса имеет важное клиническое значение в отношении применяемой терапии, включая возможную регенеративную терапию. Сокращение числа островков и (или) только уменьшение числа В-клеток в ПЖ при СД2, происходящее преимущественно за счет апоптоза, некомпенсированного адекватной регенерацией, наблюдалось многими авторами. Ультраструктурный анализ показал уменьшение количества гранул инсулина и морфологические изменения в целом ряде органелл В-клеток, включая митохондрии и эндоплазматический ретикуллум. Были также показаны различные как качественные, так и количественные дефекты в изолированных островках пациентов с СД2, такие как например, нарушение секреции инсулина в первой фазе. Эти многочисленные нарушения сопровождаются повреждением генов в клетках островка и нарушением экспрессии целого ряда белков. Влияние генотипа на функциональность В-клеток и их выживание изучалось в очень многих работах. Кроме этого очень важными вопросами являются изучение глюкозо- и липотоксичности и их влияние на повреждение В-клеток. В последние время также появились сообщения о влиянии воспаления на дисфункцию Вклеток при СД2 (Marchetti P. et al., 2010).

1.4.3 Диабетическая фетопатия

В последнее время прослеживается тенденция к увеличению числа беременных, больных сахарным диабетом. Число родов у женщин с сахарным диабетом из года в год возрастает, составляя 0,1% - 0,3% от общего числа. Еще в 2009 году приводились данные о том, что из 100 беременных примерно у 2-3 имеются нарушения углеводного обмена (Есаян Р.М., Григорян О.Р. и Пекарева Е.В., 2009). В настоящее время (в том числе из-за введения новых, более жестких

критериев диагностики гестационного СД) частота развития гестационного СД в мире составляет до 13% от всех беременностей (Беттихер О.А. и др., 2016).

Неблагоприятное влияние СД матери на плод может проявляться формированием у него диабетической фетопатии. Новорожденные от матерей, страдающих диабетом, часто имеют большую массу тела (4,5 кг и более) и крупные размеры. Это обусловлено повышенным поступлением глюкозы из крови матери через плаценту в кровь плода, что заставляет его поджелудочную железу в избытке вырабатывать инсулин - стимулятор процессов роста. Несмотря на крупные размеры, новорожденные по ряду показателей являются незрелыми. У новорожденных часто наблюдаются респираторные расстройства, высокая перинатальная смертность - до 5-10%, частота врожденных аномалий составляет 6-12% (Есаян Р.М., Григорян О.Р. и Пекарева Е.В., 2009). дальнейшем у потомства матерей с невыявленным гестационным сахарным диабетом или плохо леченной гипергликемией во время беременности повышен риск развития ожирения и нарушения толерантности к глюкозе. Так, 30% детей имеют индекс массы тела выше нормы на 40% в возрасте от 5 до 9 лет и на 60— 70% — в возрасте от 10 лет, что повышает риск развития СД 2 типа в подростковом возрасте на 20—40% (Vrachnis N. et al., 2012).

В целом ряде работ было проведено исследование влияния врожденных пороков развития поджелудочной железы и диабетической фетопатии на развитие эндокринной части органа (Юшина М.В., 2008; Баринова И.В., 2010; Ульяновская С.А., 2015; Gollin J.G., 1999; Glaser B. et al., 2000). Ежегодное увеличение численности больных СД, в том числе женщин репродуктивного возраста, повышает актуальность проблем, связанных с изучением дибетической фетопатии.

В заключение краткого раздела обзора литературы, посвященного нарушениям углеводного обмена, следует отметить, что эффективный контроль (например, с помощью инсулина или сахароснижающих препаратов) может свести до минимума или предотвратить многие осложнения СД. Однако такая терапия не вылечивает СД, а лишь переводит его в разряд хронических

заболеваний. В последнее время наблюдается как рост числа заболевших (Gregg E.W. et al., 2014), так и количества осложнений, таких как ангиопатии, нейропатии, нефро- и ретинопатии (Jahansouz C. et al., 2011; Wang P., Medarova Z.A., 2011). Сейчас разрабатываются новые методы лечения сахарного диабета, которые предполагают достижение компенсации углеводного и липидного обменов при отсутствии гипогликемии, что может быть достигнуто только применением технологий, предусматривающих наличие нормальной обратной связи регуляции углеводного обмена. Идеальным для достижения такого состояния является разработка конструкций, функционирующих на принципах гормональной регуляции углеводного обмена, трансплантация поджелудочной железы, островков или эндокринных клеток (Дедов И.И., Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., 2004).

Однако трансплантация ПЖ является объемным хирургическим вмешательством со смертностью от 1 до 3%, тяжелыми осложнениями со стороны сердечно-сосудистой системы, также требует пожизненной иммуносупрессивной терапии и поэтому рекомендуется в основном для больных СД1 с серьезными осложнениями. Для преодоления этих осложнений были предприняты попытки изолированной пересадки островков ПЖ. И хотя при пересадках по «Эдмонтонскому протоколу» инсулинонезависимость сохранена у семи пациентов в течение года (11,9 месяцев), в дальнейшем этот результат оказалось сложно воспроизвести, а выживаемость трансплантата за 9 лет составляла менее 10%. Таким образом, замещение В-клеток сопровождается осложнениями, требует пожизненной иммуносупрессивной терапии и при этом редко достигается инсулинонезависимость. Кроме того, этот метод лечения нехваткой доноров трансплантации, осложняется клеток ДЛЯ также сохраняющимся аутоиммунным процессом в организме пациента (Дедов И.И., Лисуков И.А., Лаптев Д.Н., 2014)

Лучшим средством терапии СД являлась бы возможность восстановления собственной популяции эндокринных клеток. Для достижения этой цели требуется детальная информация о строении и функциях эндокринной части ПЖ

человека. Изучение механизмов увеличения популяции В-клеток и формирования панкреатических островков как в норме (при развитии ПЖ в плодный период и у взрослых людей), так и при различных патологических состояниях, имеет огромное значение для разработки эффективных методов терапии сахарного диабета.

Отдельным, к сожалению малоизученным, вопросом являются изменения иннервации эндокринной части ПЖ, возникающие при СД. Исследования, выполненные на экспериментальных животных (мышах NOD со спонтанным сахарным диабетом первого типа) показали, что структуры нервной системы играют важную роль при развитии сахарного диабета. При развитии заболевания у NOD мышей капсула из глиальных клеток, является первой мишенью аутоиммунной атаки (Saravia F. and Homo-Delarche F., 2003; Tsui H. et al., 2003). У мышей этой линии при развитии аутоиммунной реакции первыми появляются Тлимфоциты аутореактивные к GFAP, GAD, S-100 – антигенам глиальных клеток. Сходные Т-лимфоциты выявляются и в крови больных диабетом пациентов и их ближайших родственников (Winer S. et al., 2003). Однако, наличие на периферии панкреатических островков капсулы, образованной глиальными клетками, в ПЖ человека не описано. На мышах линии NOD также было показано, что привлекать лимфоциты при развитии диабета могут расположенные внутри островков нейроны, блокировка которых капсаицином приводит к значительному снижению проникновения лимфоцитов в островки и замедлению развития диабета (Razavi R. et al., 2006).

1.5 Заключительные положения обзора литературы

Одним из наиболее перспективных направлений современных исследований в области изучения эндокринной части ПЖ является исследование возможности восстановления нормального гомеостаза глюкозы у людей с нарушениями углеводного обмена за счет регенерации пула эндокринных клеток (Mezza T, Kulkarni RN., 2014). Отличительной характеристикой эндокринной части ПЖ

млекопитающих является ее пластичность, проявляющаяся в способности к адаптации к различным физиологическим состояниям на протяжении жизни, возможности справляться с повышенной метаболической нагрузкой.

С другой стороны, становление дисперсной эндокринной системы в целом (и эндокринной части ПЖ в частности) в онтогенезе как научная проблема в литературе освещена недостаточно полно (Яглов В.В., Михайлюк И.А., Яглова Н.В., 2013). Отдельного внимания заслуживает анализ общих закономерностей ее становления в пре- и постнатальном онтогенезе. Согласно морфогенетической становления дисперсной эндокринной системы (Яглов концепции Михайлюк И.А., Яглова Н.В., 2013) в онтогенезе наблюдаются ранняя дифференцировка ее клеток, интенсивное развитие В период наиболее выраженного роста и дифференцировки тканей, избыточная закладка клеток с последующим исчезновением у взрослых и гетерохронное появление исчезновение ее клеток в дифференцирующихся тканевых системах. Накоплен целый ряд сведений, свидетельствующий о том, что данные положения являются предпосылками для проявлений пластичности эндокринной части ПЖ.

Однако морфогенетическая пластичность в пре- и постнатальном развитии эндокринной части ПЖ и при нарушениях углеводного обмена до сих пор изучена недостаточно. Данные о клеточной архитектуре островков во многом неоднозначны. Несмотря на то, что проблема дифференцировки эндокринных клеток и формирования панкреатических островков является объектом многих современных исследований, стадии созревания панкреатических островков у человека до сих пор описаны недостаточно полно, источники возобновления популяции эндокринных клеток ПЖ неизвестны. В то же время, сведения об изменениниях в эндокринной части ПЖ при нарушениях углеводного обмена достаточно противоречивы, хотя, закрепляясь, такие изменения могут быть причиной патологических дизрегуляций (Крыжановский Г.Н., 2002).

К этому надо добавить, что функционирование эндокринной части ПЖ находится в тесной связи с нервной системой, образуя единую систему регуляции (Акмаев И.Г., 2005; Яглов В.В., Михайлюк И. А., Яглова Н.В., 2013). Иннервация

ПЖ также вызывает в настоящее время пристальный интерес в связи с ролью в возникновении целого ряда заболеваний. При диабете было показано снижение иннервации островков (Saravia F. and Homo-Delarche F., 2003 Persson-Sjögren S., Zashihin A., and Forsgren S., 2005; Mundinger T.O. et al., 2016). В то же время отнсительно мало известно о динамике иннервации в развитии человека и при различных заболеваниях. Малоизученной остается и тонкая иннервация островков (Amella C. et al., 2008).

наиболее При этом, МЫШИ остаются исползуемой моделью ДЛЯ исследований ПЖ (Dolenšek J., Rupnik M. S., Stožer A., 2015). Наряду с очевидной разницей в размерах и макроскопической организации органа у этих видов, есть ряд менее очевидных и только недавно описанных различий в организации ацинарной и протоковых частей ПЖ, а также в распределении, составе и архитектуре эндокринной части. Кроме этого, имеются различия васкуляризации и иннервации у мышей и людей (Dolenšek J., Rupnik M. S., Stožer A., 2015).

Вышесказанное свидетельствует о необходимости изучения морфогенетической пластичности эндокринной части ПЖ в пре- и постнатальном развитии, при нарушениях углеводного обмена, а также комплексного исследования иннервации и нейро-эндокринных взаимодействий непосредственно в поджелудочной железе человека.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Характеристика материала

Исследование изучению ПЖ человека (эмбрионы, ПО плоды, новорожденные, взрослые) было проведено на аутопсийном материале из лаборатории нервной системы ФГБНУ коллекции развития "Научноисследовательский институт морфологии человека", собиравшейся сотрудниками на протяжении более 20 лет. Большая часть коллекции была собрана в 2007-2013 гг. в больницах Москвы (ГКБ 72, ГКБ 36, МОНИИАГ, ДГКБ св. Владимира) и Рязанского областного бюро судебно-медицинской экспертизы. Время забора материала не превышало 24 ч. после смерти.

В работе по изучению пренатального и неонатального развития ПЖ человека был использован материал, полученный от 36 плодов на разных сроках развития, 4 недоношенных новорожденных детей, проживших от нескольких часов до 13 суток и 2 доношенных новорожденных (Приложение, таблица 1). При сборе образцов ПЖ плодов человека учитывали пол, гестационный возраст, клинический диагноз матери и плода, причины прерывания беременности и причины смерти плода. Если клинические данные отсутствовали, определение проводили теменно-копчиковой возраста плодов ПО длине согласно морфометрическим таблицам (Петтен Б.М., 1959). Для анализа использована классификация внутриутробного развития, по которой плодный период развития человека можно разделить на 4 под-периода: предплодный (10-12 нед. гр.), раннефетальний (13-20), среднефетальный (21-28) и позднефетальный (29-40) (Милованов А.П., Савельев С.В., 2006). При морфометрическом исследовании образцы ПЖ плодов позднефетального периода развития и новорожденных были объеденены в одну группу. Общая характеристика использованного в работе плодного материала приведено в таблице 2.

Из исследованных образцов была выделена группа из 5 ПЖ плодов и новорожденных от матерей с нарушениями углеводного обмена (Приложение, таблица 1).

Таблица 2 Распределение аутопсийного материала поджелудочных желез по периодам пренатального развития

Период	Префетальный	Раннефетальный	Среднефетальный	Позднефетальный
гестационного	(10-12 нед.)	(13-20 нед.)	(21-28 нед.)	(29-40 нед.) и
развития				новорожденные
Число	10	16	8	8
наблюдений				

Для исследования ПЖ взрослых людей, не страдавших нарушениями углеводного обмена были исследованы аутопсийные образцы ПЖ 47 взрослых людей (возраст от 22 до 90 лет) (Приложение, таблица 2а). При сборе материала учитывали пол, возраст, клинический диагноз и причину смерти. Также были исследованы образцы ПЖ пяти лиц, страдавших, по данным клинического диагноза, СД1 (Приложение, таблица 2б) (возраст от 27 до 66 лет) и 18 (Приложение, таблица 2в) – с диагнозом СД2 (возраст от 42 до 82 лет).

Для изучения остаточной секреции инсулина у пациентов с длительным течением СД1 была исследована концентрация в периферической крови Спептида, антител к инсулину и глюкагона у 300 пациентов, в возрасте от 18 до 55 лет, 132 мужчин и 168 женщин, с длительностью диабета от 20 лет до 40 лет. Клиническое обследование 1 проводилась клинике терапии (усовершенствования врачей) им. Н.С. Молчанова Военно-медицинской академии (Санкт-Петербург) в 2012-2013 гг. Исследование проводилось натощак (пациенты не принимали пищу в течение не менее 10 часов перед исследованием). У всех **V**Частников обследования было получено информированное согласие. одобрено этическим комитетом Военно-Медицинской Исследование было Академии им. Кирова, Санкт-Петербург.

Диагноз СД1 был установлен на основании рекомендаций Всемирной организации здравоохранения (1980, 1985) и был подтвержден на основе истории болезни и клинических и лабораторных данных. У 268 пациентов начало болезни характеризовалось острым началом, снижением веса, обезвоживанием, кетоацидозом. Диабет был выявлен в возрасте до 30 лет у большинства пациентов (n=268). Диагноз был подтвержден высоким титром антител к островковым клеткам у 32 пациентов. У большинства обследуемых имелись осложнения сахарного диабета (Приложение, таблица 3). Все пациенты получали генетически модифицированный человеческий инсулин в дозе 0.56+-0,4 ед/кг в сутки.

2.2 Методы

2.2.1 Гистологическое исследование

При препаровке фиксированных эмбрионов 10-11-ти недельного возраста выделяли желудочно-кишечный тракт. При препаровке плодов после 12-й недели гестационного развития выделяли ПЖ вместе с прилежащими к ней сосудами, нервами и участком двенадцатиперстной кишки. Для плодов человека после 24-й недели гестационного развития, новорожденных и взрослых ПЖ (или ее кусок) фиксировали при вскрытии. Образцы аутопсий взрослых людей брали преимущественно из хвостового отдела ПЖ, так как в нем содержание эндокринной составляющей выше по сравнению с другими отделами (Каган И.И. и др., 2004; Ульяновская С.А., 2015).

Материал фиксировали в 10%-м кислом формалине, нейтральном формалине (4%-ый параформальдегид на 0,1М фосфатном буфере, рН 7,5) (Приложение, таблицы 1, 2). Часть образцов ПЖ взрослых людей была зафиксирована в жидкости Карнуа или жидкости Буэна. Использование разных фиксаторов было обусловлено, в первую очередь, тем, что коллекция собрана в течение длительного времени. Во время проведения исследований было выявлено, что при длительном хранении в спиртовых фиксаторах вымываются

вещества, содержащиеся в эндокринных клетках ПЖ (гормоны, NSE), при этом сохраняется иммуногистохимическая (ИГХ) реакция в структурах нервной системы. С другой стороны, при длительном хранении препаратов в кислом формалине может ослабевать сила ИГХ реакции со структурами нервной системы при ее сохранности в эндокринных клетках. Поэтому препараты с использованием разных фиксаторов были использованы в качестве контроля для оценки качества проведения ИГХ реакций.

Для приготовления гистологических препаратов использовали: желудочнокишечный тракт плодов 10-11-ти-недельного возраста; целую ПЖ плодов с 12-й по 23-ю недели развития; кусочки ПЖ размером до 1x1x0,5 см плодов после 24-й недели гестационного развития и взрослых людей.

Материал обезвозживали в спиртах восходящей концентрации и диоксане и заливали в гистомикс (Histomix, BioVitrum, Россия) или парафин. Для образцов готовили серийные срезы, толщиной 10 мкм. Для исследования колокализации гормонов и пан-нейральных маркеров в ПЖ взрослых людей были также приготовлены серийные срезы толщиной 5 и 3 мкм. В дальнейшем серийные срезы ПЖ монтировали на стекла.

Для всех исследованных образцов приготовлены обзорные гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином. Для выявления морфофункциональных изменений эндокринной части ПЖ у людей, страдавших СД были приготовлены препараты, окрашенные конго красным (выявление амилоида) и по Маллори (выявление соединительной ткани) (Приложение, таблица 4).

2.2.2 Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование проводили на сериях срезов.

Для изучения закономерностей распределения гормон-содержащих клеток ПЖ в развитии человека и при нарушениях углеводного обмена на соседних с окрашенными гематоксилином и эозином серийных срезах проводили ИГХ реакции на выявление инсулина и глюкагона (Таблица 3, Приложение, таблица 4). Выбор антител к этим гормонам обусловлен тем, что клетки, их содержащие, наряду с соматостатином составляют большинство эндокринных клеток в теле и хвосте ПЖ человека.

Депарафинированные, гидратированные срезы обрабатывали 3%-м раствором H_2O_2 в течение 10 мин для блокировки эндогенной пероксидазы. В целях блокировки неспецифического связывания срезы обрабатывали раствором Ultra V Block (Lab Vision) в течение 5 мин и ополаскивали в фосфатном буфере (PBS) рН 7,3-7,5. В качестве вторых антител на образцах ПЖ людей использовали готовую систему визуализации UltraVision Detection System Anti–polyvalent, HRP/DAB (Lab Vision) согласно спецификации фирмы. На заключительном этапе срезы обрабатывали раствором хромогена (DAB, Lab Vision).

Для исследования иннервации и нейро-эндокринных взаимодействий по этой же схеме выявляли пан-нейральные маркеры: Ca^{2+} -связывающий нейроглиальный белок (S-100) и нейрон-специфическую енолазу (NSE) (Таблица 3, Приложение, таблица 4). На образцах ПЖ людей также были поставлены реакции на антитела к глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP), рецептору фактора роста нервов (NGF-r), основному белку миелина (MBP) и периферическому белку миелина (PMP-22) (Таблица 3, Приложение, таблица 4).

Для изучения природы воспалительной реакции при СД1 у человека были использованы антитела к кластерам дифференцировки: CD 8, 16, 20, 25, 71 (Таблица 3, Приложение, таблица 4). Для этих антител при необходимости проводили демаскирование антигенов с помощью кипячения в 0,01М цитратном буфере рН 6,0 в микроволновой печи в течение 5 мин с последующим остыванием в течение 20 мин. Выбор антител обусловлен тем, что использование панели этих маркеров позволяет охарактеризовать клетки лейкоцитарного ряда.

Для более детального изучения взаимного распределения в ПЖ человека основных гормонов эндокринной части и пан-нейрональных маркеров были проведены реакции двойного иммуногистохимического окрашивания

(Приложение, таблица 4). На образцах ПЖ людей (в том числе в развитии и при СД) на 6 последовательных срезах были поставлены следующие реакции:

инсулин (мышиные моноклональные антитела) + глюкагон (кроличьи поликлональные антитела)

NSE (мышиные моноклональные антитела) + глюкагон (кроличьи поликлональные антитела)

NSE (мышиные моноклональные антитела) + инсулин (кроличьи поликлональные антитела)

инсулин (мышиные моноклональные антитела) + соматостатин (кроличьи поликлональные антитела)

инсулин (мышиные моноклональные антитела) + S-100 (кроличьи поликлональные антитела)

NSE (мышиные моноклональные антитела) + S-100 (кроличьи поликлональные антитела)

Для выявления указанных антигенов использованы система детекции MultiVision Polymer Detection System: MultiVision anti-rabbit/HRP + anti-mouse/AP polymers. В реакциях двойного окрашивания были использованы антитела и реагенты фирм "Sigma" и "ThermoScientific".

Для исследования колокализации на срезах ПЖ взрослых людей (как без нарушений углеводного обмена, так и с СД1) (Приложение, таблица 4) было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание с применением первичных антител к инсулину (1:1000, мышиные моноклональные, Sigma-Aldrich или 1:50, кроличьи поликлональные, Santa Cruz) и глюкагону (1:1000, мышиные моноклональные, Sigma-Aldrich или 1:100, кроличьи поликлональные антитела, ThermoScientific) (Таблица 3, Приложение, таблица 4). Инкубация первичных антител проводилась в течение ночи при 37 °C. Вторые антитела были Goat antimouse IgG-F(ab')2-TRITC и Goat anti-rabbit IgG-F(ab')2-FITC («Santa Cruz»). Окраска ядер проводилась при помощи DAPI (Santa Cruz).

Для выяснения трехмерной структуры нейроинсулярных комплексов и распределения нервов на серийных срезах 8 плодов разного срока развития

(Приложение, таблица 4) было проведено тройное иммуногистохимическое окрашивание в реакциях на инсулин (кроличьи поликлональные антитела, «Santa Cruz»), глюкагон (мышиные поликлональные антитела, «Sigma») и S100 «ThermoScientific»). (кроличьи поликлональные антитела, Для выявления указанных антигенов были использованы система детекции MultiVision Polymer Detection MultiVision anti-rabbit/HRP +anti-mouse/AP System: polymers («ThermoScientific») и UltraVision Detection System Anti-rabbit, HRP/DAB («ThermoScientific»). С этой же целью для 2 плодов (20 и 32 нед. гр) проводилось иммунофлуоресцентное окрашивание на серийных срезах с применением антител к инсулину и глюкагону (мышиные моноклональные, «Sigma») и белку S100 (кроличьи поликлональные антитела, «ThermoScientific»). Вторые антитела в этом случае были козьи антитела против мыши (FITC) и против кролика (TRITC) (Santa Cruz). Окраска ядер проводилась при помощи DAPI (Santa Cruz). Характеристика примененных на образцах ПЖ человека антител и условия проведения реакций приведены в таблице 3.

Негативным контролем во всех реакциях служили реакции с заменой первых антител 0,01М раствором фосфатно-солевого буфера (PBS) рН 7,3–7,5. Во всех случаях в негативном контроле неспецифическая реакция отсутствовала. Позитивным контролем для антител к гормонам служили реакции на образцах ПЖ взрослых людей.

Позитивным контролем для нейромаркеров (NSE, S100, GFAP, NGF-r, MBP, PMP-22) были образцы головного мозга взрослого человека и мыши. Для антител к кластерам дифференцировки в качестве позитивного контроля были использованы реакции на образцах глоточной миндалины взрослого человека (Рисунок 1).

Таблица 3 Характеристика использованных антител и условия проведения реакций

Антитела	Фирма	Демаскирование	Рабочие	Инкубация
	производитель	антигена	разведения	
Мышиные	"Sigma"	нет		
моноклональные				45 мин. при
антитела к инсулину,			1:16000	комнатной
				температуре
				(KT)
Мышиные	«ThermoScientific»,	нет		
моноклональные			1:400,	45 мин. при
антитела к инсулину				КТ
Кроличьи	«Santa Cruz»,	нет	1: 1000	45 мин. при
поликлональные				КТ
антитела к инсулину				
Мышиные	"Sigma"	нет	1:16000	45 мин. при
моноклональные				КТ
антитела к глюкагону,				
Кроличьи	«ThermoScientific»,	нет	1:100	45 мин. при
поликлональные				КТ
антитела к глюкагону				
Кроличьи	«ThermoScientific»,	нет	1:100	45 мин. при
поликлональные				КТ
антитела к				
соматостатину				
Мышиные	"Cell Marque",	нет	1:100, 1:200	45 мин. при
моноклональные	«ThermoScientific»			КТ
антитела к				
нейронспецифической				
енолазе (NSE), клон				
E27				
Кроличьи	"Neomarkers.	нет	1:100,	45 мин. при
поликлональные	ThermoScientific"			КТ

антитела к белку S-				
100				
Мышиные	"Neomarkers.	нет	Готовые к	60 мин. при
моноклональные к	ThermoScientific"		использованию	КТ
рецептору фактора				
роста нервов р-75				
(NGF-r)				
Мышиные	"Neomarkers.	нет	Готовые к	60 мин. при
моноклональные к	ThermoScientific"		использованию	КТ
кислому глиальному				
фибрилярному белку				
(GFAP)				
Кроличьи	"Neomarkers.	нет	Готовые к	60 мин. при
поликлональные к	ThermoScientific"		использованию	КТ
основному белку				
миелина (МВР)				
Кроличьи	"Neomarkers.	нет	Готовые к	60 мин. при
поликлональные к	ThermoScientific"		использованию	KT
периферическому				
белку миелина (РМР-				
22)				
Кроличьи,	Lab Vision Corp,	Кипячение	Готовые к	20 мин при
эпитопспецифичные	NeoMarkers	срезов в 0,01М	использованию	KT
антитела к кластеру		цитратном		
дифференцировки		буфере в		
CD8		течение 10 мин		
Мышиные	Lab Vision Corp,	Кипячение	Готовые к	120 мин при
моноклональные	NeoMarkers	срезов в 0,01М	использованию	KT
антитела к CD16		цитратном		
		буфере в		
		течение 10 мин		
Мышиные	Lab Vision Corp,	нет	Готовые к	60 мин при
моноклональные	NeoMarkers		использованию	KT
антитела к CD20				
			1	1

Мышиные	Lab Vision Corp,	Кипячение	Готовые к	60 мин при
моноклональные	NeoMarkers	срезов в 0,01М	использованию	КТ
антитела к CD25		цитратном		
		буфере в		
		течение 10 мин		
Мышиные	Lab Vision Corp,	Кипячение	Готовые к	120 мин при
моноклональные	NeoMarkers	срезов в 0,01М	использованию	КТ
антитела к CD71		цитратном		
		буфере в		
		течение 10 мин		

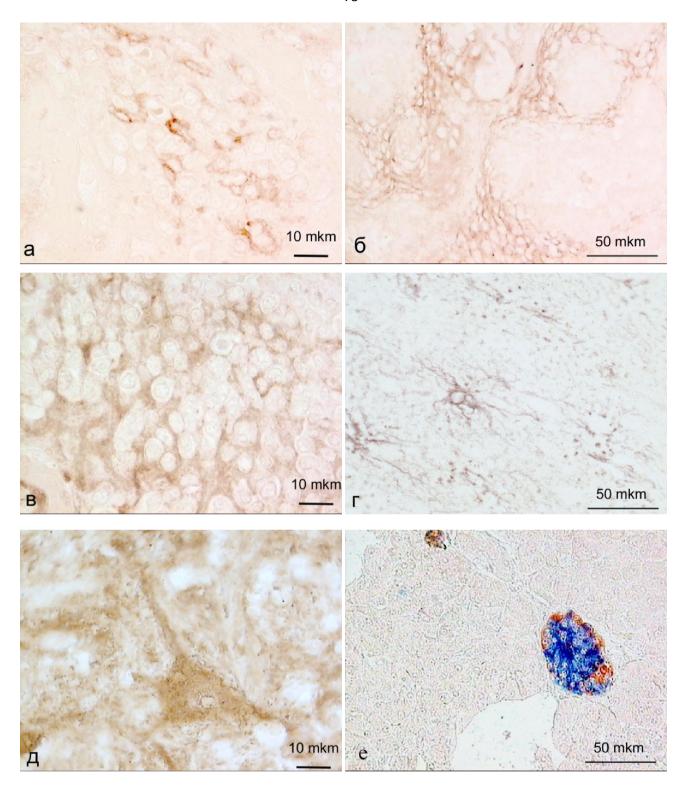


Рис. 1. Примеры позитивных контролей: а, б, в, - срезы глоточной миндалины человека (а - антитела к CD 16, б - CD 25, в - CD 71); г - срез астроцитомы головного мозга человека, ИГХ реакция на GFAP; д - срез головного мозга мыши, реакция на NSE; е - срез ПЖ взрослого человека, двойное окрашивание, инсулин + глюкагон

2.2.3 Микроскопическое исследование гистологических и иммуногистохимических препаратов

Полученные препараты (с учетом метода окрашивания) изучали при помощи световых (Leica DM LS и Микмед-6), иммунофлуоресцентного (Микромед 3 ЛЮМ LED) и конфокального (TCS SP5; Leica Microsystems) микроскопов, оснащенных системами видеозахвата и соответствующим программным обеспечением.

При исследовании ПЖ гистологическими методами для плодов и новоржденных человека разных сроков развития отмечали, особенности организации эндокринной части в зависимости от срока развития, характер кровоснабжения и иннервации, а также наличие или отсутствие патологий. У взрослых людей обращали основное внимание на 4 параметра: наличие воспалительной реакции, разрастание соединительной ткани (склеротические изменения), липоматоз и отложение амилина (амилоидоз) в островках.

При исследовании образцов ПЖ иммуногистохимическими методами обращали внимание на наличие и особенности реакции на использованные антитела. При оценке иммуногистохимических препаратов отмечали наличие или специфической отсутствие иммунопозитивной реакции, распределение иммунореактивного материала в ткани железы и его распределение внутри клеток (ядерная или цитоплазматическая локализация). При этом основное внимание на изучение островков Лангерганса: направлено форму островка, особенности расположения гормон-содержащих клеток внутри островка, форму эндокринных клеток, колокализацию гормонов и нейральных маркеров в клетках островков, особенности иннервации и васкуляризации.

Для более полного исследования структуры нейроинсулярных комплексов для части образцов (Приложение, Таблица 4) по серийным срезам были сделаны трехмерные реконструкции и модели при помощи программ Photoshop CS6

Extended (Adob Systems Incorporated, США), Image J 1.48v (NIH, США) и приложения к Image - Fiji (Приложение, схема 1).

2.2.4 Морфометрическое исследование гистологических и иммуногистохимических препаратов

В ходе морфометрического анализа образцов ПЖ решался целый ряд задач:

- 1. Изучение распределения и размера различных структур эндокринной части ПЖ (одиночные клетки, кластеры, островки плащевого типа, биполярные и смешанные островки) в онтогенезе человека.
- 2. Оценка динамики количества инсулин-, глюкагон- и соматостатин- содержащих клеток в пре- и постнатальном онтогенезе.
- 3. Исследование зависимости васкуляризации и клеточного состава островков от их размера (у взрослых людей, не страдавших нарушениями углеводного обмена).
- 4. Изучение динамики плотности расположения структур нервной системы в пренатальном развитии человека.
- 5. Количественный анализ распределения нейро-инсулярных комплексов 1 (эндокринные клетки интегрированы с нервными) и 2 (эндокринные клетки интегрированы с нервными волокнами) типов в пре-и постнатальном онтогенезе.
- 6. Оценка количественных показателей распределения островков при сравнительном исследовании морфологических и иммуногистохимических изменений поджелудочной железы у взрослых людей разных возрастных групп и при сахарном диабете 1 и 2 типов.
- 7. Определение степени васкуляризации крупных островков у плодов от матерй с СД.

Для решения этих задач обработанные, в зависимости от цели исследования, гистологическими или иммуногистохимическими методами срезы фотографировали с применением видеозахвата. Увеличение объектива подбирали в зависимости от цели исследования. Морфометрический анализ проводился на

микрофотографиях как непосредственно оператором, так и полуавтоматическим способом при помощи программ Scion Image (Scion corporation, США) или, позднее, ImageJ 1.43u и 1.48v(NIH, США). Сводное описание морфометрических исследований приведено в Приложении, таблица 5.

Все данные заносились в таблицы в программах Statistica 6.0, NCSS 2004 (Statsoft Inc., Tusla, США), Trial Version Statistica 13.2 (Dell Inc., США) и Microsoft Exsel, 2007 (Microsoft, США).

2.2.5 Определение концентрации в периферической крови глюкагона, Спептида и антител к инсулину

Образцы крови были собраны в пробирки с К-ЭДТА и апротинином. Для дальнейшего анализа плазма была заморожена при -20°C. Количественная оценка концентрации глюкагона в плазме крови проведена методом конкурентного иммуноферментного анализа с использованием наборов фирмы "BioVendor" (Hong-Kong, Китай) на автоматическом ИФА анализаторе (Adaltis, Италия). Поскольку все пациенты регулярно вводили экзогенный инсулин, собственный синтез и секрецию инсулина определяли концентрации С-пептида. ПО Концентрация С-пептида, антител К инсулину выполнена методом иммунорадиометрического анализа c использованием наборов фирмы "IMMUNOTECH" (Франция). Эта часть исследования была проведена специалистами из ФГБОУ ВПО "Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова" МО РФ, Санкт-Петербург и ФГУП «Анти-допинговый центр», Москва.

2.2.6 Статистический анализ

Статистические расчеты и построение графиков проводились при помощи программ Statistica 6.0, NCSS 2004 (Statsoft Inc., Tusla, США), Microsoft Exsel, 2007 (Microsoft, США) и, позднее, Trial Version Statistica 13.2 (Dell Inc., США).

Для оценки статистической значимости различий сравниваемых выборок применялись непараметрические методы - критерии, адекватные небольшим выборкам, не использующие информацию о параметрах распределения. Для описания материала использованы понятия медианы (Ме) - значения, которое делит распределение пополам, и перцентилей (П): 25П (q1 — нижний квартиль) и 75П (q3 — верхний квартиль). Во всех процедурах статистического анализа рассчитывался достигнутый уровень значимости (р), при этом критический уровень значимости в данном исследовании принимался равным 0,05.

Обработка для качественных показателей (наличие или отсутствие воспалительной реакции, фиброза и липоматоза ПЖ и амилоидоиза островков) проводились по точному методу Фишера. Точный метод Фишера — тест статистической значимости, используемый в анализе категориальных данных для маленьких выборок или редких данных.

Для сопоставления одновременно больше чем 2 выборок (при изучении распределения и размера различных форм эндокринной части в раннем онтогенезе человека, оценке динамики количества инсулин-, глюкагон и соматостатин-содержащих клеток, плотности распределения структур нервной системы и анализе распределения НИК1 и НИК2 в пре- и постнатальном онтогенезе, а также при оценке количественных показателей распределения морфологических островков В сравнительном исследовании иммуногистохимических изменений поджелудочной железы у взрослых людей разных возрастных групп и при сахарном диабете 1 и 2 типов) был использован Краскела-Уоллиса. тест Oн является непараметрическим критерием множественного сравнения, аналогом дисперсионного анализа, с помощью обнаруживается различие нескольких выборок. Для которого попарного

сравнения был использован тест Манна–Уитни. При необходимости сравнения нескольких групп одновременно вносили поправку Бонферрони, согласно Гржибовскому А.М. (2008), или применяли метод множественного сравнения по среднему рангу для всех групп (Trial Version Statistica 13.2, Dell Inc., USA).

Исследование взаимосвязи между количественными признаками осуществляли при помощи парного коэффициента линейной корреляции Спирмена (r).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

- 3.1 Распределение гормон-содержащих клеток в эндокринной части поджелудочной железы человека
- 3.1.1 Морфогенез эндокринной части поджелудочной железы в пренатальном периоде развития человека

В префетальном периоде развития с 10-й по 12-ю недели гр ПЖ состоит из системы связанных протоков. Количество протоков возрастает по мере роста плода (Рисунок 2 а,б). В этом периоде развития эндокринная часть ПЖ представлена одиночными эндокринными клетками, локализованными среди клеток протоков, а также небольшими скоплениями (кластерами) эндокринных клеток, которые располагаются преимущественно в центральной области ПЖ и связаны с протоками (Рисунок 2 в). В протоках были обнаружены утолщения пласта эпителиальных клеток, в которых концентрируются эндокринные клетки, образуя «почки» на протоке.

В-, А- и D-клетки выявлены уже на 10-й неделе гр у всех исследованных плодов этого срока. На этом сроке В-клетки располагаются преимущественно поодиночке или небольшими кластерами. Внутри кластеров В- клетки занимают центральное положение, А- и D-клетки располагаются преимущественно по внешней границе инсулин-содержащих клеток (Рисунок 2 г) или поодиночке. К 11-12-й неделе количество эндокринных клеток увеличивается. Размер кластеров на 11-12-й неделе г.р. может достигать свыше 100 мкм за счет удлиненной формы некоторых кластеров (Рисунок 2 д). В конце префетального периода, начиная с 12-й недели г.р., формируются панкреатические островки плащевого типа (Рисунок 2 е). Главными отличиями островка плащевого типа от скопления эндокринных клеток являются их большие размеры (диаметр от 40 мкм), сферическая форма И упорядоченная цитоархитектура \mathbf{c} центральным

расположением В-клеток и периферическим — А- и D-клеток. Зачастую на срезах видно, что эти островки сливаются, образуя комплексы из 2 и больше островков. Иногда внутри таких островков и комплексов можно обнаружить капилляр. Подобные островки присутствуют в центральной области развивающейся ПЖ. В периферических областях выявлены преимущественно одиночные эндокринные клетки и их небольшие кластеры.

Таким образом, эндокринная часть в префетальном периоде представлена одиночными эндокринными клетками, их кластерами, которые могут, однако, за счет расположения вдоль протоков достигать размера свыше 100 мкм в длину и, в конце этого периода, единичными островками плащевого типа, которые могут сливаться друг с другом, образуя достаточно крупные структуры.

В раннефетальном периоде (13-20 нед. гр) развития протоки железы становятся более разветвленными, начинает формироваться дольчатая структура ПЖ (Рисунок 3 а,б). Концевые отделы протоков железы образуют ацинусы. На сроке 13-14 недель гр в ПЖ выявлены одиночные эндокринные клетки, их кластеры (в том числе и крупные, вытянутые вдоль протоков) и островки плащевого типа. Кроме этого, начиная с 14–15 недели г.р., появляются так называемые биполярные островки (Рисунок 3 в-е), в которых группы В- и Аклеток расположены на разных полюсах островка. Интересно, что соматостатинсодержащие клетки располагаются в зоне А-клеток. Островки этого типа также появляются сначала в центральной части ПЖ, в то время как на периферии такой тип островков не выявляется. Часть биполярных островков на срезах ПЖ может проявляться как островки, содержащие только один (или преимущественно один гормон). Однако анализ серийных срезов показывает, что это лишь часть крупных биполярных островков. В среднефетальном периоде (21-28 нед.) гр строение эндокринной части ПЖ сходно с раннефетальным периодом (Рисунок 4 а-г). Однако, в конце этого периода, начиная с 25–27 недель г.р., появляются единичные островки сходные по своей морфологии со смешанными островками взрослых людей, т.е. содержащие А- и D-клетки не только на преиферии, но и внутри островка.

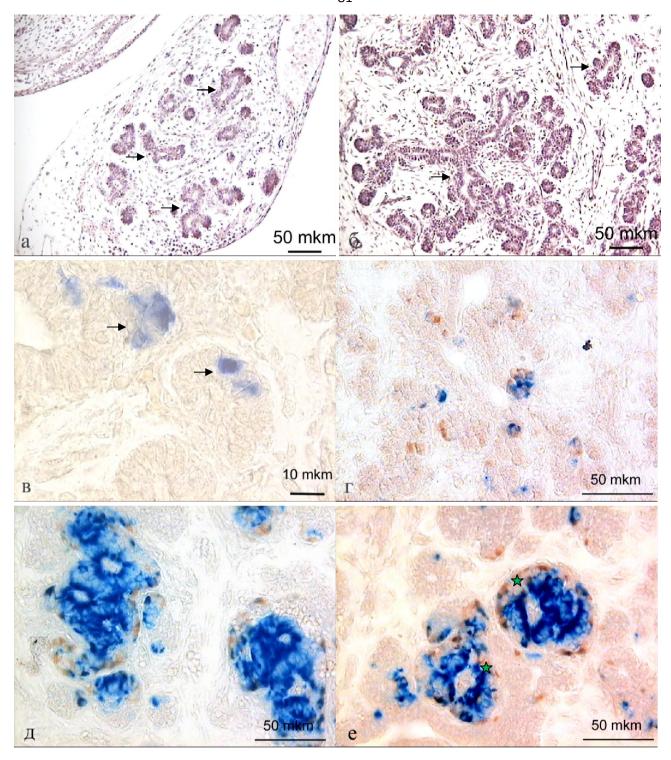


Рис. 2. Распределение эндокринных клеток ПЖ человека в префетальном периоде: а, б - система протоков на срезах ПЖ: а - плод 10 нед. гр, б - плод 12 нед. гр. Гематоксилин и эозин, некоторые протки отмечены стрелками; в - инсулинпозитивные клетки в протоках ПЖ плода 10 нед. гр (отмечены стрелками); г - распределение инсулин - и соматостатин- позитивных клеток в ПЖ плода 11 нед. гр; д, е - распределение инсулин - и глюкагон - позитивных клеток в ПЖ плода 12 нед. гр. Зелеными звездочками отмечены островки плащевого типа.

В позднефетальном периоде, с 29 недели г.р. и у новорожденных гистологическая структура ПЖ плодов становится более сходной со взрослыми людьми. Экзокринная часть представлена развитыми ацинусами, которые образуют основную массу долек железы, и их выводными протоками. Однако, и в этом периоде были выявлены все формы структурной организации эндокринной части (Рисунок 5).

Кроме этого, в эндокринных клетках развивающейся поджелудочной железы человека отмечена колокализация нескольких гормонов. При помощи двойного иммуногистохимического маркирования и при анализе смежных срезов, колокализация инсулина и глюкагона была выявлена, начиная с 11-й недели. Колокализация инсулина и глюкагона обнаружена в эндокринных клетках, локализованных поодиночке или небольшими кластерами в ацинарной паренхиме, в островках разного типа, а также среди клеток эпителия протоков (Рисунок 6). На более поздних сроках пренатального развития и у новорожденных колоколизация инсулина и глюкагона сохраняется.

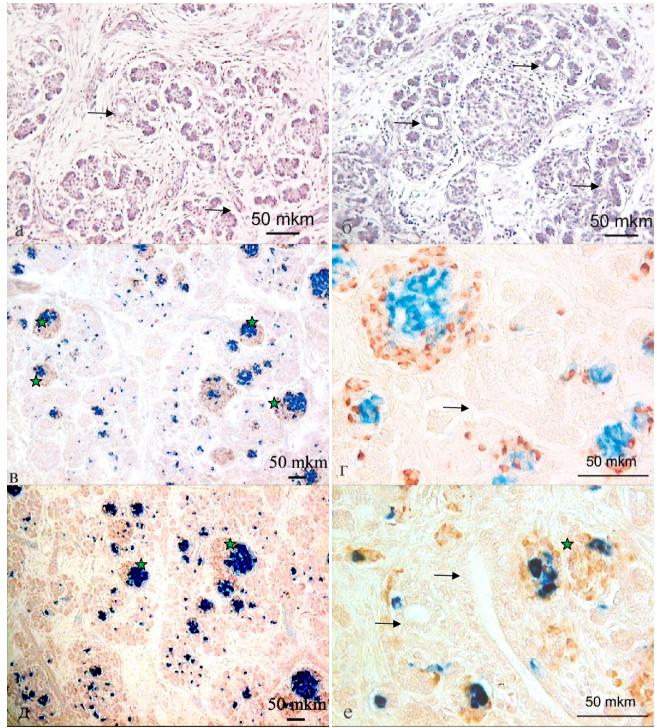


Рис. 3. Распределение эндокринных клеток ПЖ человека в раннефетальном периоде: а, б - система протоков на срезах поджелудочной железы: а - плод 14-15 нед. гр, б - плод 20 нед. гр. Гематоксилин - эозин; в, д - двойная ИГХ окраска на инсулин и глюкагон плодов на сроке 15-16 нед. гр (в) и 20 нед.гр (д); г, е - двойная ИГХ окраска на инсулин и соматостатин плодов на сроке 17 нед. гр (г) и 20 нед.гр (е). Стрелками отмечены некоторые протоки, зелеными звездочками - некоторые биполярные островки.

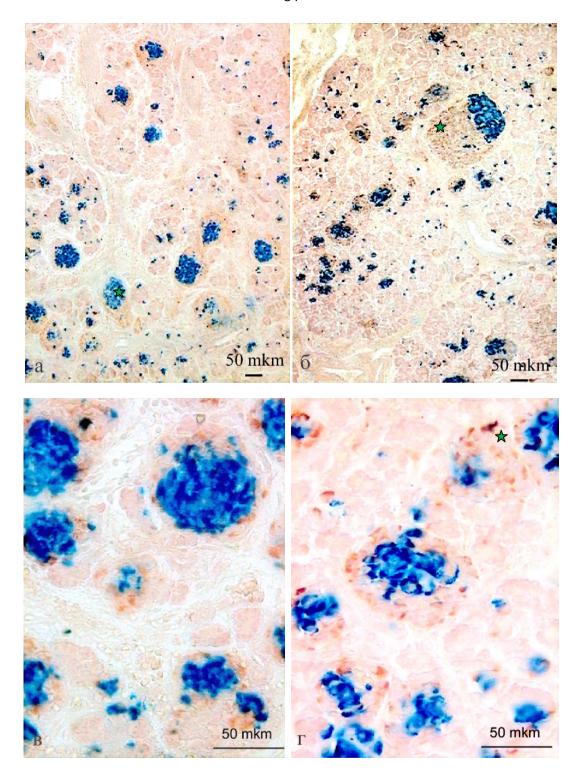


Рис. 4. Распределение эндокринных клеток ПЖ человека в среднефетальном периоде: а - двойная ИГХ окраска на инсулин и соматостатин плода на сроке 22 нед. гр; б, в, г - двойная ИГХ окраска на инсулин и глюкагон плодов на сроке 27 нед. гр (б), 22 нед.гр (в) и 27 нед.гр (г). Зелеными звездочками отмечены некоторые биполярные островки.

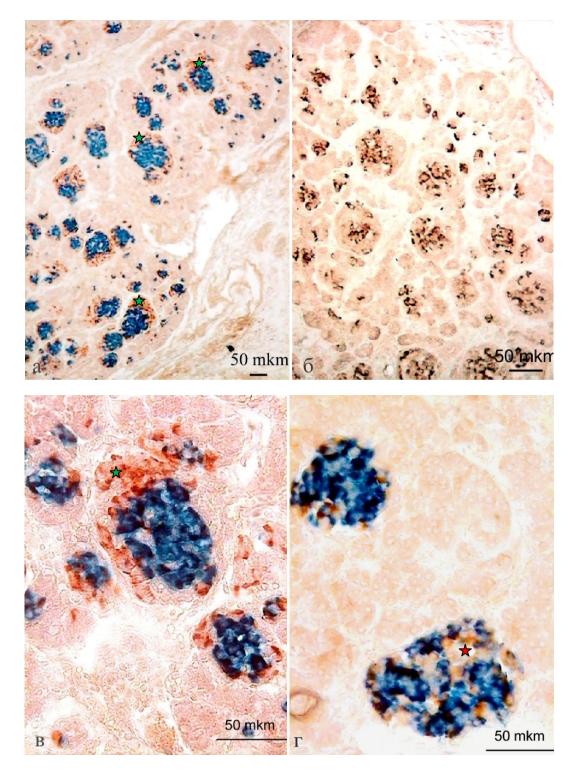


Рис. 5. Распределение эндокринных клеток ПЖ человека в позднефетальном периоде и у новорожденных: а - двойная ИГХ окраска на инсулин и глюкагон плода на сроке 30 нед. гр; б -реакция на инсулин на срезе ПЖ плода 32 нед. гр, в, г - двойная ИГХ окраска на инсулин и глюкагон плодов на сроке 30 нед. гр и 40 нед.гр (г). Зелеными звездочками отмечены некоторые биполярные островки, красной - смешанный островок (г).

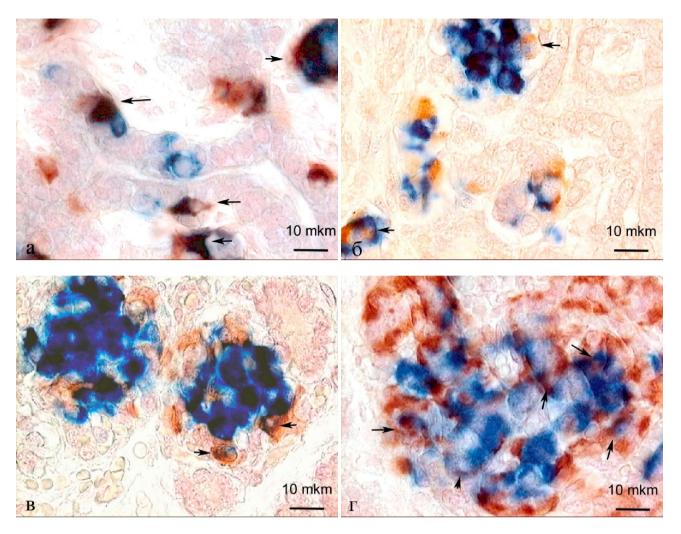


Рис.6. Колокализация инсулина и глюкагона (отмечена стрелками) на срезах поджелудочной железы человека: а - плод 12 нед. гр; б - плод 20 нед. гр; в - плод 22 нед. гр; г - плод 32 нед. гр;

3.1.2 Распределение гормон-содержащих клеток в эндокринной части поджелудочной железы взрослых людей

При сравнении образцов ПЖ у лиц зрелого возраста и лиц пожилого и старческого возраста, не страдавших нарушениями углеводного обмена, не было выявлено значимых изменений ПО наличию воспалительной реакции, склеротических изменений, липоматоза и амилоидоза. На срезах ПЖ всех взрослых людей, не страдавших нарушениями углеводного обмена, независимо от возраста и пола, было выявлено несколько основных вариантов распределения гормон-содержащих клеток (Рисунок 7 a). Были выявлены эндокринные клетки (Рисунок 7 б) и их небольшие кластеры (Рисунок 7в), а также скопления, состоящие только из В-клеток (Рисунок 7 г), рассеянные в ацинарной части ПЖ. Одиничные глюкагон-содержащие клетки обнаружены реже, чем содержащие инсулин. Кроме этого были выявлены небольшие островки с плащевым распределением клеток (Рисунок 7 д,е). Более крупные островки (Рисунок 8 а-е) содержат глюкагон-содержащие клетки внутри островка и, таким образом, могут быть причислены к смешанному (зрелому) типу. увеличения размеров островка количество А- и D-клеток, как правило, возрастает (см. ниже) и в ряде островков преобладает над числом В-клеток (Рисунок 8 д). В таких островках были выявлены инсулин-содержащие клетки с крупными ядрами и с крупными вакуолями в цитоплазме (Рисунок 9). В этих же островках также были выявлены клетки с лизисом ядер. Также были обнаружены островки с преобладанием А-клеток, в которых в большинстве инсулин- и глюкагонсодержащих клеток уменьшается количество, выявляемого ИГХ методами содержимого (Рисунок 8 е, 9г). Используя серии срезов, было показано расположение клеток в целых островках и, таким образом, установлено, что представленные выше типы расположения клеток в островках не являются артефактом двумерного изображения.

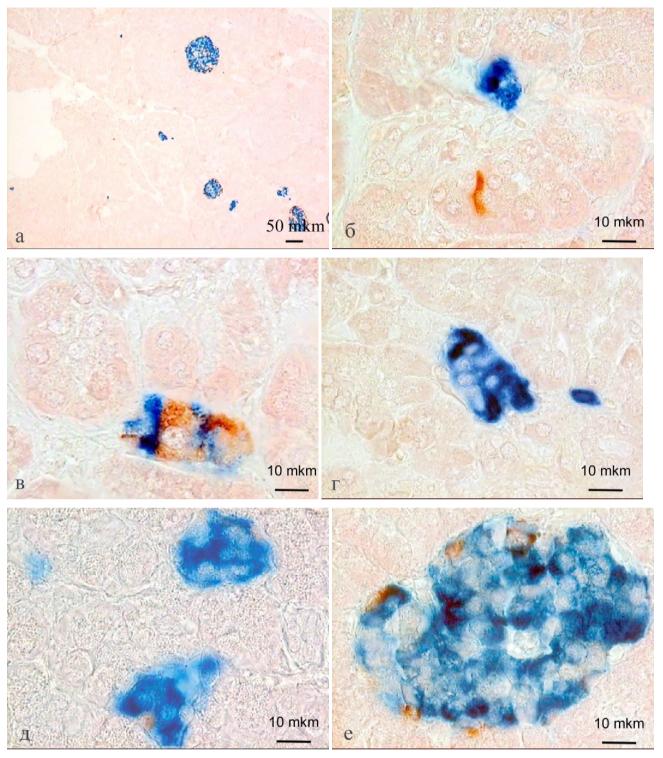


Рис. 7. Варианты распределения инсулин- и глюкагон-содержащих клеток в ПЖ взрослого человека. Двойное иммуногистохимическое окрашивание: инсулин + глюкагон: а - обзорная микрофотография, б- одиночные клетки, в,г,д - кластеры эндокринных клеток, е - островок плащевого типа.

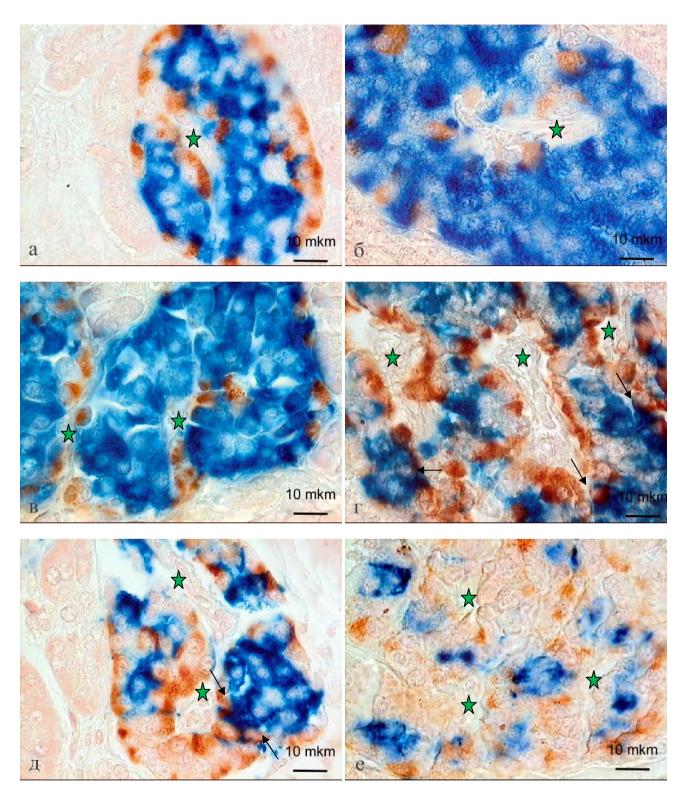


Рис. 8. Варианты распределения инсулин- и глюкагон-содержащих клеток в смешанных островках ПЖ взрослого человека. Двойное иммуногистохимическое окрашивание: инсулин + глюкагон. Звездочкой отмечены капилляры в островках: А-клетки внутри островков расположены вдоль капилляров. Стрелками отмечены некоторые клетки с колокализацией инсулина и глюкагона.

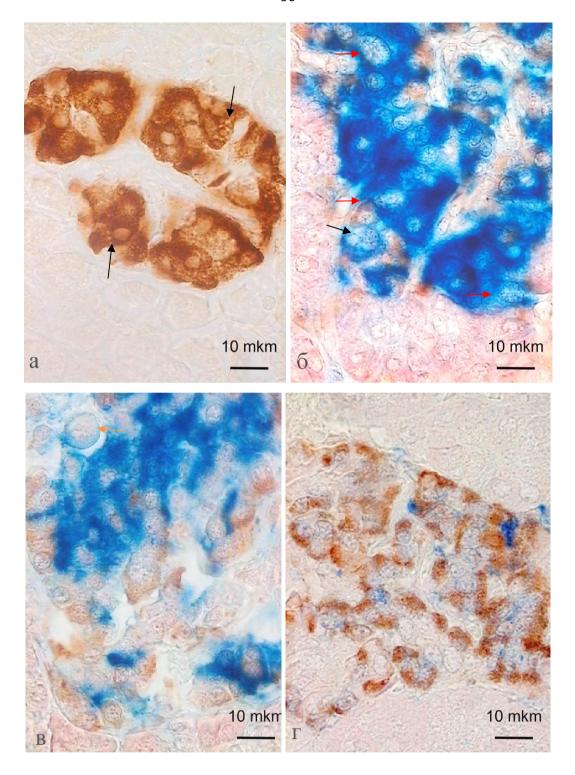


Рис. 9. Микрофотографии островков взрослых людей. Красными стрелками отмечены клетки с крупными ядрами, рыжая стрелка - лизис ядра, черными стрелками отмечена вакуолизация цитоплазмы. На рис. г заметно снижение выявляемого в реакции на инсулин содержимого а - ИГХ на инсулин в островке ПЖ женщины, 74 г.; б, в, г - Двойная ИГХ инсулин + глюкагон в островках: б - мужчины 62 г; в - женщины 75 лет; г - мужчины 70 лет.

Серии микрофотографий островков с различным распределением клеток представлены на Рисунках 10, 11.

Особый интерес представляет топография внутриостровковой организации эндокринных клеток. Была обнаружена положительная корреляция между площадью, занимаемой островком и площадью синусов капилляров (R=0,7532, р=0,0000). Глюкагон-содержащие клетки расположены по периферии островка (Рисунок 7 д, е; Рисунок 10 а,б) или, кроме этого, окружают капилляры внутри крупных (смешанных) островков (Рисунок 8 а-д; Рисунок 10 в; Рисунок 11). В крупных островках, с наибольшой площадью капилляров, А-клетки образуют своеобразный барьер между ними и инсулин-содержащими клетками (Рисунок 8 г,д; Рисунок 11). Соматостатин-содержащих клеток по сравнению с глюкагонбыло обнаружено меньше. Однако D-клетки обнаруживались в тесном соседстве с капилляром. Инсулин-содержащие клетки в крупных островках образовывали кластеры или тяжи в 2-3 клетки шириной, окруженные со всех сторон капиллярами с соседствующими с ними А- и Dклетками (Рисунок 8 г.д.; Рисунок 11). В исследовании выявлена положительная корреляция между размерами островков и относительным содержанием в них А-(r=0.78, p=0.001) и D-клеток (r=0.81, p=0.03). Таким образом, в наиболее крупных островках поджелудочной железы у взрослых людей показано повышение относительного содержания глюкагон- и соматостатин-содержащих клеток, в то время как для В-клеток обнаружено, соответственное, снижение. Кроме этого в островках Лангерганса взрослых людей при двойном окрашивании выявлены клетки, обнаруживающие колокализацию инсулина и глюкагона (Рисунок 8 г,д). Они расположены в основном также как и А-клетки на периферии островка или в непосредственной близости капилляров. При otстандартном иммуногистохимическом окрашивании на смежных срезах в одном и том же положении также выявлены клетки, в которых есть реакция как на антитела к инсулину, так и на антитела к глюкагону. Число таких клеток относительно невелико.

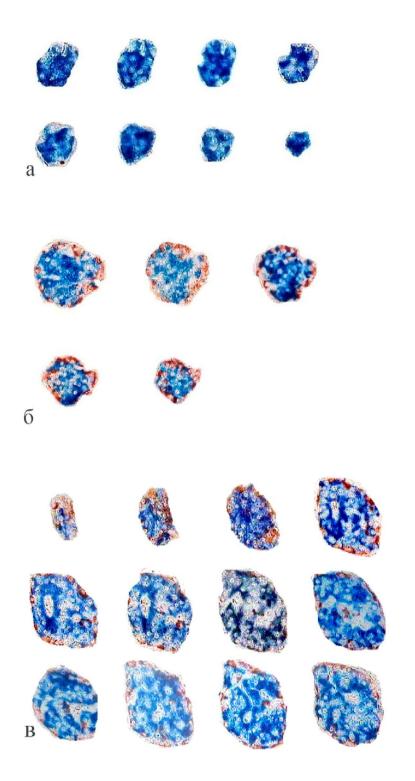


Рис. 10. Серии микрофотографий разных форм структурной организации эндокринной части ПЖ взрослого человека (м, 77 л), иллюстрирующие особенности распределения эндокринных клеток в островках разного строения: а) небольшой кластер; б, в) островоки плащевого типа. Двойная ИГХ окраска на инсулин и глюкагон. Объектив х40, шаг 10 мкм.

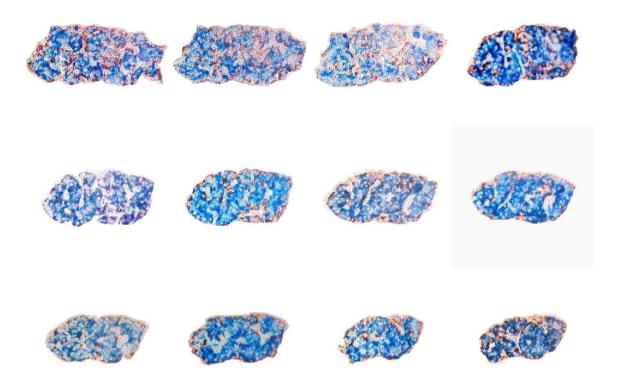


Рис. 11. Часть серии микрофотографий смешанного островка Лангерганса взрослого человека (м, 77 л), иллюстрирующая особенности распределения эндокринных клеток. Двойная ИГХ окраска на инсулин и глюкагон. Объектив х40, шаг 10 мкм.

3.1.3 Морфометрические параметры организации эндокринной части поджелудочной железы человека

В пренатальном развитии ПЖ человека были выявлены те же формы распределения клеток эндокринной части, что и у взрослых. Кроме этого у плодов обнаружен еще один тип распределения эндокринных клеток, который не встречается у взрослых людей - так называемые биполярные островки, в которых инсулин-содержащие клетки занимают один полюс островка, а глюкагон- и соматостатин-содержащие клетки - другой. Важно подчеркнуть, что каждая следующая форма не сменяет, а дополняет предыдущие, т.е. в зачатке ПЖ одновременно присутствуют различные формы организации ее эндокринной части.

Диаметр (Таблица 4, Приложение Таблица 6) плащевых островков (около 70 мкм) практически не изменяется на протяжении всего онтогенеза человека. Диаметр биполярных островков превышает 80 мкм, причем наиболее крупные выявляются в раннефетальном периоде, затем их диаметр постепенно снижается. Как было отмечено выше, у взрослых людей биполярные островки не выявлены. Диаметр смешанных островков превышает 100 мкм.

Таблица 4 Диаметр (в мкм) островков разных типов в пре- и постнатальном развитии, Ме (q1-q3)

Периоды	ПрФп	РФп	СрФп	ПФп	Взрослые
развития					
Типы островков					
Плащевые	56,92	66,9	64,63	66,8	70,16
Тест Крускалл – Уоллеса	(55,93-	(49,01-86,76)	(48,22-85,77)	(52,77-	(59,68-70,95)
p=0.99	71,54)			84,19)	
Биполярные	отсутствуют	104,15	93,08	82,61	отсутствуют
Тест Крускалл – Уоллеса		(92,88-133,6)	(78,55-	(63,64-	
p=0.99			122,83)	101,58)	
Смешанные	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют	115,02	200,18
Тест Манна-Уитни	_	_		(93,28-	(171,34-
p=0.00				128,66)	238,74)

При анализе распределения островков с разным диаметром было выявлено, что при развитии ПЖ относительное количество в кадре небольших островков и кластеров эндокринных клеток с диаметром от 40 до 55 мкм постепенно снижается, при этом нарастает количество средних (диаметром от 55 до 100 мкм) и крупных (диаметром свыше 100 мкм) островков (Таблица 5, Приложение Таблица 7). У взрослых людей, небольшие островки (или крупные кластеры эндокринных клеток) составляют 43% от всех островков, островки среднего размера — 47%, крупные островки — 9.4%. При этом площадь, занимаемая небольшими островками, у взрослых снижается до 16.8%, площадь, занимаемая островками среднего размера, возрастает до 47%, а крупными островками — до 38% (Таблица 6, Приложение Таблица 8).

Таблица 5 Относительное количество островков разного размера в онтогенезе человека, Ме (q1-q3)

Периоды	ПрФп	РФп	СрФп	ПФп	Взрослые	Тест
развития						Краскела
Диаметр						-Уоллиса
островков						
40-55 мкм	75,00	66,47	60,12	44,97	43,00	p=0,00
	(44,12-83,33)	(64,06-	(58,25-	(40,16-	(36,42-	
		75,68)	63,97)	51,38)	52,46)	
55-100 мкм	25,00	31,36	37,05	42,52	47,00	p=0,00
	(16,67-55,88)	(22,97-	(33,49-	(36,62-	(38,55-	_
		34,48)	39,21)	48,31)	50,6)	
свыше 100 мкм	отсутствуют	1,32	2,51	12,00	9,4	p=0,00
	_	(0,4-	(0,55-	(6,72-	(4,92-	
		2,56)	3,17)	13,72)	14,04)	

Таблица 6 Относительная площадь островков разного размера в онтогенезе человека, Ме (q1-q3)

Периоды	ПрФп	РФп	СрФп	ПФп	Взрослые	Тест
развития						Краскела
Диаметр						–Уоллиса
островков						
40-55 мкм	64,70	45,71	36,935	14,64	16,795	p=0,00
	(27,12-	(43,00-	(31,07-	(11,51-	(12,30-	
	71,00)	50,81)	42,30)	18,38)	22,92)	
55-100	35,30	46,13000	51,81	35,03	46,85	p=0,12
	(29,00-	(34,21-	(46,16-	(31,40-	(39,01-	
	72,88)	47,81)	59,21)	38,94)	53,29)	
свыше 100 мкм		8,00	6,68000	46,59	37,79	p=0,00
	0,00	(2,93-	_ ^	(46,42-	(19,71-	
		10,94)	(1,81-17,17)	57,09)	45,38)	

Для дальнейшего уточнения цитоархитектоники островков было предпринято сравнительное изучение числа инсулин-, глюкагон- и соматостатинсодержащих клеток при различных типах организации эндокринной части ПЖ. Анализ содержания В-клеток (Таблица 7; Приложение, Таблица 9) показал, что среднее число В-клеток в кластерах значимо выше в префетальном периоде и у взрослых людей. Во всем плодном периоде (13-40 недель г.р.) наиболее распространенный тип кластера содержал всего по 2-3 В-клетки на срезе. В островках плащевого типа, как в пренатальном онтогенезе, так и у взрослых, на срезах островков насчитывалось в среднем 12–14 В-клеток, за исключением префетального периода, в котором образовывались сложные сливающиеся плащевые островки, в которых содержание В-клеток было значимо выше (в среднем 22 клетки). В биполярных островках число В-клеток на срезе в среднем составляло 20-25 клеток (их число значимо повышалось в среднефетальном периоде, после чего в позднефетальном снижалось). На срезе смешанных островков у взрослых людей в среднем насчитывалось 68 В-клеток. Их количество значимо выше, чем в позднефетальном периоде.

Таблица 7 Количество В-клеток в разных формах организации эндокринной части ПЖ в онтогенезе человека, Ме (q1-q3)

Периоды развития	ПрФп	РФп	СрФп	ПФп	Взрослые	Тест Краскела –
Формы						Уоллиса
организации						
Одиночные	6,00	3,00	4,00	8,00	нд	p=0.00
клетки	(5,00-	(2,00-	(3,00-5,00)	(6,00-		
(в кадре	11,00)	6,00)		11,50)		
0,24х0.32 мм)						
Кластеры	4,00	2,00	2,00	2,00	10,00	p=0.00
	(2,00-7,00)	(1,00-	(2,00-4,00)	(1,50-3,50)	(7,00-	
		4,00)			10,00)	
Плащевые	22,00	9,00	12,50	11,00	17,00	p=0.02
островки	(20,00-	(7,00-	(11,00-	(9,00-	(9,00-	
	24,00)	15,00)	18,00)	21,00)	19,00)	
Биполярные	нет	16,00	24,00	10,00	нет	p=0.08
островки		(8,00-	(18,50-	(8.00-		
		26,00)	32,50)	12,00)		
Смешанные	нет	нет	нет	33,00	68,00	
островки				(30,00-	(50,00-	
				43,50)	83,00)	

Анализ содержания А-клеток (Таблица 8; Приложение, Таблица 10) показал, что среднее число одиночных А-клеток и их количество в кластерах остается постоянным во всех периодах развития. В островках плащевого типа, как в пренатальном онтогенезе, так и у взрослых, на срезах островков насчитывалось в среднем 5-6 А-клеток, за исключением префетального периода, в котором образовывались сложные сливающиеся плащевые островки. В этих островках содержание А-клеток - выше. В биполярных островках число А-клеток на срезе равно или даже превышает количество В-клеток. На срезе смешанных островков количество А-клеток взрослых превосходит значимо ИΧ число позднефетальном периоде.

Таблица 8 Количество А-клеток в разных формах организации эндокринной части ПЖ в онтогенезе человека, Ме (q1-q3)

Периоды	ПрФп	РФп	СрФп	ПФп	Взрослые	Тест
развития						Краскела –
Формы						Уоллиса
организации						
Одиночные	1,50	3,00	5,00	5,00	нд	p=0.39
клетки	(0,00-	(3,00-	(1,00-5,00)	(1,00-5,00)		
(в кадре 0,24х0.32	4,00)	4,00)				
MM)						
Кластеры	1,00	1,00	1,00	1,00	нд	p=0,46
	(0,00-	(1,00-	(1,00-2,00)	(0,00-		
	3,00)	2,00)		1,00)		
Плащевые	16,00	6,00	5,00	6,00	3,00	p=0,28
островки	(4,00-	(4,00-	(3,00-8,00)	(4,00-	(0,00-	
	16,00)	9,00)		11,00)	14,00)	
Биполярные	нет	22,00	18,00	31,00	нет	p=0.30
островки		(15,00-	(9,00-	(19,00-		
		34,00)	28,00)	43,00)		
Смешанные	нет	нет	нет	10,00	47,00	
островки				(8,00-	(29,00-	
				18,00)	70,00)	

При анализе количества D-клеток (Таблица 9; Приложение, Таблица 11) выявлено, что в онтогенезе их число достоверно снижается во всех формах структурной организации эндокринной части ПЖ. В островках плащевого типа в пренатальном онтогенезе человека количество D-клеток колеблется от 6 до 9 клеток на срезе, в то время как у взрослых, обычно, не превышает 2. В биполярных островках число D-клеток на срезе в среднем составляет 17 клеток в раннефетальном периоде и только около 7 - в позднефетальном. На срезах смешанных островков в среднем насчитывается только 9 D-клеток. У взрослых людей число D-клеток достоверно уменьшается по сравнению с плодным периодом развития одновременно как в кластерах, так и в островках плащевого типа. Этот процесс происходит поэтапно: наибольшее содержание D-клеток во всех структурах эндокринной части ПЖ (одиночные клетки, кластеры, плащевые

и биполярные островки) выявлено в пре- и раннефетальном периодах. А уже в среднефетальном периоде оно - ощутимо ниже.

Таблица 9 Количество D-клеток в разных формах организации эндокринной части ПЖ в онтогенезе человека, Me (q1-q3)

Периоды развития Формы организации	ПрФп	РФп	СрФп	ПФп	Взрослые	Тест Краскела – Уоллиса
Одиночные клетки (в кадре 0,24x0.32 мм)	6,00 (4,00- 9,00)	3,00 (2,00- 7,00)	1,00 (0,00- 1,00)	2,00 (1,00-3,00)	нд	p=0.00
Кластеры	2,00 (1,00- 4,00)	2,00 (1,00- 3,00)	1,00 (1,00- 2,00)	1,00 (1,00-2,00)	1,00 (0,00- 1,00)	p=0.004
Плащевые островки	5,00 (3,00- 8,00)	7,00 (5,00- 11,00)	7,00 (5,00- 10,00)	5,00 (5,00-8,00)	0,00 (0,00- 2,00)	p=0.008
Биполярные островки	отсутств уют	17,00 (11.00- 25,00)	14,00 (9,00- 22,00)	7,00 (6,00-8,00)	отсутств уют	p=0.0579
Смешанные островки	отсутств уют	отсутству ют	отсутству ют	10,00 (9,00-17,50)	8,00 (5,00- 13,00)	

Для более наглядного отображения процессов, происходящих в ПЖ человека во время развития, подсчитано соотношение числа инсулин-содержащих клеток к общему числу инсулин- и глюкагон-содержащих клеток. Эти данные предоставлены в таблице 10 и в приложении, таблица 12. Из приведенных данных видно, что у взрослых людей по сравнению с пренатальным периодом происходит заметное увеличение процентного содержания В-клеток в плащевых островках, несмотря на то, что при простом подсчете А- и В-клеток в островках плащевого типа значимого изменения их количества не выявлено.

Таблица 10 Соотношение инсулин-содержащих клеток к общему числу инсулин- и глюкагон-позитивных клеток (в %), Ме (q1-q3)

Периоды развития Формы организации	ПрФп	РФп	СрФп	ПФп	Взрослые	Тест Краскела – Уоллиса
Одиночные клетки (в кадре 0,24x0.32 мм)	73,00 (50,00- 100,0)	50,00 (40,00- 60,00)	65,50 (56,00- 86,00)	50,00 (29,00- 80,00)	нд	p=0,15
Кластеры	57,00 (50,00- 100,0)	60,00 (50,00- 75,00)	60,00 (50,00- 80,00)	50,00 (50,00- 100,0)	нд	p=0,97
Плащевые островки	67,00 (64,00- 69,00)	61,00 (50,00- 75,00)	57,50 (50,00- 71,50)	67,00 (59,00- 76,00)	94,00 (70,00- 100,0)	p= 0,007
Биполярные островки	нет	56,00 (46,00- 62,00)	42,00 (18,00- 63,00)	58,00 (56,00- 60,00)	нет	p=0,24
Смешанные островки	нет	нет	нет	59,00 (56,00- 59,00)	56,00 (50,00- 68,00)	

Также было подсчитано соотношение числа инсулин-содержащих клеток к общему числу инсулин- и соматостатин-позитивных клеток (Таблица 11, Приложение, таблица 13). Если брать это соотношение в целом (не разделяя по типам организации эндокринной части), то получается, что в префетальном периоде популяция D- клеток занимает 33%, в раннефетальном - 47%, в среднефетальном - 33%, в позднефетальном - 27%, а у взрослых - только 9% от общего числа D- и B-клеток.

В ходе пренатального развития ПЖ общая площадь, занимаемая В-клетками на срезе, постепенно нарастает и составляет: в префетальном периоде от 0.3% до 1,5 % площади; в раннефетальном периоде от 1.5% до 3,8%; в среднефетальном периоде от 4% до 7%; в позднефетальном периоде – не превышает 7% площади среза. У людей зрелого возраста, не страдающих нарушениями углеводного обмена, площадь, занимаемая клетками иммунореактивными к инсулину составляет примерно 1% (1,3 (1,14-1,38)). В пожилом и старческом возрасте этот

показатель увеличивается (1,485 (1,36-3,44)) и может достигать 4%.

Таблица 11 Соотношение инсулин-содержащих клеток к общему числу инсулин- и соматостатин-позитивных клеток (в %), Ме (q1-q3)

Периоды развития Формы организации	ПрФп	РФп	СрФп	ПФп	Взрослые	Тест Краскела – Уоллиса
Одиночные клетки (в кадре 0,24x0.32 мм)	55,00 (45,00- 61,00)	50,00 (30,00- 68,00)	81,50 (67,00- 100.0)	82,00 (70,00- 90,00)	нд	p=0.00
Кластеры	62,00 (50,00- 80,00)	50,00 (50,00- 75,00)	67,00 (50,00- 88,00)	70,50 (50,00- 80,00)	90,00 (90,00- 100,00)	p=0.05
Плащевые островки	85,00 (79,00- 87,50)	54,00 (45,00- 70,00)	63,50 (55,50- 74,00)	72,00 (64,00- 81,00)	100,00 (85,00- 100,00)	p=0.0000
Биполярные островки	нет	48,00 (35,00- 59,00)	61,00 (60,00- 71,00)	58,50 (57,00- 60,00)	нет	p=0.01
Смешанные островки	нет	нет	нет	74,98500 (66,35- 81,14)	87,74 (84,75- 93,26)	

Общее количество островков на единицу площади в ПЖ человека после 60 лет значимо увеличивается (p=0.028) по сравнению с лицами зрелого возраста. Таким образом, в процессе старения плотность распределения островков возрастает. Однако процесс увеличения плотности распределения островков начинается раньше 60 лет. При сравнении лиц в возрасте до и после 50 лет также было выявлено значимое увеличение числа островков на единицу площади в более старшем возрасте (p=0.019). При этом возрастало количество крупных смешанных островков диаметром свыше 200 мкм (p=0.03) (Приложение, Таблица 14).

3.2 Распределение пан-нейральных маркеров в поджелудочной железе человека

3.2.1. Локализация пан-нейральных маркеров в структурах нервной системы поджелудочной железы человека

В предплодном периоде (10–12 нед. гр) уже на 10-й неделе гестационного развития при помощи антител к NSE и S100 обнаружены слаборазветвленные ганглии, пучки нервных волокон нервные расположенные формирующимися протоками ПЖ (Рисунок 12 a,6). Локализация двух нейромаркеров различна. В нервах NSE-позитивные волокна формируют сердцевину, в то время как маленькие S100+ клетки окружают их. Крупные клетки ганглиев были NSE - позитивны, а мелкие, окружающие их, сателлитные клетки - S100-позитвны. В телах ганглионарных нейронов реакция на S100 была иммунонегативной (Рисунок 15, а).

Сеть тонких нервных волокон на этом сроке не развита. В ряде случаев выявлены пучки нервных волокон вблизи крупных сосудов. Нервные ганглии в поджелудочной железе 10-ти-12-ти-недельных плодов представляют собой небольшие группы клеток (рис. 12 б).

В раннефетальном периоде, с 13 нед. гр, как уже было указано выше, начинается формирование долек ПЖ. С этого же времени начинается активное формирование островков Лангерганса и иннервации эндокринной части ПЖ (Рисунок 12 в, г). Анализ распределения положительной реакции на антитела к пан-нейральным маркерам в структурах периферической нервной системы показал, что позитивная реакция на белок S-100 наблюдается в сателлитных клетках интрамуральных ганглиев и шванновских клетках в составе пучков нервных волокон, в то время как NSE обнаруживается в телах и отростках нейронов. Волокна нервной системы в ПЖ 14–15-недельных плодов расположены

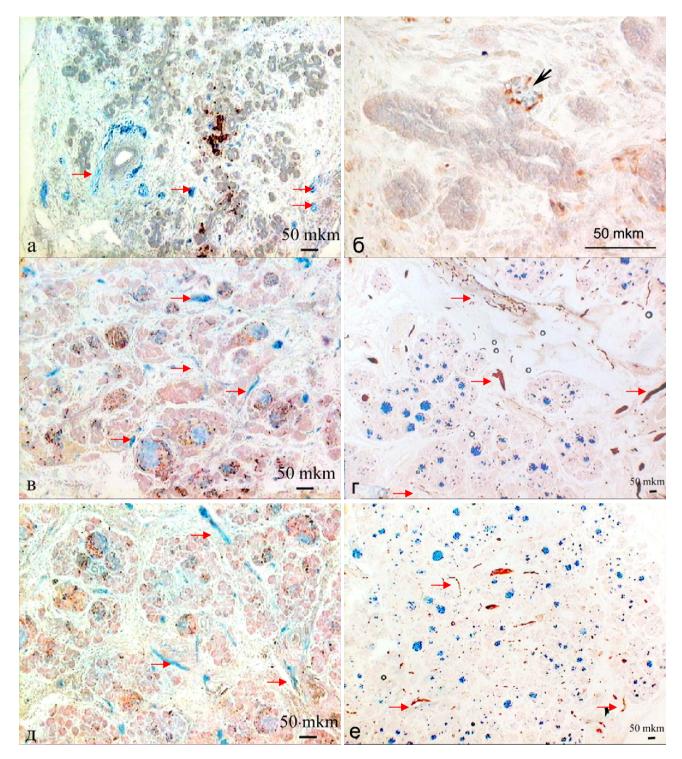


Рис. 12. Обзорные микрофотографии. Иннервация ПЖ в пре- (а, б), ранне- (в, г) и среднефетальном (д, е) периодах развития человека. Двойная иммуногистохимическая окраска: а) 11 нед. гр, NSE+ инсулин б) 10 нед. гр, NSE + S100; в) 15 нед. гр, NSE+ глюкагон; г) 16 нед. гр, инсулин + S100; д) 22 нед. гр, NSE+ глюкагон; е) 23 нед. гр, инсулин + S100. Красными стрелками отмечены некоторые из нервных волокон, черной - ганглий.

плотнее по сравнению с 10–12-й неделей развития (Приложение, Таблица 15). Более тонкие нервы проходят в междольковой соединительной ткани самостоятельно и вдоль сосудов. На этом сроке впервые выявляются нервные волокна и ганглии внутри долек. Продолжается формирование периваскулярных (Рисунок 12 г) и перидуктальных сплетений.

При развитии ПЖ и увеличении ее размеров происходит постепенное плотности распределения нервных изменение волокон ганглиев. среднефетальном периоде ПЖ плотность иннервации ПЖ больше, чем в раннефетальном (р=0,0077) (Приложение, Таблица 15). Это связано с тем, что при увеличении размеров долек крупные и средние пучки нервных волокон располагаются более разреженно, а сеть тонких нервных волокон постепенно разветвляется и становится более густой (Рисунок 12 д,е; Рисунок 13 а,б). В позднефетальном и неонатальном развитии подобное распределение нервных волокон сохраняется (Рисунок 13 в,г). У взрослых эта сеть гораздо более разрежена (Рисунок 13 д,е). На всех сроках развития в поджелудочной железе плодов плотность распределения структур нервной системы выше, чем у взрослых людей (Приложение, Таблица 15).

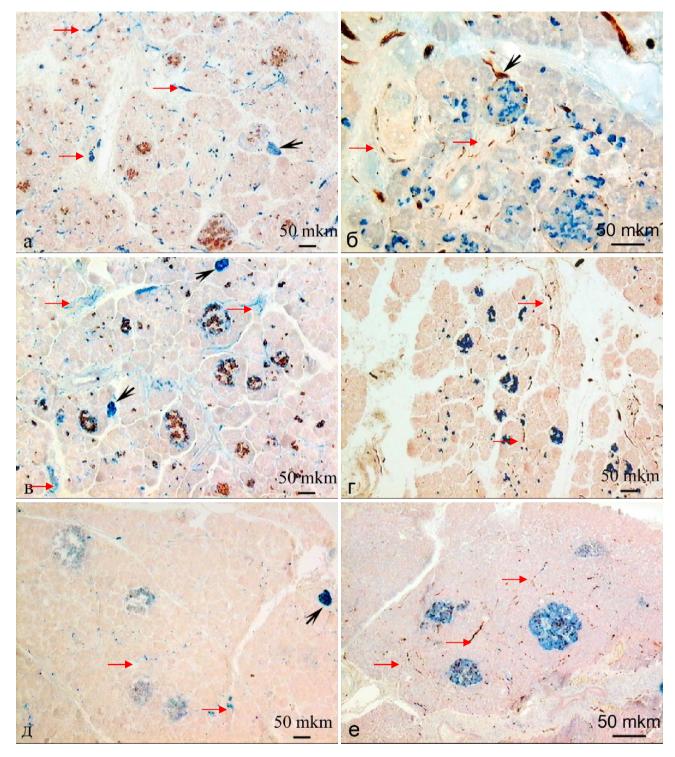


Рис. 13. Обзорные микрофотографии. Иннервация ПЖ в позднефетальном периоде (а, б), ребенка 3 месяцев (в, г) и взрослого человека (д, е). Двойная ИГХ окраска: а) 29 нед. гр, NSE+инсулин; б) 32 нед. гр, инсулин + S100; в) NSE + инсулин; г) инсулин + S100; д) мужчина, 88 лет, NSE; е) женщина, 83 г, инсулин + S100. Красными стрелками отмечены некоторые из нервных волокон, черными - ганглии.

На ряде образцов (Приложение, таблица 5) были применены другие маркеры нервной системы. Количество структур нервной системы, выявляемых в ПЖ человека при помощи антител к S100 и NSE, было выше, чем при помощи других, использованных в этой работе, нейральных маркеров. Поэтому реакции с их использованием были поставлены на ограниченном числе образцов.

На срезах ПЖ выявлена реакция на основной (МВР) и периферический (РМР 22) белки миелина. РМР 22 выявлен в нервных волокнах ПЖ на сроке 23 недель гестации и не обнаружен на сроке 16 недель. Экспрессия этого маркера у плодов сходна с таковой у взрослых людей. Однако у плодов плотность расределения нервных волокон выше, чем у взрослых (Рисунок 14).

Иммуногистохимическая реакция на МВР была поставлена только на плодах позднефетального периода (32 и 34 недели). В обоих случаях этот белок был выявлен только в нервных волокнах в наиболее крупных пучках, проходящих в соединительной ткани. При этом реакция в средних и тонких нервах и в клетках островков ПЖ человека отсутствовала.

Специфическая реакция на NGF-г была выявлена в нервных волокнах ПЖ и не обнаружена в клетках островков Лангерганса. Реакция наблюдалась в крупных пучках нервных волокон в соединительной ткани и тонких нервах, идущих вдоль сосудов и в ацинарной части ПЖ. Экспрессия этого маркера у плодов позднефетального периода (32 и 34 недели) сходна с таковой у взрослых людей, но при этом плотность иннервации поджелудочной железы плодов выше, чем у взрослых (Рисунок 14). Необходимо отметить, что количество тонких нервных волокон, экспрессирующих NGF-г, несколько меньше, чем тонких нервных волокон, иммунореактивных к PMP 22. Маркирование NGF-R и PMP позволило выявить как крупные, так и относительно тонкие нервные волокна. На представленных фотографиях заметна экспрессия этих нейромаркеров рядом с островками.

В структурах нервной системы в ПЖ иммунопозитивная реакция с антителами к GFAP наблюдалась в составе пучков нервных волокон различного диаметра, локализованных в междольковой и внутридольковой соединительной

ткани, а также в нервных волокнах периваскулярных и периацинарных нервных сплетений. В отдельных случаях были обнаружены островки, к которым подходили GFAP+ нервные волокна. В интрамуральных нервных ганглиях специфическая реакция на GFAP не обнаружена.

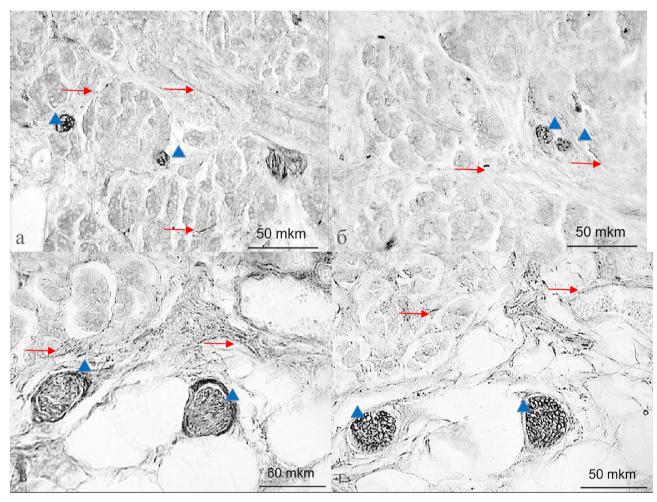


Рис.14. Распределение нейральных маркеров NGF-г (а,в) и PMP 22 (б,г) на срезах ПЖ: а) плод 32 нед.гр; б) плод 28-29 нед. гр; в, г,) мужчина, 51 г,; синими треугольниками отмечены поперечные срезы крупных нервов, красными стрелками - тонкие нервные волокна.

3.2.2. Нейроинсулярные комплексы поджелудочной железы в пре- и постнатальном онтогенезе человека

При изучении иннервации панкреатических островков человека показано, что, начиная с 14 нед. гр, в поджелудочной железе присутствуют различные типы взаимодействия между структурами нервной системы и эндокринными клетками. Их классификация приведена в обзоре литературы (таб.1). Как было уже сказано выше, на срезах развивающейся ПЖ были выявлены многочисленные ганглии (Рисунок 15 а). На 14 нед. гр. они обнаружены в междольковой соединительной ткани, а на 16 нед - также внутри долек. В ганглиях можно обнаружить инсулинили глюкагон-содержащие клетки, таким образом образующие НИК ІА (Рисунок 15 б). Однако гораздо чаще на срезах были выявлены ганглии напрямую соеденненые с достаточно крупным островкам. В этих комплексах нейроны ганглиев расположены в меж- или внутридольковой соединительной ткани, а островок расположен там же или заходит на периферию дольки (Рисунок 15 в). С помощью использованных нейромаркеров нервные клетки, расположенные внутри островка (т.е. НИК ІБ), не выявлены. Наибольшее число НИК І обнаружено на срезах ПЖ в раннем и среднем фетальном периоде (таблица 12) и снижалось в позднем. У взрослых НИК I типа встречаются гораздо реже и, в основном, не достигают значительных размеров, так как число нервных клеток в ганглии на срезе не превышает, как правило, 2-3. Эти комплексы расположены преимущественно в соединительной ткани (Рисунок 15 г). Число НИК І типа значимо отличается у взрослых людей и в фетальном периоде (Таблица 13 А).

НИК II типа также были выявлены в ПЖ человека. Эндокринные клетки и островки могут иннервироваться единичными нервными волокнами (Рисунок 16 а,б) или быть интегрированы с пучком нервных волокон (Рисунок 16 б,г). К панкреатическим островкам нервные волокна подходят самостоятельно или вдоль сосудов. Наибольшее число НИК II типа выявлено в позднефетальном периоде (таблица 12). В ПЖ взрослых людей в основном встречаются нейроэндокринные комплексы второго типа, которые представляют собой одиночные нервные

волокна, подходящие к панкреатическим островкам. При этом число НИК II типа, выявляемых в ПЖ взрослых людей на единицу площади, значимо снижается по сравнению с ранне-, средне- и позднефетальным периодом (Таблица 13 Б).

Таблица 12 Количество нейро-инсулярных комплексов на разных стадиях онтогенеза человека (в кадре 1x1,25 мм). (М \pm m)

Периоды развития	ник і	НИК II
Префетальный период	0	0
Раннефетальный период	0.3272±0.0901	1.0909±0.1765
Среднефетальный период	0.4878±0.0995	1.3170±0.2049
Позднефетальный период	0.2609±0.0936	3.6087±0.4434
Взрослые	0.0694±0.0302	0.3889±0.0701

Вероятность (Р) в тесте Манна-Уитни при попарном сравнении числа НИК в разных периодах онтогенеза человека: А. НИК I типа, Б. НИК II типа.

ПрФп				
0.1537	РФп			
0.0386	0.9190	СрФп		
0.374	0.9591	0.2187	ПФп	
0.474	0.0062	0.00	0.0130	Взр
A.				

ПрФп				
0.0035	РФп			
0.0018	0.3248	СрФп		
0.0001	0.00	0.00	ПФп	
0.0715	0.0002	0.00	0.00	Взр
Б.	•		•	

Таблица 13.

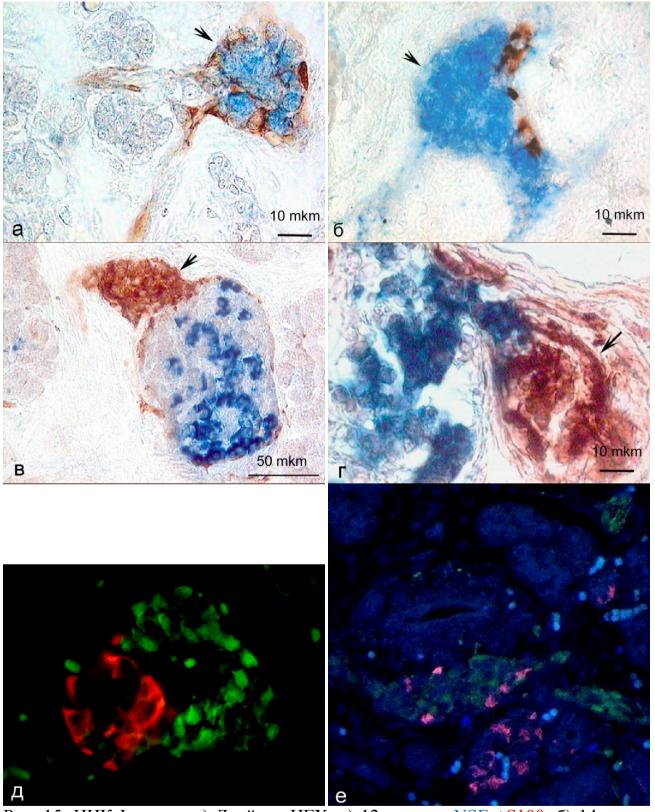


Рис. 15. НИК І типа. а-г) Двойная ИГХ: а) 12 нед, гр, NSE +S100, б) 14 нед, гр, NSE +инсулин, в) 28-29 нед, гр, инсулин +S100, г) м, 59 л, инсулин +S100; д,е) 20 нед. гр, двойная флуоресценция, глюкагон + S100, объектив х40; е) конфокальная микроскопия, двухмерная реконструкция. Стрелками отмечены ганглии.

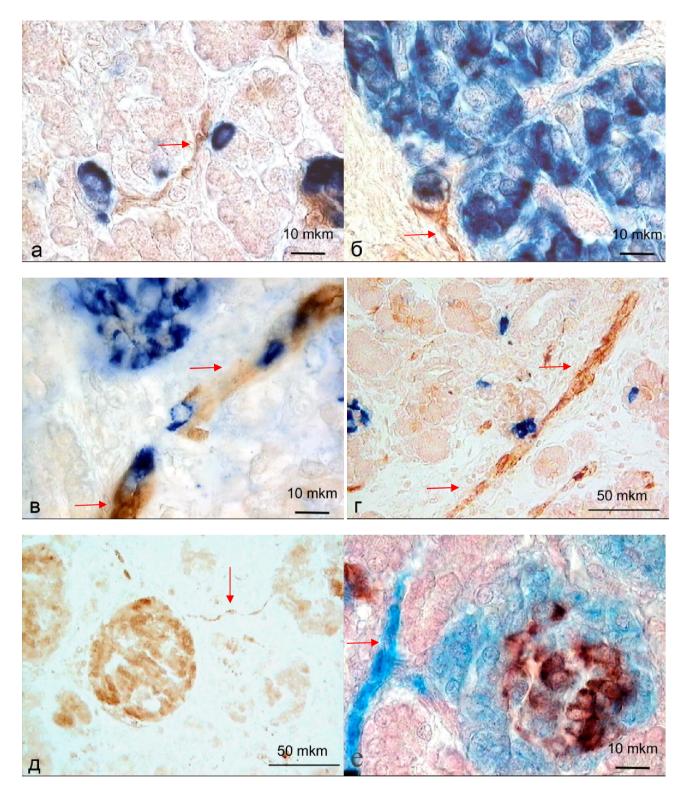


Рис. 16. НИК II типа. а-г) Двойная ИГХ: а,б) плод 27 нед, гр, NSE +S100, в) плод 14 нед. гр, инсулин+ S100, г) плод 22-23 нед. гр, инсулин+S100; д) 35 нед. гр, ИГХ на NSE; е) плод 27 нед. гр, двойная ИГХ NSE+инсулин. Красными стрелками отмечены нервные волокна.

Кроме вышеперечисленных форм интеграции структур нервной системы и эндокринной части ПЖ обнаружены более сложные комплексы, представляющие собой несколько островков, связанных нервными волокнами или интегрированных с одним ганглием (Рисунки 17,18).

Таким образом, начиная с раннефетального периода, в ПЖ человека выявлены НИК I и II типа, а также их различные подтипы: НИК I (единичные инсулин- или глюкагоносодержащие клетки в ганглии, ганглий ассоциированный с островком) и II типа: (единичные эндокринные клетки в нерве, нервные окончания, подходящие как к одиночным эндокринным клеткам, так и островкам), ганглии, ассоциированный сразу с двумя островками, островки, ассоциированные с 2 ганглиями. Анализ трехмерных реконструкций позволил также показать НИК смешанного типа (до 2 НИК I и 3 НИК II в одном островке) (Рисунки 17, 18). Наибольшее число таких сложных комплексов наблюдается в центральной части ПЖ, в то время как на периферии они не выявлены (Рисунок 17 г.д). Эти комплексы имеют большие размеры. На сроке 20 нед. обнаружены все вышеперечисленные типы НИК, а также выявлены НИК "переходного" типа. собой которые представляют ганглий, которого отходит расположенному рядом островку. Трехмерный анализ позволил выявить, что от одного ганглия могут отходить сразу несколько нервов к нескольким разным островкам. Таким образом, образуется густая сеть (Рисунки 17, 18). Однако, уже к концу среднефетального периода на 27 неделе гр число таких сложных комплексов на единицу объема ПЖ становится меньше, а нервная сеть - более разреженной. В позднефетальном периоде обнаружены лишь единичные НИК І в междольковой соединительной ткани, однако ганглий в них гораздо меньшего размера (2-3 клетки на срезе), чем в ранне- и среднефетальном периоде.

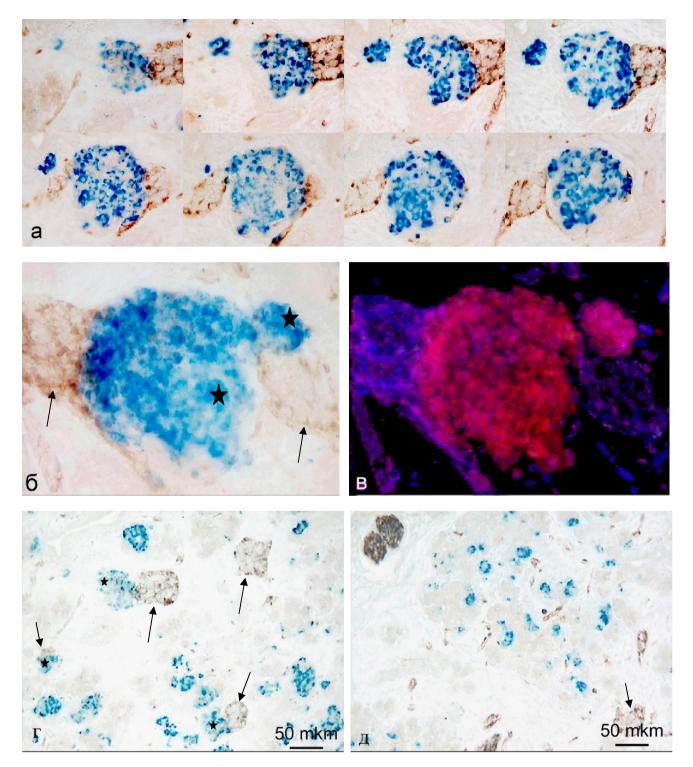


Рис. 17. а,б,в - сложный нейро-инсулярный комплекс плода 14 нед. гр., двойная ИГХ, инсулин+глюкагон + S100, объектив х40: а) микрофотограмма (серийные срезы); б, в) двухмерные реконструкции по серийным срезам : б) инсулин+глюкагон + S100, в) псевдоцвета инсулин+глюкагон+ S100. г,д - микрофотографии среза поджелудочной железы плода 14 нед. гр, инсулин+глюкагон и белок S100: А) центральная часть железы; Б) периферия. Стрелками отмечены ганглии, звездочками - островки в составе НИК 1.

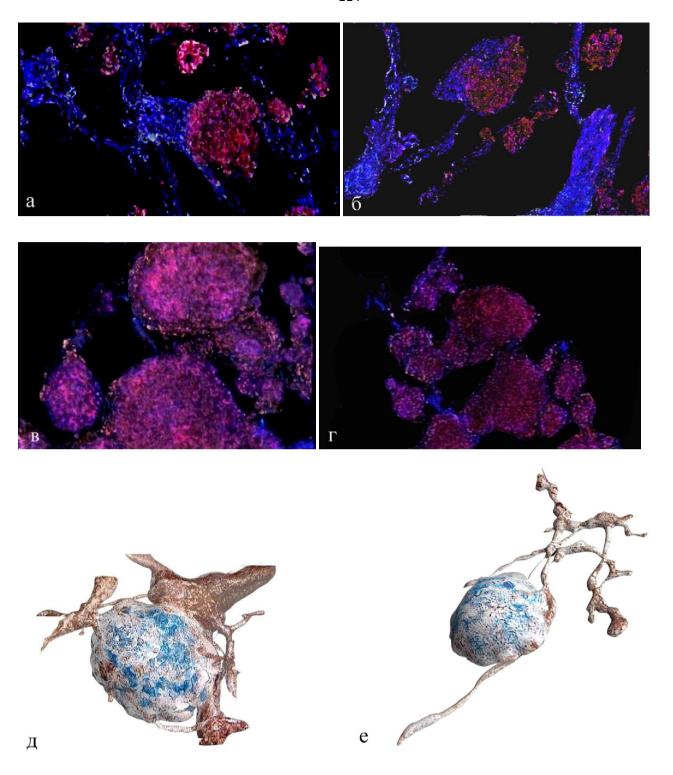


Рис. 18. Реконструкции нейро-инсулярных комплексов: а-г) двухмерные реконструкции (псевдоцвета: инсулин+глюкагон+ S100) плодов 14 нед.гр, объектив x20 (а), 20 нед. гр, объектив x20 (б), 27 нед. гр, объектив x20 (в), объектив x10 (г); д,е) трехмерные треконструкции НИК плода 20 нед. гр: д) сложный комплекс, е) комплекс II типа

3.2.3 Распределение NSE в эндокринной части поджелудочной железы

Гликолитический фермент нейронспецифическая енолаза (NSE) является маркером не только структур нервной сиситемы, но и эндокринных клеток поджелудочной железы человека.

Реакция на NSE появляется в префетальном периоде развития на 11-12 неделе гр. в некоторых клетках наиболее крупных протоков центральной части железы. При этом в части клеток обнаружена колокализация с инсулином и (или) глюкагоном (Рисунок 19 а). У плодов человека иммунопозитивная реакция на NSE наблюдается в отдельных клетках протоков, в одиночных эндокринных клетках и их небольших кластерах, а также в панкреатических островках разного типа (Рисунок 19 а-в) по мере появления этих форм в развитии. В ПЖ взрослых людей, не страдавших нарушениями углеводного обмена, иммунопозитивная реакция на NSE выявлена в островках различного типа и в отдельных клетках экзокринной части и протоков. При двойном иммуногистохимическом окрашивании в реакциях на инсулин + NSE и глюкагон+ NSE выявлена колокализация гормонов и фермента в клетках (Рисунок 19 г). В островках и кластерах большая часть эндокринных клеток имеет иммунопозитивную реакцию на NSE (Рисунок 20, а-в). Однако у взрослых людей на тех же образцах наряду с вышеописанной реакцией В некоторых крупных смешанных иммунореактивность NSE в клеткахк снижена или отсутствует (Рисунок 20 е,ж).

Чувствительность к антителам к NSE меняется в ходе онтогенеза человека: до 23-й недели развития интенсивность реакции на NSE в эндокринных клетках поджелудочной железы в целом слабее, чем в структурах нервной системы. У всех плодов начиная с 23-недельного возраста интенсивность реакции NSE в эндокринных клетках и структурах нервной системы примерно одинаковая (Рисунок 20 г). В исследованных образцах ПЖ взрослых людей нервные волокна тоже были иммунопозитивны, однако по сравнению с количеством окрашенного материала в эндокринных клетках островков, количество окрашенного материала

в нервных волокнах ПЖ было незначительным (Рисунок 20 д).

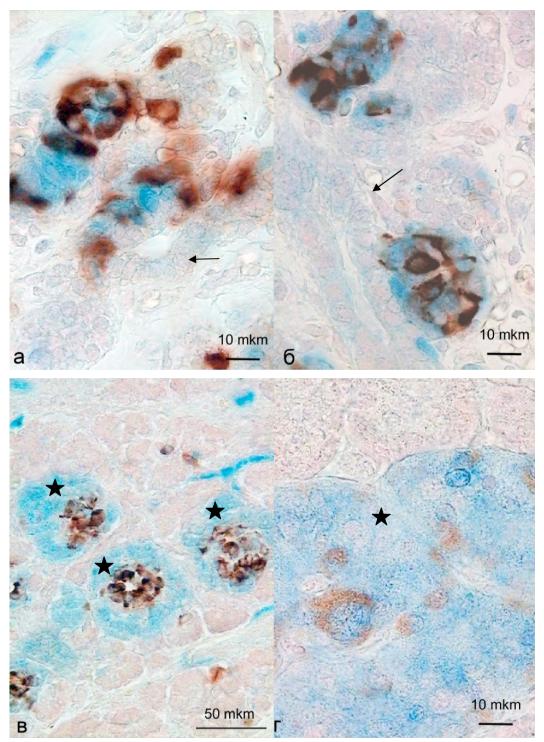


Рис. 19. Распределение NSE в эндокринной части ПЖ человека. Двойная иммуногистохимическая окраска: а) плод 12 нед. гр, NSE + инсулин; б) плод 16 нед. гр, NSE + инсулин; в) плод 27 нед. гр, NSE + инсулин; г) женщина, 75 лет, фрагмент смешанного островка, NSE + глюкагон. Стрелками отмечены протоки, звездочками - островки.

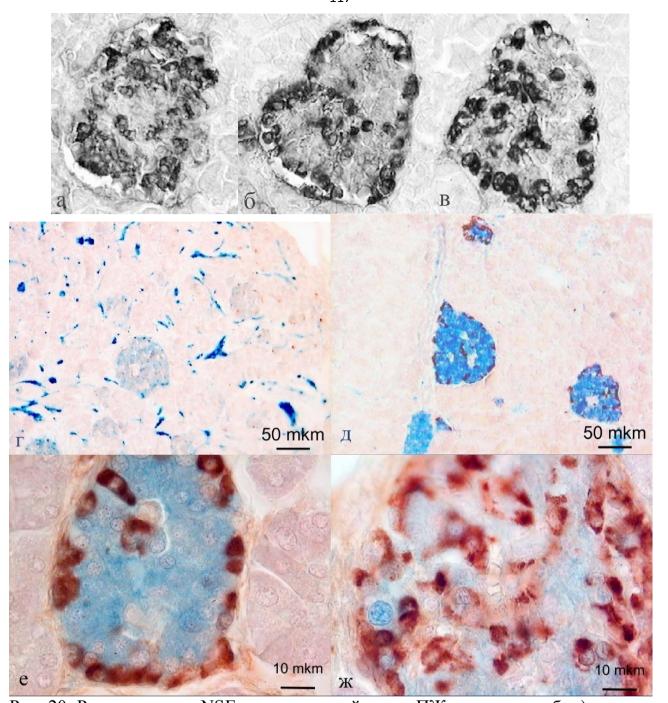


Рис. 20. Распределение NSE в эндокринной части ПЖ человека: а, б, в) женщина, 31 г., ИГХ реакция на инсулин (а), нейроспецифическую енолазу (б) и глюкагон (в) в островках Лангерганса поджелудочной железы взрослого человека, не страдавшего нарушениями углеводного обмена (серийные срезы). Объектив х40; г, д, е, ж) Двойная ИГХ на NSE и глюкагон: г) плод 28 нед.гр, более сильная реакция на NSE в структурах нервной системы по отношению к эндокринным клеткам; д) женщина, 72 г.; е,ж) - Разная сила реакции на антитела к NSE в эндокринных клетках разных островков на одном срезе ПЖ, мужчина, 77 лет.

3.2.4. S100-позитивные клетки в эндокринной части поджелудочной железы человека

Позитивная реакция на белок S100 была выявлена среди клеток протоков уже, на 10 неделе гр. Однако, колокализация в одной клетке белка S100 и основных гормонов ПЖ (инсулин, глюкагон и соматостатин) на этом сроке не обнаружена. Интересно, что NSE-позитивные клетки, в основном, выявлены в наиболее крупных протоках, в то время как S100-позитивные клетки на 12 нед. гр. в таких протоках не обнаружены, а были выявлены в более мелких. Начиная с 14периферии некоторых островков ПЖ й нед. гр на также начинают обнаруживаться S100+клетки (Рисунок 21 а,б). Тела этих S-100 позитивных клеток имеют уплощенную веретеновидную или треугольную форму. Эти клетки обладают длинными отростками, проходящими по периферии островков, не образуя полностью замкнутой капсулы. Достаточно часто наблюдается, что островки, в составе которых обнаружены эти клетки, образуют нейро-инсулярный комплекс с ганглиями автономной нервной системы (Рисунок 21, а).

Уже на 15–16-й нед. гр в ряде островков появляются S100+клетки не только на периферии, но и внутри островков. Такие клетки имеют преимущественно овальную форму, у них нет длинных отростков, их тела крупнее по размеру, чем у клеток, расположенных на периферии. При помощи двойного иммуногистохимического окрашивания на серийных срезах установлено, что во время внутриутробного развития S100+клетки располагаются преимущественно в зоне локализации глюкагона и соматостатина (Рисунок 21, б).

В дальнейшем внутриутробном развитии и у взрослых людей обнаружены оба вида S100+клеток в островках (Рисунок 21 в, г). Необходимо отметить, что выраженность реакции на антитела к белку S100 сильно варьируется в разных структурах нервной системы и эндокринной части ПЖ: сильнее всего она проявляется в элементах нервной системы (крупные нервы и ганглии); в клетках, расположенных на периферии островков, она более интенсивная, чем в клетках, расположенных внутри них.

Отдельный анализ содержания S100-позитивных клеток не был проведен, так как их количество сильно варьируется на разных образцах ПЖ и в разных островках. Однако, в отдельно взятых островках количество S100-позитивных клеток заметно меньше, чем инсулин- или глюкагон-содержащих клеток, и сопоставимо с количеством соматостатин-содержащих клеток. Их расположение в островках взрослых людей отличается ОТ расположения глюкагонсоматостатин-содержащих клеток: А- и D-клетки встречаются обычно периферии островков или (в крупных островках) по ходу кровеносных капилляров, а S100+клетки выявляются в области инсулин-содержащих клеток (Рисунок 21 д,е) При этом S100+клетки могли быть как инсулин-позитивными, так и инсулин-негативными. В S100+ клетках, расположенных внутри островков, всегда обнаруживали колокализацию S100 и NSE.

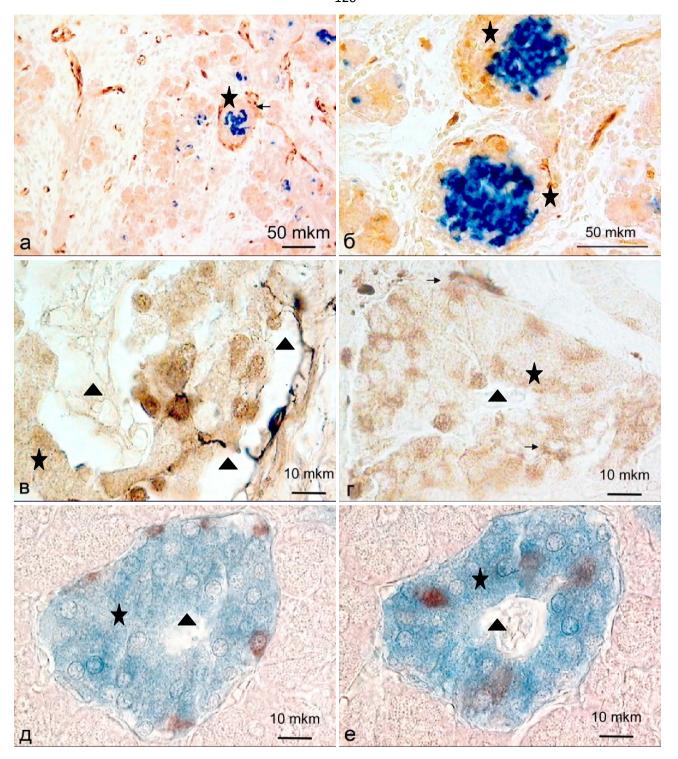


Рис. 21. Распределение S100+клеток в эндокринной части ПЖ человека. а,б) двойная ИГХ реакция на S100 и инсулин а) плод 16 нед. гр, , нейро-инсулярный комплекс; б) плод 15–16 нед. гр; в, г) ИГХ на S100: в) 40 нед. гр, фрагмент крупного островка, г) мужчина, 76л, островок; д,е) мужчина, 77лет, двойная реакция на последовательных срезах островка;: д — NSE + глюкагон, е — NSE + S100. Звездочками отмечены островки, треугольниками - капилляры.

- 3.3 Особенности организации эндокринной части поджелудочной железы взрослых людей с нарушениями углеводного обмена и плодов от матерей с сахарным диабетом
- 3.3.1 Морфо-функциональные особенности поджелудочной железы человека при нарушениях углеводного обмена

В клиническом исследовании остаточной секреции инсулина (определенной по уровню С-пептида) у пациентов с длительным течением СД1 в 30% случаев уровень синтеза инсулина В-клетками пациентов с диабетом первого типа был близок или соответствовал принятой клинической норме. При таком уровне синтеза эндогенного инсулина логически оправдано сопоставление уровня синтеза С-пептида и количества антител к инсулину (Рисунок 22а). Сравнение индивидуальных количественных характеристик этих параметров в логарифмических координатах позволило выявить четыре группы пациентов.

У 21% пациентов (Рисунок 22 а, зеленый) низкий уровень С-пептида был сопряжен с практическим отсутствием антител к инсулину. В 49% случаев высокий уровень антител к инсулину сохранялся у пациентов с низким уровнем С-пептида в периферической крови. Эта группа отмечена синим цветом на рисунке 22 а. Пациенты с близким к нормальному уровню С-пептида и высоким уровнем антител к инсулину были объединены в третью группу (на рисунке отмечена красным). Эта группа включала в себя 7% пациентов. В четвертой группе пациентов (черный цвет) был показан высокий уровень синтеза инсулина без выработки антител к инсулину. При анализе выделенных выше групп интерес представляет соотношения синтеза С-пептида и глюкагона, который был количественно исследован у тех же пациентов. Для визуализации этих отношений цвет групп, выделенных на рисунке 22 а сохранен на рисунке 22 б. В 50% случаев обнаружена пониженная концентрация глюкагона и С-пептида, а в 19% случаев у пациентов была найдена высокая концентрация С-пептида при низком уровне глюкагона (Рисунок 22 б). Оставшийся 31% от общего числа обследованных

пациентов распределились между двумя неравными группами. У 7% был выявлен как высокий уровень С-пептида, так и глюкагона. В 24% случаев С-пептид был обнаружен в следовых количествах, а концентрация глюкагона существенно повышена.

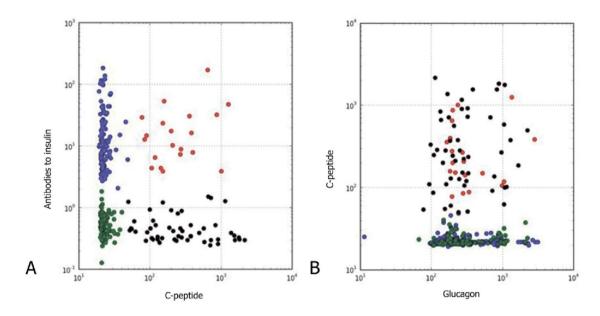


Рис. 22. Распределение индивидуальных параметров количественной оценки синтеза С-пептида, антител к инсулину и глюкагона в периферической крови у больных страдающих сахарным диабетом первого типа более 20 лет: а – Показатели уровня С-пептида и антител к инсулину. Цветом выделены четыре группы пациентов: зеленый – пациенты с низким уровнем С-пептида и антител к инсулину; синий – низкий уровень С-пептида и высокий – к антителам к инсулину; черный- низкий уровень антител к инсулину и высокий С-пептида; красный – высокий уровень С-пептида и антител к инсулину. б –показатели уровня С-пептида и глюкагона. Цвета конкретных показателей соответствуют группам на графике А.

Полученные данные показывают, что при длительном развитии СД 1 у ряда пациентов сохраняется собственный синтез инсулина. Эти данные подтверждаются и данными иммуногистохимического исследования.

Позитивная реакция на инсулин (Рисунок 23 б) полностью отсутствовала только в одном случае СД1. В еще одном случае выявлялись только единичные инсулинположительные клетки, рассеянные в ацинарной и протковой части ПЖ (Рисунок 23 в). В трех случаях положительная реакция на инсулин обнаружена также и в островках ПЖ (Рисунок 23 г), но суммарная площадь (%), занимаемая инсулин-позитивными клетками (0,42 (0,00-1,045)) была значимо снижена по сравнению с людьми зрелого возраста (1,3 (1,14-1,38)).

Несмотря на то, что большинство исследователей диабета обоих типов фокусируют свое внимание на числе и функции В–клеток, другие виды клеток островков тоже могут вносить свой вклад в развитие заболевания. Во всех исследованных образцах ткани ПЖ больных СД1 удалось выявить глюкагонпродуцирующие клетки, однако суммарная площадь, занимаемая этими клетками демонстрировала тенденцию к уменьшению (0,82 (0,65-1,15)) по сравнению с лицами зрелого возраста (1,2 (1-1,2)). Уменьшение содержания глюкагона в крови у людей, страдавших длительное время СД1, было также показано в клиническом исследовании для 69% пациентов.

У лиц, страдавших СД1, у которых сохранилась остаточная секреция инсулина, также как и в островках людей, не страдавших нарушениями углеводного обмена, были обнаружены клетки, содержащие одновременно инсулин и глюкагон. При двойном иммуногистохимическом окрашивании на инсулин и глюкагон в норме была обнаружена колокализация инсулина и глюкагона в цитоплазме части клеток, расположенных вблизи капилляров (Рисунок 24 в). У больных СД1 эти клетки также соседствуют с глюкагонсодержащими клетками и капиллярами (Рисунок 24 а,б,г).

Кроме этого при сравнении ПЖ людей, страдавших СД 1, и людей, не страдавших от нарушений углеводного обмена, было выявлено значимое различие (критерий Фишера, $\phi \le 0.05$) по наличию воспалительной реакции в образцах ПЖ у пациентов с СД1 (Рисунок 23 а, д, е). Инфильтрация клетками лейкоцитарного ряда была наиболее выражена в междольковой соединительной ткани и в экзокринной части ПЖ. При этом не наблюдалось классической картины периинсулита и инсулита. В очагах воспаления при помощи иммуногистохимических методов были идентифицированы CD16 и CD25 положительные клетки (Рисунок 25 а-г). Реакция на антитела к CD8 была незначительной. Кроме этого в аутопсиях ПЖ лиц с СД1, в которых наблюдалась воспалительная реакция, выявлены клетки с положительной реакцией на антитела рецептору трансферрина (CD71). В некоторых островках эти клетки обнаруживались и внутри капилляров (Рисунок 25 д, е). Количество клеток положительных на антитела к CD20 во всех исследованных образцах было незначительным. Эти клетки встречались только В достаточно кровеносных сосудах. В контроле реакция на все эти антитела наблюдалась лишь в небольшом числе клеток внутри крупных сосудов.

При изучении иннервации поджелудочной железы людей с СД1 реакция на нейромаркеры становилась менее четкой, число прокрашиваемых волокон сокращалось, а в случае тяжелого диабета сохранялась только в наиболее крупных нервных волокнах (Рисунок 26 а,б). Кроме этого, при отсутствии иммунногистохимического окрашивания инсулин-содержащих клеток, в ПЖ больных СД1 отсутствовала и реакция и на NSE в эндокринных клетках (Рисунок 26 в,г), а в остальных была снижена.

Что касается осбенностей строения ПЖ лиц, страдавших СД2, то при сравнении СД 2 с возрастным контролем (лица старческого и пожилого возраста) не было выявлено снижения количества окрашенных инсулин–содержащих клеток, а по сравнению с лицами в возрасте до 60 лет наоборот было выявлено

значимое увеличение площади, занимаемой инсулин-позитивными клетками (2,14% (1,5-2,84)). При сравнении группы лиц пожилого и старческого возраста с соответствующей группой СД 2 не было также выявлено значимых изменений по иммунореактивности глюкагона.

Однако при исследовании ПЖ лиц старше 60 лет, страдавших СД2, было выявлено значимое увеличение очагов липоматоза (точный метод Фишера, $\phi \le 0.05$) и отложения амилоида в островках ($\phi \le 0.01$) (Рисунок 27, 28) по сравнению лицами пожилого и старческого возраста, которые не страдали нарушениями углеводного обмена. Кроме этого была отмечена тенденция к увеличению выраженности склеротических изменений в ПЖ при СД2 (при сравнении с группой людей в возрасте до 60 лет, критерий Фишера, $\phi \le 0.01$). Однако, при сравнении с возрастной нормой (люди старше 60 лет) эти различия оказались незначимыми. Также бы не смогли выявить явных изменений в иннервации ПЖ при СД2.

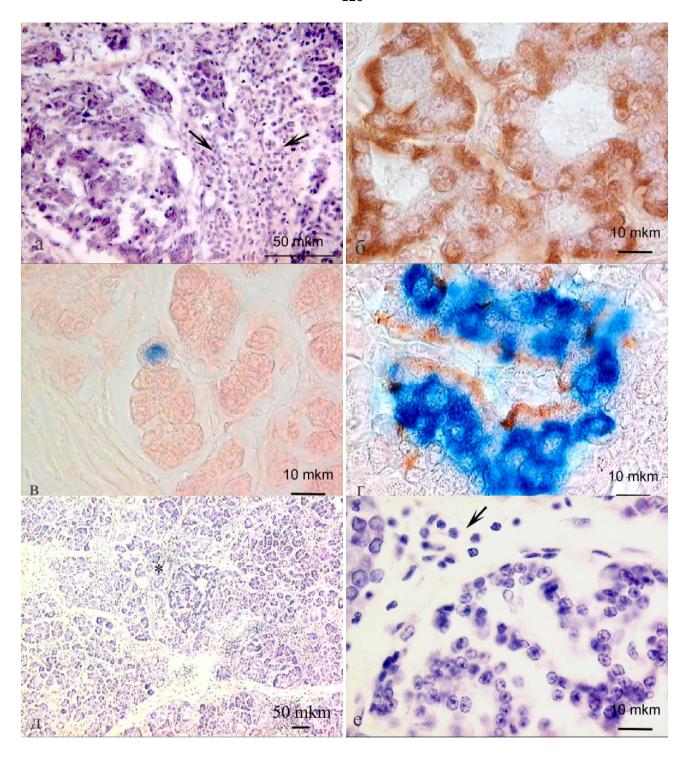


Рис. 23. Микрофотографии срезов ПЖ взрослых людей с СД1:

а, д, е) воспалительная реакция, гематоксилин-эозин, стрелками отмечена инфильтрация клетками лейкоцитарного ряда, * отмечен фрагмент, представленный на микрофотографии е; б-г) гормон-содержащие клетки ПЖ, двойная ИГХ реакция на инсулин и глюкагон: б - островок, не содержащий В-клетки, в - одиночная В-клетка, г - островок, содержащий как А- так и В-клетки.

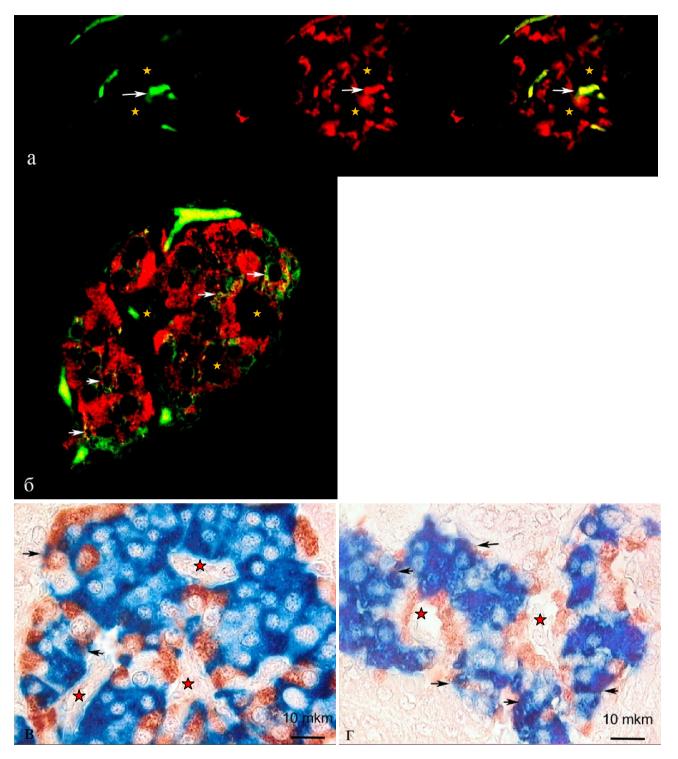


Рис. 24. Определение колокализации (отмечена стрелками) инсулина и глюкагона: а,б,г, - островки Лангерганса людей, страдавших длительное время СД1: а — Иммунофлуоресценция (инсулин + глюкагон), объектив х40; б - конфокальная микроскопия (инсулин + глюкагон), объектив х40.; в,г - Двойная окраска (инсулин + глюкагон), в - островок Лангерганса человека, не страдавшего диабетом. Звездочками отмечены капилляры.

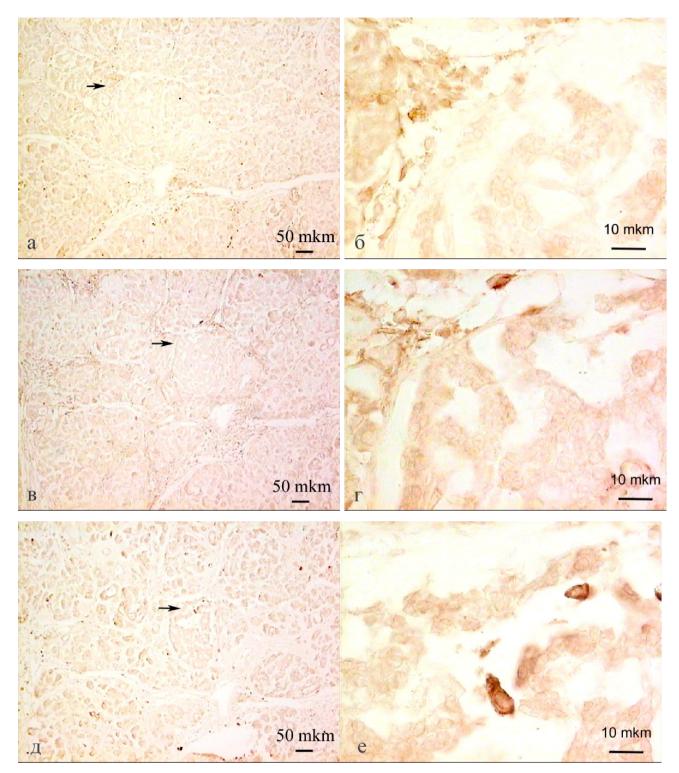


Рис. 25. Микрофотографии серийных срезов ПЖ пациента с СД1: а, б) ИГХ реакция на CD 16; в, г) ИГХ реакция на CD 25; д, е) – ИГХ реакция на CD 71. а, в, д) стрелками отмечен крупный островок; б, г, е) Фрагменты того же островка.

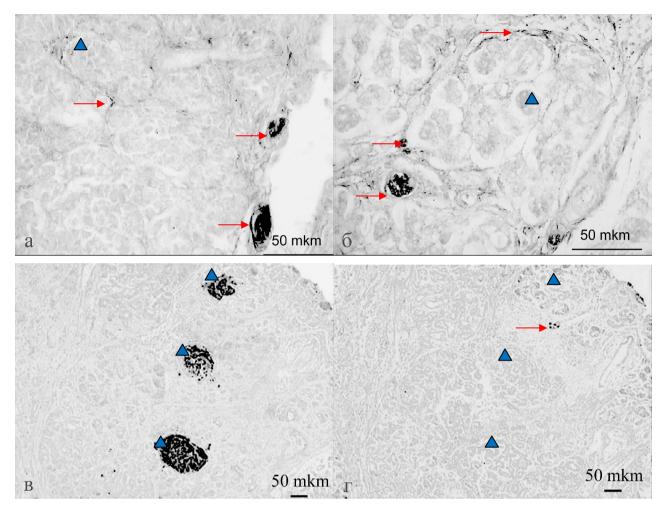


Рис. 26. Распределение нейральных маркеров: NGF-r (а) и PMP-22 (б) на срезах ПЖ при СД1, мужчина 41 г., х40 в,г) ИГХ реакция на глюкагон (а) и нейроспецифическую енолазу (б) в островках Лангерганса поджелудочной железы (м, 41г) при тяжелом СД1 (серийные срезы). Синими треугольниками отмечены островки Лангерганса, красными стрелками - нервы. В эндокринных клетках островков реакция на NSE прт тяжелом СД1 отсутствует.

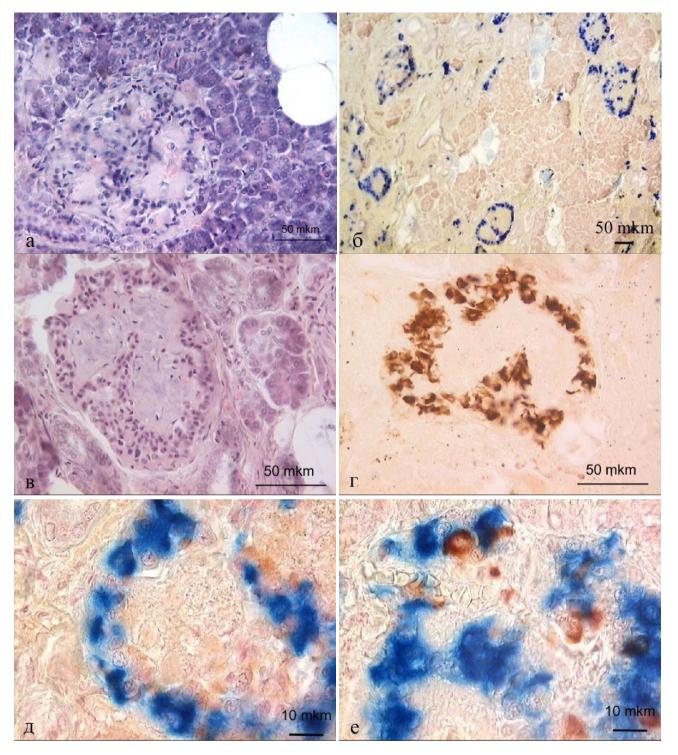


Рис. 27. Микрофотографии срезов ПЖ взрослых людей с СД2: а) жировые клетки в экзокринной части и отложения амилоида в эндокринной части ПЖ, гематоксилин-эозин; б) фиброз и отложения амилоида в островках Лангерганса, двойная ИГХ на инсулин и глюкагон; в,г) серийные срезы островка Лангерганса с отложением амилоида: в) гематоксилин-эозин; г) ИГХ на инсулин; д, е) островки Лангерганса с отложением амилоида, двойная ИГХ: д) инсулин и глюкагон; е) инсулин и соматостатин.

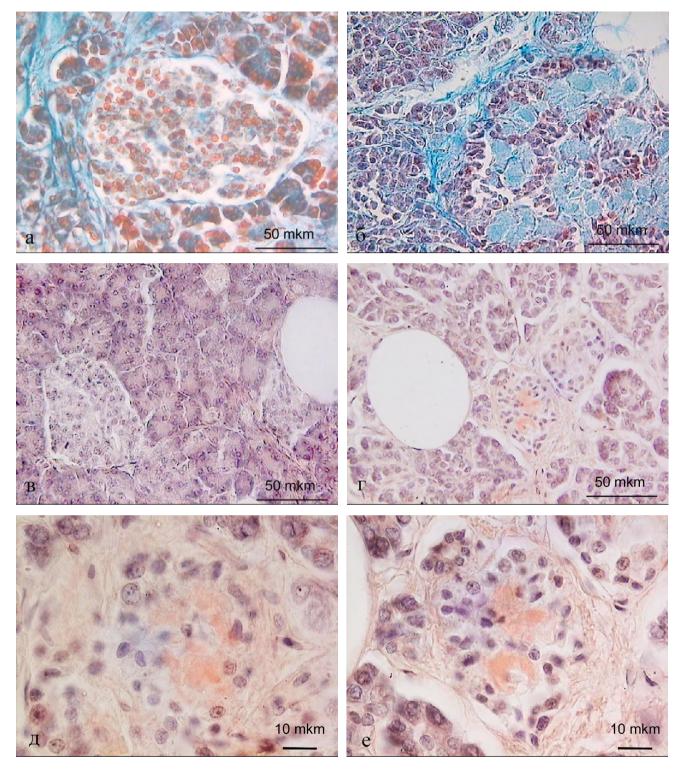


Рис. 28. Микрофотографии, иллюстрирующие типичные для СД2 изменения в островках ПЖ человека. а,б - окраска по Маллори: а - крупный островок человека, не страдавшего СД2 (женщина, 50 лет), б - -крупный островок при СД2, видны отложения амилоида (женщина, 60 лет); в,г,д,е - окраска конго красный: в - срез ПЖ человека, не страдавшего СД2 (женщина, 74 года), г,д,е - отложения амилоида (оранжевый) в островках ПЖ при СД2 (женщина, 69 лет)

3.3.2 Формы структурной организации эндокринной части поджелудочной железы при нарушениях углеводного обмена

Ha образцов ПЖ людей, страдавших СД2. срезах исследованных обнаружены выделенные типы распределения эндокринных все клеток (одиночные клетки, кластеры, островки плащевого типа, смешанные островки) за исключением биполярных островков (характерных для плодного периода развития) (Рисунок 29 а). При СД1 в 2 случаях наблюдалась преимущественно негативная реакция на инсулин (подробнее см. выше). При этом на срезах при помощи реакций на глюкагон выявлялись преимущественно крупные островки (Рисунок 29 б). В остальных 3 случаях также описаны все типы распределения эндокринных клеток, характерные для взрослых людей.

При изучении особенностей строения непосредственно островков Лангерганса выявлено, что если при СД1 и СД2 форма островков может быть очень разнообразной: округлой, вытянутой (лентовидной) или неправильной, то в контроле значимо (точный метод Фишера, $\phi \leq 0.01$) преобладают островки правильной округлой формы.

Количество островков на единицу площади при СД1 (Рисунок 29в), обнаруживает тенденцию к уменьшению по сравнению с лицами, не страдавшими нарушениями углеводного обмена (таблица 14, Приложение таблица 14) и значимо снижено по сравнению с лицами, страдавшими СД 2 (Рисунок 29 г). При этом количество островков диаметром больше 100мкм относительно общего числа островков при СД1 возрастало (р=0.04) (Таблица 14). Соответственно возрастала и занимаемая этими островками относительная площадь (р=0.02) (Таблица 14, Рисунок 29 д,е). Количество островков в группе контроля старше 50 лет и при СД2 между собой значимо не различается (Приложение, таблица 14).

Относительное количество(%) и суммарная площадь (%) островков разного диаметра у лиц, не страдавших нарушениями углеводного обмена, и с сахарным

Таблица 14

диабетом 1 типа (в кадре 6х8 мм), Ме (q1-q3)

Группы наблюдений	Люди, не страдавшие	Люди, страдавшие	
Показатели	нарушениями	СД1	
	углеводного обмена		
% островков диаметром больше	8,60	15,80	P=0.04
100 мкм	(7,30-12,20)	(12,20-16,30)	
% островков диаметром меньше	91,40	84,20	
100 мкм	(87,80-92,70)	(83,70-87,80)	
% Суммарная площадь,	32,80	54,55000	P=0.02
занимаемая на срезе островкам	(31,200-40,70)	(50,00-59,30)	
диаметром свыше 100 мкм			
% Суммарная площадь,	67,20	45,45000	
занимаемая на срезе островкам	(59,30-68,80)	(40,70-50,00)	
диаметром меньше 100 мкм			

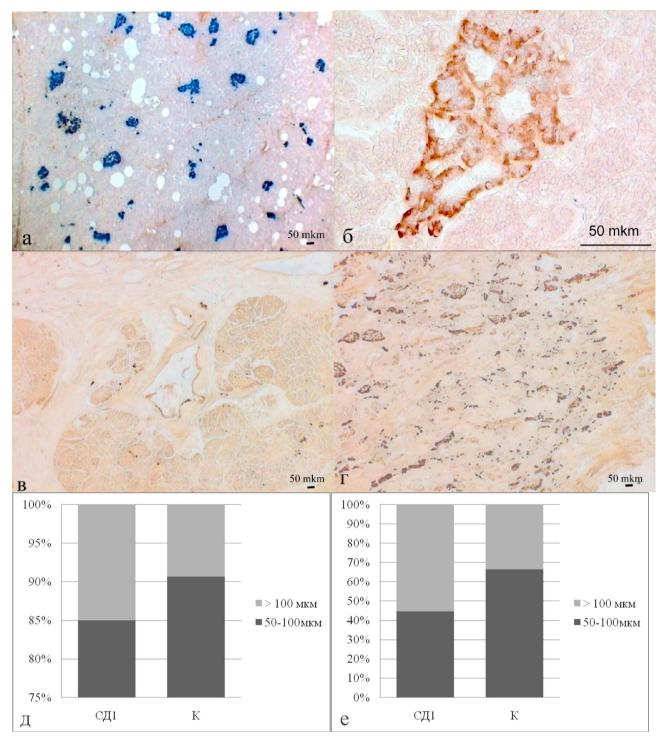


Рис. 29. а) Разные типы островков в ПЖ (мужчина, 60 лет), инсулин и глюкагон; б) Крупный островок Лангерганса при СД 1 типа (м, 41 год), реакция на инсулин отсутствует, двойная окраска на инсулин и глюкагон; в, г) ИГХ на инсулин в ПЖ больных СД 1 (в) и 2 (г) типа: д, е) Процентное соотношение д) числа островков диаметром больше 100 мкм и островков диаметром 40-100 мкм при СД1 и в контроле, е) площади занимаемой островками разного диаметра в срезе.

Также выявлено увеличение относительного числа островков с диметром свыше 200 мкм в группе с СД1 по сравнению с людьми в возрасте до 50 лет, которые не страдали заболеваниями поджелудочной железы. Как и у лиц с СД1, у лиц, страдавших СД2 тоже возрастало относительное количество крупных островков (Таблица 15). Крупные островки могут состовлять до 20% всех островков при заболевании СД обоих типов.

Таблица 15. Относительное количество (%) крупных островков (>200mkm) в ПЖ человека Ме (q1-q3)

Группы	Люди, не	Люди, не	Люди,	Люди,
наблюдений	страдавшие	страдавшие	страдавшие	страдавшие
	нарушениями	нарушениями	СД1, в	Сд2, в возрасте
	углеводного	углеводного обмена,	возрасте до 50	после 50 лет
	обмена, в	в возрасте старше 50	лет	
Показатели	возрасте до 50	лет		
	лет			
Процент	2,50	6,00	14,00	10,59
островков	(0,5-10,5)	(4,00-13,00)	(8,50-20,50)	(5,00-14,50)
диаметром свыше				
200 мкм				

При изучении аутопсий ПЖ плодов от матерей страдавших СД разного генеза тоже были выявлены различные типы распределения эндокринных клеток. У плодов на сроке 16 - 20 нед. выявлены одиночные гормонсодержащие клетки, небольшие кластеры таких клеток, островки плащевого типа и биполярные островки. На этих сроках развития различий в строении островков между плодами от матерей с СД1 и от не страдавших нарушениями углеводного обмена не выявлено (Рисунок 30 а-г).

На более поздних сроках развития (с 25-27 недели) появляются также смешанные островки, в которых А- и D-клетки располагаются не только на периферии, но и по ходу капилляров в центральной части островка. В случаях диабетической фетопатии была выявлена гипертрофия таких островков (Рисунок 30 д,е). Однако увеличение размеров островков на срезах ПЖ происходит не только за счет увеличения площади, занимаемой эндокринными клетками, но и за счет увеличения относительной площади, занимаемой синусами капилляров. У плодов и новорожденных от матерей с диабетом она - 16,5% (9,00-22,00), в то время как у остальных, изученных на этом сроке - 4% (3,00 - 6,50). Т.е. просвет капилляров в гипертрофированных островках плодов и новорожденных от матерей с нарушениями углеводного обмена значительно расширен (р=0,0001), а периваскулярное пространство расширено (Рисунок 31 а-г).

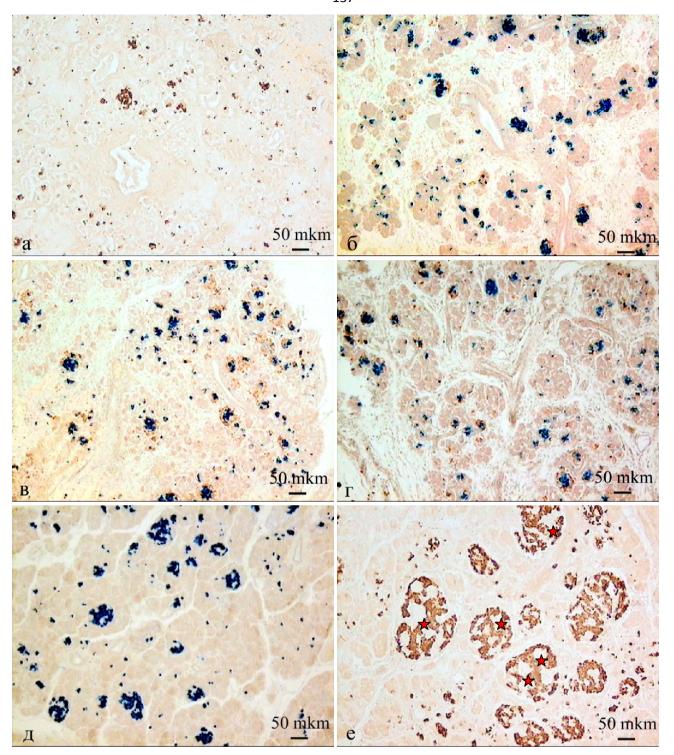


Рис.30. Обзорные микрофотографии срезов ПЖ плодов от матерей, не страдавших нарушениями углеводного обмена (а,в, д) и матерей с СД (б,г,е): а) 17 нед. гр, ИГХ на инсулин; б) 16 нед. гр, ИГХ инсулин + глюкагон; в) 20 нед.гр, ИГХ инсулин + соматостатин; г) 20 нед.гр, ИГХ инсулин + соматостатин; д) ребенок 3 мес, ИГХ на инсулин; е) новорожденный, ИГХ на инсулин. Звездочками отмечены некоторые из капилляров островков. Наблюдается гипертрофия островков и расширение капилляров.

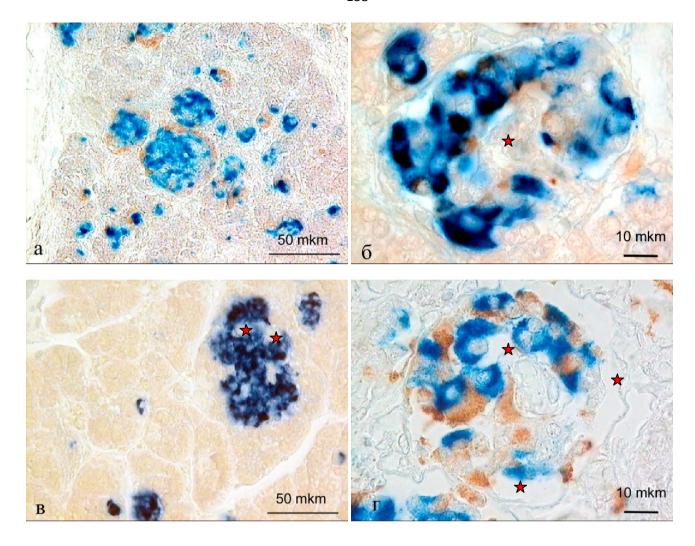


Рис. 31. Микрофотографии срезов ПЖ плодов матерей, не страдавших нарушениями углеводного обмена (а,в) и матерей с СД (б,г): а) плод, 32 нед. гр, двойная ИГХ инсулин + глюкагон; б) плод, 34-35 нед. гр, двойная ИГХ инсулин + глюкагон; в) ребенок, 3 мес, ИГХ на инсулин; г) новорожденный, двойная ИГХ инсулин + соматостатин. Звездочками отмечены некоторые из капилляров островков.

4 ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Морфогенетическая пластичность структурной организации эндокринной части поджелудочной железы

Современные представления о формировании эндокринной части ПЖ человека в своем большинстве ограничены первичными этапами дифференцировки эндокринных клеток и формированием островков плащевого типа, сходными по своему строению с островками грызунов (т.е. периодом с 9 по 12 нед. гр). Хотя образование островков плащевого типа у грызунов достаточно хорошо описано, формирование смешанных островков в развитии ПЖ людей изучено недостаточно (Кривова Ю.С., 2010; Scharfmann R. et al., 2008; Jeon J. et al., 2009).

В пренатальном онтогенезе человека (Фалин Л.И., 1966; Ferner H., 1952; Robb P., 1961; van Assche F.A. and Aerts L., 1979; von Dorsche H.H. et al.,1988; J. Bocian-Sobkowska et al. 1999; Jeon J. et al., 2009) были выделены разные формы цитоархитектурной организации эндокринной части ПЖ. На этом основании были сделаны неоднократные попытки представить схему морфогенеза островков в пренатальном развитии человека (см. лит. обзор). Однако до сих пор нет единого мнения ни о количестве выделяемых форм организации, ни о времени возникновения их в онтогенезе.

Сроки появления разных форм распределения эндокринных клеток, полученные в данной работе, в основном, совпадают с описанными в литературе (Фалин Л.И., 1966; Милованов А.П. и Савельев С.В., 2006; Кривова Ю.С., 2010; Polak M. et al., 2000; Piper K. et al., 2004; Jeon J. et al., 2009; Pan F.C., Brissova M., 2014; Nair G.and Hebrok M., 2015). Однако данные, полученные в настоящем исследовании, позволяют несколько уточнить основные этапы морфогенеза эндокринной части ПЖ в пренатальном развитии человека:

В префетальном периоде на образцах ПЖ человека были выявлены только одиночные эндокринные клетки и их небольшие скопления. Уже начиная с 10 нед. гр, были выявлены инсулин-, глюкагон- и соматостатин-содержащие клетки. С 12-й недели гестационного развития в ПЖ присутствуют морфологически оформленные панкреатические островки плащевого типа, содержащие А-, В- и D-клетки. Диаметр плащевых островков в среднем меньше 70 мкм. Эти данные о размере плащевых островков не совпадают с найденными в литературе (Kilimnik G. et al., 2011, 2012), т. к. авторы относят такие островки уже к смешанным.

В литературе описано также наличие в ПЖ плодов биполярных островков (Фалин Л.И., 1966; Кривова Ю.С., 2010) и гомогенных кластеров, состоящих только из В- или только из А-клеток, расположенных рядом друг с другом (Jeon J. et al., 2009). В нашем исследовании также были обнаружены крупные гомогенные кластеры В- и А-клеток, тесно контактирующие друг с другом, однако анализ серийных срезов показал, что эти кластеры представляют собой биполярные островки. Таким образом, островки, состоящие только из одного вида клеток, по всей видимости, являются артефактами двухмерного изображения. Средний диаметр биполярных островков превышает 80 мкм, причем наиболее крупные выявляются в раннефетальном периоде, затем их диаметр постепенно снижается. У взрослых людей биполярные островки не выявляются. В настоящее время роль биполярных островков в формировании эндокринной части ПЖ не ясна (Кривова Ю.С., 2010). В работе Jeon J. et al. (2009) предполагается, что каждый биполярный островок в своем развитии разделяется в на два островка, один из которых состоит преимущественно из А-клеток, а другой - из В-клеток. В нашей диссертационной работе показано, что островки, состоящие из одного вида клеток, как уже было сказано выше, являются просто разными полюсами биполярных островков. В тоже время образование "мозаичных" (смешанных) островков, по всей видимости, связано с миграционными процессами различных видов клеток внутри островков, что требует проведения отдельных исследований.

Типичные для взрослых смешанные островки появляются в среднефетальном периоде (после 25-й недели), их количество к рождению

нарастает. В смешанных панкреатических островках взрослого человека А- и D-клетки расположены не только на периферии, но и внутри островков (Brissova M. et al., 2005; Cabrera O. et al., 2006; Bosco D. et al, 2010). Диаметр этих островков, как правило, превышает 100 мкм.

Таким образом, при поджелудочной развитии железы человека последовательно появляются различные морфологические формы организации эндокринной части. Первые эндокринные клетки появляются в центральных протоках развивающейся поджелудочной железы человека. В дальнейшем наиболее крупные панкреатические островки располагаются в центральной области (вдоль главного протока) ПЖ, одиночные эндокринные клетки и небольшие кластеры локализованы преимущественно на периферии. соответствует литературным данным (Polak M. et al., 2000; Jeon J. et al., 2009). Следовательно, в развитии эндокринной части ПЖ человека наблюдается гетерохронность созревания, которая может быть физиологическим резервом для адаптации к повышению метаболической нагрузки.

Важно отметить, что все обнаруженные формы структурной организации эндокринной части описаны в филогенезе ПЖ. Хронология появления этих форм в онтогенезе повторят филогенетические этапы становления классического панкреатического островка (Елецкий Ю.К., Яглов В.В., 1978). Этот факт позволят сделать вывод о том, что при развитии эндокринной части ПЖ человека наблюдается рекапитуляция филогенеза, т.е. развитие эндокринной части ПЖ происходит по способу анаболии (Кривова Ю.С., 2010). Однако эти формы не сменяют друг друга, а существуют одновременно, появляясь по мере развития ПЖ.

При нормальном физиологическом развитии меняется соотношение различных форм организации эндокринной части ПЖ: количество небольших островков и кластеров эндокринных клеток с диаметром от 40 до 55 мкм постепенно снижается, при этом нарастает количество средних (диаметром от 55 до 100 мкм) и крупных (диаметром свыше 100 мкм) островков. Полученные данные о динамике нарастания общей массы эндокринных клеток в пренатальном

онтогенезе согласуются с опубликованными ранее (Фалин Л.И., 1966; Кривова Ю.С., 2010; Ульяновская С.А., 2015; Gregg B.E. et al., 2012). Расхождения связаны с тем, что в настоящем исследовании, в зону определения при малом увеличении микроскопа попадали периферические зоны развивающейся поджелудочной железы, а также крупные протоки и сосуды, что, по нашему мнению, лучше отражает общее состояние ПЖ. Доля, занимаемая эндокринной частью ПЖ, в пренатальном развитии постепенно нарастает, но в позднефетальном периоде выше, чем у взрослых людей, что, по всей видимости, связано с некоторым отставанием развития экзокринной части в плодном периоде.

Таким образом, одним из проявлений пластичности эндокринной части ПЖ в пре- и неонатальном развитии человека является изменение как абсолютного, так и относительного количества разных форм структурной организации, сопровождающиеся гетерохронностью созревания в разных частях железы. При этом развитие эндокринной части ПЖ происходит по способу анаболии, т.е. такая пластичность во многом определена гисто- и органогенезом.

Работы последнего десятилетия (Bosco D.et al., 2010, Brissova M. et al., 2005, Cabrera O. et al., 2006) показали, что у взрослых людей преобладающим типом строения островков является мозаичный. В нашей работе обнаружено, что у взрослых людей, не страдавших нарушениями углеводного обмена, основной вклад в продукцию инсулина (и по числу островков и по площади, занимаемой на срезе) вносят островки диаметром от 40 до 100 мкм (т.е преимущественно островки плащевого типа), в них содержится до 65% всех инсулин-содержащих клеток островков. Размер этих островков меньше клинически значимых (т.е. 100мкм по Kilimnik G. et al., 2011, 2012), а содержание в них В-клеток суммарно превышает число этих клеток в смешанных островках. Доля островков диаметром свыше 100 мкм (т.е. смешанных островков, так как биполярные островки у взрослых людей не выявлены) составляет только около 10–15% от всех островков диаметром больше 40 мкм, хотя в них сосредоточено до 35–40% всех В-клеток эндокринной части поджелудочной железы. Сходные данные были получены Kilimnik G. et al. (2011). По подсчетам этой группы авторов, общий вклад числа

островков диаметром от 50 до 250 мкм составлял до 80% общей площади островков.

О возрастных изменениях в количестве островков у взрослых людей известно очень мало (Reers Chr. et al., 2009). По данным, полученным в нашем исследовании, количество островков в поле зрения в ПЖ человека после 60 лет увеличивается. Если у людей в возрасте до 60 лет, не страдающих нарушениями углеводного обмена, площадь, заполненная клетками иммунореактивными к инсулину составляет 1 %, что соответствует литературным данным (Assmann A., Hinault Ch., Kulkarni R. N., 2009, Reers Chr. et al., 2009), то в более старшем возрасте этот показатель увеличивается и может достигать 4%. В целом ряде работ также показано, что с возрастом наблюдается лишь минимальное понижение секреции инсулина, или она остается на прежнем уровне (Scheen A. J., 2005).

По нашим данным, у лиц пожилого и старческого возраста увеличивается и относительное количество крупных островков. В отдельных случаях число островков диаметром больше 200 мкм могло достигать до 17% от общего количества островков. В доступной литературе было найдено одно единственное упоминание об этом феномене в работе 1962 года (Кронрод Б.А.). В этом исследовании было показано, что у пожилых людей по мере старения организма происходит значительный рост количества островков и увеличение их диаметра. Частично это можно объяснить тем, после 60 лет объем, занимаемый экзокринной частью ПЖ, в отличие от объема эндокринной части, начинает уменьшаться (Saisho Y. et al., 2007). Однако эти данные не дают ответа на вопрос о причинах гипертрофии островков при старении.

Все формы структурной организации эндокринной части (одиночные клетки, их скопления, островки плащевого типа и смешанные островки), описанные в разделе о распределении эндокринных клеток у взрослых людей, не страдавших нарушениями углеводного обмена, встречались в исследованных нами образцах у людей, страдавших СД1 и СД2. При изучении особенностей строения панкреатических островков было выявлено, что если при СД1 и СД2

форма островков может быть очень разнообразной: округлой, вытянутой (лентовидной) или неправильной, то у лиц, не страдавших нарушениями углеводного обмена, значимо преобладают островки правильной округлой формы. Изменения в строении островков являются характерными для людей, страдающих диабетом и для животных с различными моделями СД (Gepts W. and Lecompte P.M., 1981; Gomez Dumm C.L., Semino M.C., Gagliardino J.J., 1990; Kilimnik G. et al., 2011; Tokuyama Y. et al., 1995). Причины такого измененения формы островков при нарушениях углеводного обмена остаются неизвестными.

Как известно развитие сахарного диабета 1 типа связывают с деструкцией бета-клеток поджелудочной железы, что обычно приводит к абсолютной инсулиновой недостаточности (Балаболкин М. И., Клебанова Е. М., Креминская В. М., 2005; Carlotti F. et al., 2011). Отсутствие иммуногистохимической реакции на инсулин в островках поджелудочной железы при развитии тяжелого СД1 является характерным. Однако, в нашем исследовании у 4 из 5 пациентов, длительное время страдавших от СД1, в островках обнаружены клетки иммунопозитивные к инсулину. Таким образом, остаточная секреция инсулина при СД1 может сохранятся долгие годы. В последнее время выдвинута гипотеза о том, что начало СД 1 в детском и юношеском возрасте характеризуется более агрессивным течением, по сравнению с СД1, начавшемся в более позднем возрасте, когда в течение ряда лет присутствует секреция инсулина бета-клетками ПЖ (Sherry N. A. et al., 2005).

Количество островков при СД1 значимо уменьшается по сравнению как с лицами, не страдавшими нарушениями углеводного обмена, так и с - с СД 2. Эти данные об уменьшении общего числа островков при СД1 представляют определенный интерес, так как по данным большинства литературных источников, при СД 1 уменьшается в первую очередь количество В-клеток, при сохраненном числе — А-клеток, синтезирующих глюкагон. Сделовательно общее число островков должно сохраняться. Однако в нашем исследовании показано, что при СД1 уменьшается как площадь, занимаемая А-клетками в ПЖ, так и содержание глюкагона в периферической крови у 69 % пациентов, страдавших

длительное время СД1. Сходные с нашими данные были получены и другими исследователями (Waguri M. et al., 1997). В половине случаев СД1 из 47 изученных они не смогли обнаружить инсулин-содержащие клетки, а в пяти случаях — глюкагон-содержащие. Эти данные можно интерпретировать следующим образом: при СД1 по неизвестной причине, предположительно из-за аутоиммунной атаки, не образуются новые островки и постепенно с течением болезни их становится все меньше. Таким образом, основным становится вопрос о том, не почему при СД1 гибнут В-клетки, а почему популяция эндокринных клеток не восстанавливается, и не происходит возобновления островков. Решение этого вопроса откроет новые перспективы в лечении данного заболевания.

При изучении числа островков при СД2, напротив, была выявлена тенденция к увеличению числа островков на единицу площади. При сравнении СД 2 с людьми пожилого и старческого возраста не было выявлено снижения количества прореагировавших инсулин-содержащих клеток, а по сравнению с лицами в возрасте до 60 лет наоборот было выявлено увеличение площади, занимаемой ими примерно в 1.5 – 2 раза. Так как большинство людей, страдавших СД2 были в возрасте свыше 60 лет, это согласуется с литературными данными о том, что по мере старения организма может происходить прежде всего гипоплазия (вплоть до полной аплазии) экзокринной части ПЖ. Однако в ряде работ по изучению развития СД2, встречаются предположения возможном компенсаторном увеличении количества бета-клеток в ответ на повышенный уровень глюкозы, однако механизм этой адаптации до сих пор остается неизученным, хотя и представляющем огромный интерес (Assmann A., Hinault Ch., Kulkarni R. N., 2009; Back S.H. et al., 2012). Увеличение числа островков при СД2 зачастую не связано с атрофией экзокринной части ПЖ, а может являться адаптацией к нарушению углеводного обмена. Патофизиология углеводного обмена у пожилых имеет некоторые особенности. Ранее считалось, что после 50-60 лет происходит снижение толерантности к углеводам, и с возрастом показатели гликемии увеличиваются. Это объяснялось, в первую очередь, инсулинорезистентностью. Установлено, что у здоровых людей с возрастом

происходит снижение чувствительности тканей к инсулину, что, по всей видимости, связано с так называемым "саркопеническим ожирением" (Саприна Т.В., Файзулина Н.М., 2016).

С другой стороны, сейчас активно исследуется предположение о том, что в первичным дефектом СД2, связи уровне бета-клеток при на характеризующимся нарушением превращения проинсулина в инсулин, амилин (участник этого процесса в норме) откладывается в бета-клетках и снижает в дальнейшем секрецию инсулина (Scheen A. J., 2005). В этих исследованиях приводятся данные об уменьшении размеров островков Лангерганса и массы бета-клеток на 40-60 % от нормы. Показано, что хроническая гипергликемия сама по себе может вызывать структурные нарушения островков и снижение одновременно гипергликемия уменьшает способность секреции инсулина, инсулина стимулировать захват глюкозы периферическими тканями. Также есть больных СД2 общая данные. площадь, занимаемая В-клетками, существенно уменьшается (Clark A. et al., 1998; Butler A.E. et al., 2003; Yoon K.H. et al., 2003; Del Prato S. and Marchetti P., 2004; Deng S. et al., 2004; Kilimnik G. et al., 2011). Однако далеко не все ученые-диабетологи разделяют мнение, что снижение функциональной активности бета-клеток в отношении секреции инсулина является основной отличительной чертой СД2. Количество инсулина при этом заболевании, по данным биохимических исследований, не изменяется, а в некоторых случаях даже возрастает. Именно поэтому развитие СД2 связывают с феноменом резистентности к инсулину (Аметов А.С., Грановская-Цветкова А.М., Казей Н.С., 1995). Противоречат гипотезе о нехватке инсулина при СД2 и некоторые данные, полученные на экспериментальных животных. Например, у самцов Zucker diabetic fatty (ZDF) крыс – модель СД2, на которой обычно изучают изменения предшествующие обретению диабетического статуса, развитие диабета Островки строении островков. сопровождается изменениями В заметно увеличиваются в размерах и приобретают неправильную форму со множеством выростов в окружающую ацинарную часть ПЖ. При этом возникают многочисленные нарушения в секреции инсулина. Островки диабетических

животных показывают дальнейшее ухудшение способности адекватно реагировать на стимуляцию глюкозой (Tokuyama Y. et al., 1995).

Как и при старении, количество островков с диаметром больше 200 мкм возрастает при сахарном диабете обоих типов. Их число достигает в некоторых случаях до 20% (в случаях СД) от общего количества островков (диаметр от 40 мкм). При диабетической фетопатии, вызванной СД1 или гестационным диабетом у матери, также наблюдалась выраженная гипертрофия островков, описанная в литературе (Баринова И.В. и др., 2010). Считается, что инсулин не проходит через плаценту, а плод до 8-12 недель беременности не вырабатывает собственный инсулин. Таким образом, у плода развивается гипергликемия, и в ответ на гипергликемию развивается реактивная гипертрофия и гиперплазия В-клеток фетальной поджелудочной железы. Данный процесс развивается с 16-й недели беременности. А при декомпенсации углеводного обмена — уже с 11-й недели, приводя в последующем к гиперинсулинемии у плода. Гипертрофия островков была выявлена в нашем исследовании у трех плодов поздних сроков, у двоих из которых была диагностирована диабетическая фетопатия.

Подводя итог этому разделу обсуждения, нужно подчеркнуть, что как при старении, так и при нарушениях углеводного обмена (СД1, СД2, диабетическая фетопатия) у человека была выявлена гипертрофия островков. Механизмы такого изменения до сих пор недостаточно ясны. Хорошо известно, что количество Вклеток, секретирующих инсулин, у человека может изменяться в ответ на физиологических изменение пелого ряда параметров: например, оно увеличивается при беременности и ожирении, а также при нормальном физиологическом росте (Bernard-Kargar C., Ktorza A., 2001). В частности, беременность приводит к глубоким изменениям в метаболизме у матери (в том числе и в секреции инсулина), направленным на обеспечение оптимального поступления питательных веществ плоду. Во время третьего триместра беременности у матери отмечается инсулинрезистентность, сопровождающаяся значительным увеличением инсулинового ответа на глюкозу (Freinkel N., 1980). Ожирение также сопровождается инсулинрезистентностью. Тем не менее,

гомеостаз глюкозы близок к нормальному у 75-80% людей, страдающих ожирением. Как и при беременности, эугликемия достигается повышением секреции инсулина в ответ на развивающуюся инсулинрезистентность. Считается, что это становится возможным благодаря не только повышению функциональной активности В-клеток, но и их гиперплазии (Klöppel G. et al., 1985). Таким образом, на поздних сроках беременности и при ожирении возникает увеличение общего количества В-клеток одновременно с повышением их функциональности, что вносит вклад В повышении секреции инсулина ответ на инсулинрезистентность (Bernard-Kargar C., Ktorza A., 2001).

Однако эти данные проясняют механизм образования гипертрофированных островков лишь частично, так как не учитывают сведения о сохранении и/или увеличении общего количества островков. Поэтому ответ на вопрос о причинах увеличения количества крупных островков при старении и нарушениях углеводного обмена следует искать в их клеточной архитектуре и клеточном составе.

4.2 Пластичность цитоархитектоники и клеточного состава эндокринной части поджелудочной железы

Разные формы структурной организации эндокринной части ПЖ отличаются не только по размерам, но и по клеточной архитектуре и по соотношению разных видов гормон-содержащих клеток. Соотношение В- и Аклеток варьирует в разных панкреатических островках: выявляются островки, в которых преобладают В-клетки, и островки, в которых преобладают А-клетки (Brissova M. et. al., 2005; Cabrera O. et al., 2006). Долгое время считалось, что островки человека и экспериментальных животных сходны как по строению, так и по клеточному составу (Orci L., Unger R. H., 1975). В настоящее время большинство авторов считает, что в мозаичных островках человека не наблюдается четкой анатомической организации (Brissova M. et al., 2005; Cabrera O. et al., 2006; Pisania A. et al., 2010), в отличие от грызунов, для которых

характерен плащевой тип строения островков. В нашем исследовании была обнаружена упорядоченность клеточной организации всех типов островков.

Островки очень обильно васкуляризованы и получают примерно в 10 раз больше крови, чем экзокринная часть (Henderson J.R., Daniel P.M., Fraser P.A., 1981; Konstantinova I. and Lammert E., 2004), при этом капилляры занимают 7-8% объема островка (Saito K., Yaginuma N., Takahashi T., 1979). В нашем исследовании было показано, что распределение и количество А-, В- и D-клеток в ПЖ человека зависит от размера островка и степени его васкуляризации. человека Островки плащевого типа V имеют достаточно скудную васкуляризацию, в то время как островки Лангерганса, чей диаметр превышает 100 мкм, гораздо более васкуляризованы. В составе такого островка были выявлены дольки, ограниченные капиллярами. Сердцевину долек массив В-клеток, на периферии и в непосредственной близости с кровеносными сосудами находятся А- и D-клетки. В наиболее крупных островках поджелудочной железы наблюдается повышение содержания глюкагон- и соматостатин-содержащих клеток. Эти данные совпадают с результатами недавних иммуногистохимических исследований ПЖ, продемонстрировавшими различия в клеточной архитектуре островков человека и грызунов. В островках человека выявлено более высокое содержании А-клеток (Brissova M. et al., 2005; Cabrera O. et al., 2006; Kharouta M. et al., 2009). Однако, затем было показано, что это относится исключительно к большим островкам человека (больше 50 мкм в диаметре). Больше того, островки похожие на островки человека появляются у грызунов в условиях большой потребности в инсулине, например таких, как беременность, ожирение и диабет (Kim A. et al., 2009; Steiner D.J. et al., 2010). Таким образом, общее повышенное соотношение числа А-клеток к В-клеткам в островках человека по сравнению с островками у мыши (Cabrera O. et al., 2006; Gromada J. T al., 2007) может быть связано с исследованием преимущественно крупных островков ПЖ человека. Различия (Brissova M. et al., 2005; Pisania A. et al., 2010) при описании строения островков могут быть связаны с тем, что при

исследовании свежевыделенных островков Лангерганса у человека, выявляются в основном крупные.

Следовательно, у взрослых людей пластичность эндокринной части ПЖ может проявляться в изменении числа и размеров островков, с сопутствующим изменением их кровоснабжения и клеточного состава. Однако вопрос о механизмах и последовательности этих изменений у человека до сих пор не решен.

различных работах были сделаны попытки представить схему морфогенеза островков: по мнению авторов, наблюдаемые в раннем онтогенезе различные формы организации эндокринной ткани можно представить как последовательные стадии развития от одиночных эндокринных клеток до смешанных (зрелых) островков (см. обзор литературы). Однако, так как биполярные островки не были обнаружены ни в одном из исследованных образцов ПЖ взрослых людей применить схему морфогентического развития островков в пренатальном онтогенезе к взрослым людям невозможно. Мы предлагаем следующую схему морфогенеза островков в ПЖ взрослого человека (Рисунок 32): из одиночных эндокринных клеток (Рисунок 32 а) формируются небольшие кластеры (Рисунок 32 б) и затем островки плащевого типа (Рисунок 32 в). В таких скоплениях клеток и небольших островках (диаметром 40-100 мкм) Аи D-клетки находятся на периферии, что связано с тем, что кровеносные капилляры не проникают внутрь, а только подходят к поверхности, или в них был выявлен только один капилляр, как описано в работе Савельева С.В. и др. (2007). В более крупных островках глюкагон- и соматостатин-содержащие клетки обнаруживаются, как и в периферической, так и внутренней зонах вдоль кровеносных сосудов, которые пронизывают островок (Рисунок 32 г-е). Эти данные соответствуют данным исследования (Bosco D. et al., 2010), в котором при помощи трехмерного анализа было показано, что клетки в больших островках формируют трехслойную структуру, где В-клетки образуют в центральной зоне скопления, окруженные А- и D-клетками и ограниченные кровеносными сосудами. По нашим данным по мере ангиогенеза число глюкагон-содержащих

клеток в островке возрастает, а инсулин-содержащих снижается (Рисунок 32 е). В дальнейшем крупный островок, предположительно, разрушается (Рисунок 32 ж).

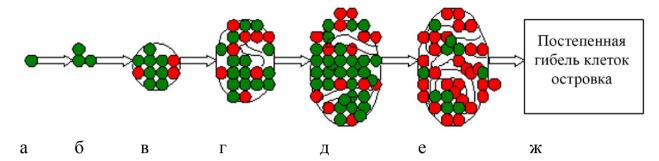


Рис. 32: Схема морфогенеза островков поджелудочной железы у взрослого человека. Условные обозначения: В-клетки - зеленый, А-клетки - красный, капилляры изображены в виде трубок внутри островка. Пояснения в тексте.

Эта схема предполагает наличие постоянного ангиогенеза в островках в островках у взрослых людей. Существуют работы, подтверждающие эту гипотезу (см., например, Shah P. et al., 2016). В то же время анализ данных, полученных при трансплантации островков в воротную вену печени, показали, что возможности реваскуляризации островков достаточно ограничены (Pepper A.R. et al., 2013). Однако недавно были получены данные, подтверждающие возможность ангиогенеза даже во взрослых островках. Крупные островки, полученные от старых мышей, удалось реваскулиризировать при пересадке в переднюю камеру глаза молодых мышей (Almaca J. et al., 2014).

Таким образом, распределение и количество А-, В- и D- клеток у человека зависит от типа островка и его васкуляризации. При этом крупные "мозаичные" островки тоже имеют четкую и упорядоченную цитоархитектуру. Следовательно, термин "мозаичные островки" - неудачен. Поэтому мы предлагаем называть такие островки смешанными или зрелыми (в смысле - "достигшие полного морфогенетического развития"). Данные, полученные в нашей работе, вносят вклад в объяснение того, что при старении и при СД обоих типов в островках повышается содержание А-клеток (Кронрод Б.А., 1962, Assmann A., Hinault Ch.,

Kulkarni R. N., 2009). Таким образом, в процессе роста островков выявлены процессы морфогенетической перестройки, выражающиеся в изменении цитоархитектоники островков в процессе ангиогенеза.

Несмотря на то, что большинство исследователей диабета обоих типов фокусируют свое внимание на числе и функции бета-клеток, другие виды клеток островков тоже могут вносить свой вклад в развитие заболевания. Например, в ряде исследований было показано, относительное увеличение количества Аклеток, синтезирующих глюкагон, при заболевании как СД1, так и СД2 (Assmann A., Hinault Ch., Kulkarni R. N., 2009). Однако в нашей работе было показано, что, несмотря на увеличение относительного количества, общая площадь, занимаемая глюкагон-содержащими клетками при СД1 уменьшается. Это также подтверждается данными, полученными в нашей работе по клиническому исследованию содержания глюкагона. В доступной литературе встречаются лишь единичные указания на возможность снижения уровня глюкагона заболевании сахарным диабетом обоих типов. Например, указывается на снижении функции А-клеток ПЖ при сахарном диабете 2 типа у детей (Banerji М.А., 2002). Кроме этого есть данные, что уже через 1—3 года после клинического проявления СД1 секреция глюкагона в ответ на гипогликемию заметно снижается. На протяжении последующих 2—3 лет секреция глюкагона постепенно уменьшается и, в конце концов, прекращается. Больные со сниженной секрецией глюкагона теряют способность отсутствующей предвестники надвигающейся гипогликемии. Патофизиология этого явления до сих пор остается не вполне ясной (Патракеева Е.М. и др., 2016). В уже упоминавшемся исследовании Kilimnik G. et al. (2011) при СД2 в ряде случаев уменьшалась суммарная площадь А-клеток, что противоречит исследованиям (Rahier J. et al., 1983; Butler A.E. et al., 2003; Yoon K.H. et al., 2003). Например, в исследовании Rahier J. et al. (1983) было показано, что у больных СД1, В-клетки практически отсутствовали, но "атрофические островки " по-прежнему содержали множество А-, D-, или РР-содержащих клеток. Масса А-, D- и РР- клеток и соотношение D- клеток к A-клеткам не отличались от измеренных в контроле. По

мнению авторов, это показывает, что исчезновение В- клеток при СД1 не имеет влияния на другие эндокринные клетки поджелудочной железы. При СД 2, масса А-клеток была увеличена, в то время как масса В-, D- и РР- клеток не изменилась. То есть, к снижению коэффициента В- к А- и D- к А- клеток приводила гиперплазия А-клеток. (Rahier J. et al., 1983).

На экспериментальных животных была показана важность изучения таких изменений в развитии. У 6-месячных крыс с моделью спонтанного диабета (spontaneously diabetic rats) выявляются нарушения в цитоархитектуре островков и фиброзные изменения стромы ПЖ. Возрастает как общий объем эндокринной части, так и процент В-клеток, в то время как объем экзокринной части и процент А-клеток уменьшается. Однако у 8-ми месячных крыс объем эндокринной части и В-клеток уменьшается, а экзокринной части и А-клеток увеличивается при сохранении повреждения островков (Gomez Dumm C.L., Semino M.C., Gagliardino J.J., 1990). Таким образом, при развитии сахарного диабета обоих типов необходимо учитывать не только количественные и функциональные изменения клеток, продуцирующих инсулин, но и остальных эндокринных клеток.

Для более детального изучения пластичности эндокринной части ПЖ необходимо исследовать клеточный состав ее различных типов организации в развитии человека. В целом ряде работ уже исследовали соотношение инсулин- и глюкагон-содержащих клеток в пренатальном развитии ПЖ человека (Кривова Ю.С., 2010; Ульяновская С.А., 2015; Schultze-Jena B. S., 1953; Gregg B.E. et al., Принципиальным нашей работы предшествующих отличием OT заключается в том, что количество эндокринных клеток проанализировано отдельно различных ПО своему морфологическому строению распределения эндокринных клеток в ПЖ. Например, в работах Кривовой Ю.С. (2010) и Gregg B.E. et al. (2012) соотношение эндокринных клеток изучалось по числу окрашенного материала в кадре (т.е. вообще без учета строения островков), в работе Ульяновской С.А. (2015) учитывались размеры островков (больше или меньше 100 мкм), что также не учитывает целый ряд деталей строения и развития эндокринной части ПЖ. Подход, примененный в нашем диссертационном

исследовании, позволил выявить ранее неизученные аспекты развития эндокринной части ПЖ.

Содержание В-клеток в плащевых островках практически не изменяется на протяжении всего онтогенеза человека, за исключением предплодного периода, в крупные островки, котором ОНЖОМ выявить состоящие из нескольких сливающихся островков плащевого типа. Количество В-клеток в биполярных островках примерно в 2 раза больше по сравнению с островками плащевого типа. Оно наиболее среднефетальном велико В периоде снижается позднефетальном. Количество А- и D- клеток в биполярных островках также намного превышает их число в плащевых и сопоставимо с числом В-клеток (или превышает его). Это объясняет повышение количества А-клеток по отношению к В-клеткам в пренатальном периоде, отмеченное многими авторами (Кривова Ю.С., 2010; Ульяновская С.А., 2015; Schultze-Jena B. S., 1953; Gregg B.E. et al., 2012). Среднее число В-клеток в смешанных островках человека значительно превышает их число в плащевых и биполярных островках, что подтверждается данными литературы (Kilimnik G. et al., 2012). У взрослых людей число В-клеток превышает - А-клеток. Однако их количество сильно варьируется - В-клетки составляют 54-80% всех клеток островка, А-клетки – 15-38% (Brissova M. et. al., 2005; Cabrera O. et al., 2006; Veld In't P, Marichal M., 2010), см. обзор литературы.

В гораздо меньшем числе работ внимание уделялось количественному изучению соматостатин-содержащих клеток (Ульяновская С.А., 2015; Clark A. and Grant A.M., 1983; Stefan Y. et al., 1983; Gregg B.E. et al., 2012), хотя D-клетки составляют 5-10% от популяции эндокринных клеток островков у взрослых людей (Veld In't P., Marichal M., 2010). Соматостатин, кроме эндокринных клеток ПЖ, секретируется также некоторыми клетками ЦНС и желудочно-кишечного тракта. Последние являются крупнейшим источником, циркулирующего в крови соматостатина (Hauge-Evans A. et al., 2009). Считается, что соматостатин оказывает в эндокринной системе общее ингибирующее влияние. Например, он подавляет секрецию гормона роста в аденогипофизе.

Рецепторы к соматостатину были обнаружены как на В-, так и на А-клетках. Экзогенное введение соматостатина или его синтетических аналогов подавляет глюкозо-индуцированную секрецию инсулина и вызванную аргинином секрецию глюкагона как in vitro, так и in vivo (Hauge-Evans A. et al., 2009). В недавних исследованиях (Chera S. et al., 2014) было показано, что одним из возможных путей восстановления пула В-клеток является трансдифференцировка А- и D - клеток. Поэтому изучение D-клеток является важнейшей теоретической и клинической задачей.

В данном исследовании было показано, что соотношение числа D - клеток к является наибольшим в раннефетальном периоде, в котором количество соматостатин-содержащих клеток от общего числа D - и В- клеток составляет 47 %. Затем в течение средне- и позднефетального периодов он постепенно снижается, а у взрослых людей он составляет всего 9%. Эти данные в целом соответствуют, полученным ранее (М.И. Балаболкин, 2000; Clark A. and Grant A.M., 1983; Stefan Y. et al., 1983; Veld In't P., Marichal M., 2010; Gregg B.E. et al., 2012): в пренатальном периоде онтогенеза процентное содержание D-клеток ПЖ в несколько раз превышает его у взрослых людей. Однако в нашем исследовании впервые показано, что это снижение происходит при всех формах распределения эндокринных клеток, т.е. в раннефетальном периоде процент Dклеток достоверно выше, чем у взрослых людей даже в небольших скоплениях эндокринных клеток и в плащевых островках. Так как соматостатин ингибирует выработку и инсулина и глюкагона (Hauge-Evans A. et al., 2009), и развивающихся островках (как по нашим данным, так и по данным литературы (Stefan Y. et al., 1983, Jeon J. et al., 2009)) D-клетки локализованы преимущественно в зоне расположения А-клеток, увеличенное количество Dклеток в пренатальном развитии, возможно, связано с необходимостью ингибировать избыточную выработку глюкагона.

Как уже отмечалось выше (раздел 4.1) количество островков с диаметром больше 200 мкм возрастает как при старении, так и при сахарном диабете обоих типов. Однако островки человека представляют собой не просто смесь

эндокринных клеток, а имеют четко выраженную структуру. Так, в больших островках больше контактов между А-клетками и А-клетками и В-клетками и меньше контактов между В-клетками, чем в маленьких островках. Это может иметь отношение к физиологии островков, так как непосредственный контакт между В-клетками нужен для распространения волны возбуждения эффективной секреции инсулина (Smolen P. et al., 1993; Jo J. et al., 2005). Таким образом, уменьшение числа контактов между В-клетками в больших островках у пациентов с нарушениями углеводного обмена может приводить к нарушению электрической активности в В-клетках и, соответственно, к изменениям в высвобождении инсулина (Kilimnik G. et al., 2011). Отношение А-клеток к Вклеткам возрастает от 0,27 у лиц в контроле до 0.57 при СД2 (Clark A. et al, 1988). Увеличение относительного числа А-клеток может вносить вклал гиперглюкагонемию и гипергликемию при нарушениях углеводного обмена и являться одним из механизмов патологической дизрегуляции.

Обнаруженные закономерности необходимо учитывать при проведении трансплантации островков лицам, страдающим от нарушений углеводного обмена. При выделении островков ПЖ человека для проведения трансплантаций страдающим сахарным диабетом, лицам, нужно, первую очередь, отсортировывать островки по размеру. Наиболее крупные островки ПЖ могут не подходить для трансплантации, в виду высокого содержания в них глюкагон-и соматостаин-содержащих клеток, высокой степени васкуляризации и, в ряде функциональности В-клеток. случаев, ограниченной Такое повышение требований к донорским тканям может привести с одной стороны к существенному увеличению срока жизни трансплантата. С другой стороны это повышает и трудоемкость данной операции, так как для единовременной пересадки требуется не менее 1 000 000 островков, которые должны быть получены в течение ограниченного времени и пересажены больному (Дедов И.И. и др., 2004).

В то же время, эндокринные клетки содержат не только гормоны, но и целый ряд других веществ, которые тоже могут вносить свой вклад в

пластичность ПЖ. Например, СД 2 характеризуется, по данным нашего исследования, накоплением островкового амилоида. Это соответствует данным литературы. У большинства исследованных пациентов с СД2 обнаруживаются отложения амилоида в островках, в среднем занимающие 6.5% площади островков в дорзальной части ПЖ (тело, хвост и передняя часть головки) (Clark A. et al, 1988). Иммунопозитивная окраска на амилоид была выявлена в отложениях внутри островка при СД2 и в В-клетках. Относительно недавно обнаружено, что амилоид состоит из специфического белка амилина (островковый амилоидный полипептид) (Нöppener J.W., Ahrén B., Lips C.J., 2000). К. Н. Johnson и др. (1989) установили, что амилин локализуется в секреторных гранулах В-клеток и высвобождается из них вместе с инсулином в ответ на введение глюкозы или других веществ. В настоящие время активно ведутся разработки таргетного ингибирования островкового амилоида для терапии СД2 (Höppener J.W., Ahrén B., Lips C.J., 2000).

Отложения амилоида приводят к морфологическим повреждениям островков как у людей, так и у ряда моделей спонтанного диабета у крыс. Амилоид наблюдается в виде периваскулярных отложений в капиллярах окружающих островки, а также вокруг капилляров проникающих в островки. Сейчас существует целый пласт литературы, посвященный нарушениям эндотелия в островках при СД. Наиболее сильное отложение амилоида сопровождается уменьшением числа В-клеток.

По результатам нашего исследования увеличение размеров островков при диабетической фетопатии происходило не только за счет увеличения количества В-клеток (преимущественно смешанных островков), но и за счет увеличения площади, занимаемой островковыми капиллярами. При этом периваскулярное пространство в большой части таких островков было тоже значительно расширено. Сходные изменения описаны рядом авторов для сахарного диабета 2 типа у взрослых. Раннее увеличение капиллярного тока крови может быть одним из факторов, который повреждает эндотелий островков, вызывает утолщение стенки капилляров, уменьшает ток крови в островках, как это описано для

диабетических ретино- и нефропатий и, наконец, снижает функцию островков. Следовательно, нарушения углеводного обмена у новорожденных с диабетической фетопатией и при СД2 могут быть обусловлены нарушениями эндотелия. Этот механизм требует отдельного, более глубокого изучения, так как может являться предпосылкой для более высокой заболеваемости СД2 в будущем у детей с диабетической фетопатией.

Другим примером влияния фенотипа эндокринных клеток на пластичность является сходство гормон-секретирующих клеток ПЖ с нервными клетками (см. обзор литературы). Согласно данным литературы, хромогранин А, синаптофизин и NSE присутствуют в эндокринных клетках поджелудочной железы человека с ранних сроков пренатального развития (10–12 недель) (Bouwens L., Lu W.G. and De Krijger R., 1997; Piper K. et al., 2004; Von Dorsche H.H. et al., 1989). Причем, двойное иммуногистохимическое маркирование антителами к синаптофизину и четырем гормонам эндокринных клеток (инсулину, глюкагону, соматостатину и панкреатическому полипептиду) показало, что в панкреатических островках присутствуют гормононегативные клетки, реагирующие с антителами к синаптофизину (Bouwens L., Lu W.G. and De Krijger R., 1997). Эти клетки, по мнению авторов, являются предшественниками эндокринных клеток.

Нами было проведено сравнительное исследование распределения NSE в поджелудочной железе человека на разных сроках развития. Гликолитический фермент нейронспецифическая енолаза (2-фосфо-D-глицерат гидролаза, NSE) является маркером нервной и «нейроэндокринной» дифференцировки, в том числе нервных волокон и клеток островков Лангерганса поджелудочной железы человека (Инвитро диагностика. Лабораторная диагностика./ Под ред. Кондрашевой Е. А., Островского А. Ю., Юрасова В. В. // Москва, Медиздат, 2007; Murray G.I. et al., 1993,). В настоящее время NSE используется в качестве маркера этих процессов, как в нормальных тканях, так и в опухолях. Активность фермента клиническим статусом коррелирует с И используется при мониторинге заболеваний и в прогностических целях. Однако, несмотря на использование этого фермента в клинической практике, данные о характере распределения NSE

в клетках островков Лангерганса и структурах нервной системы поджелудочной железы в нормальном развитии человека и у взрослых людей отрывочны.

В развитии поджелудочной железы человека иммунопозитивная реакция на NSE в эндокринных клетках была обнаружена только на 11-12-й неделе гр. Это несколько противоречит данным литературы, по которым NSE была обнаружена в эндокринных клетках уже на 10-й неделе гестационного развития человека (Von Dorsche H.H. et al., 1989). Возможно, это связано с использованием в исследованиях разных клонов антител. В исследовании распределения хромогранина А в пренатальном развитии человека (Кривова Ю.С. и др., 2013) были получены данные о том, что при реакции на антитела к хромгранину А уже у 10-11-недельных плодов маркируется часть клеток в эпителии протоков поджелудочной железы. Синаптофизин обнаружен тоже с 12 нед. гр (Von Dorsche H.H. et al., 1989). Таким образом, NSE, как по данным, полученным в настоящей работе, так и по данным литературы, является одним из первых белков, характерных для нервной системы, который появляется в пренатальном развитии поджелудочной железы. Данный фермент является маркером функциональной активности клеток (Kaiser E. et al, 1989). Следовательно, данные, полученные в диссертационном исследовании, подтверждают гипотезу о том, что эндокринные клетки поджелудочной железы являются функционально активными уже в раннем плодном периоде, что, по всей видимости, связано с их важной ролью в регуляции метаболизма.

При дальнейшем развитии органа масса эндокринных клеток нарастает, образуются кластеры эндокринных клеток и, впоследствии, панкреатические островки. Начиная с 12-й недели и на всех последующих сроках развития иммунопозитивная реакция на NSE наблюдается в эндокринных клетках панкреатических островков, одиночных эндокринных клетках и их небольших кластерах, диффузно распределенных в ацинарной паренхиме, а также в части клеток в протоках железы. Внутри панкреатических островков большинство клеток маркируются антителами к NSE. Таким образом распределение NSE в ПЖ человека сходно с распределением хромогранина А и синаптофизина.

Кроме этого было проведено исследование распределения NSE в A-, В- и Д-клетках. NSE обнаруживала колокализацию в клетках со всеми тремя видами исследованных гормонов. Однако в части клеток была обнаружена ослабленная или иммунонегативная реакцию на NSE, что может свидетельствовать о разной степени функциональной нагрузки клеток в островках. В ряде крупных островков реакция на NSE была снижена.

СД1. При отсутствии реакции на инсулин у людей, страдавших иммуногистохимическая реакция на NSE в эндокринных клетках ПЖ также отсутствовала, что позволяет предположить, что NSE тоже может служить иммуногистохимическим маркером развития диабета 1-го типа у взрослых. В трех исследованных случаях, реакция на инсулин и нейронспецифическую енолазу в клетках островков поджелудочной железы пациентов, страдавших по данным катамнеза СД 1-го типа в той или иной степени сохранялась. Это подтверждает гипотезу о корреляции в эндокринных клетках поджелудочной железы у взрослых уровня содержания нейронспецифической енолазы И функциональной активности.

Наше исследование позволило несколько уточнить возможные механизмы развития СД1. Не выходя за рамки концепции об аутоиммунной природе СД1, можно предположить следующую последовательность событий при развитии этого заболевания. На первом этапе происходит аутоиммунизация белками собственной центральной нервной системы. Причиной такого события может быть продолжительный стресс, механическая травма, последствия инфекционных заболеваний или химических отравлений. Центральная и периферическая нервная система защищены намного лучше, чем островки Лангерганса. В результате Тлимфоциты атакуют эндокринные клетки, которые вырабатывают характерные для нервной системы. Возможно, что патологические процессы ускоряются нарушения гликолиза бета-клетках из-за В при отсутствии нейронспецифической енолазы или снижения ее концентрации, и, соответственно, снижения продукции инсулина.

Гликолиз является главным путем утилизации глюкозы в организме животных и человека (Биохимия мозга. /Под ред. Ашмарина И. П., Стукалова П. В., Ещенко Н. Д. –СПб.: Издательство С.-Петербургского университета, 1999). В-клетка является сенсором глюкозы: когда в крови повышается концентрация глюкозы, секретируется инсулин, чтобы восстановить ее исходную равновесную концентрацию. В свою очередь, выделение В-клетками инсулина в ответ на повышение концентрации глюкозы реализуется по следующему механизму. В клетке глюкоза подвергается гликолизу и далее окисляется в дыхательном цикле с образованием АТФ, что в итоге приводит к резкому повышению концентрации в клетке ионов кальция и к высвобождению заранее синтезированного инсулина (МасDonald P. E., Joseph J. W., Rorsman P., 2005).

Однако гликолиз в эндокринных клетках ПЖ отличается от гликолиза в других клетках тем, что реакция перехода 2-фосфо-D-глицериновой кислоты в фосфоенолпируват катализируется нейронспецифической енолазой. Если NSE отсутствует или ее содержание снижено, то процессы гликолиза в В-клетке могут нарушаться (соответственно, снижается продукция инсулина), что в дальнейшем может приводить к клеточной гибели. Подтверждением этой гипотезы являются данные (Hovsepyan M.R. et al., 2004), о достоверном возрастании аутоантител к NSE у пациентов с сахарным диабетом 1 типа. Еще одним косвенным подтверждением роли NSE в развитии нарушений углеводного обмена, стали нарушениях паттерна ENO₂ недавние данные 0 метилирования (кодирующего NSE) при риске развития СД2 (Quilter C. R. et al., 2014).

Другим исследованным в работе белком, характерным для нервной системы, был белок S100. Это - кальций-связывающий протеин, впервые описанный Б. В. Муром в 1965 году. Долгое время он считался специфичным для нервной ткани. Согласно данным литературы различные формы белка S-100 присутствуют во многих тканях (Fekete E. et al., 1999). Под общим названием "Белок S100" известна целая группа белков (обнаружено уже 24 члена), функционально распределенных в три основные подгруппы: те, которые оказывают только внутриклеточные регуляторные эффекты, те, которые, в

основном, осуществляют функцию внеклеточного сигнала и, наконец, подгруппа, осуществляющая обе эти функции (Donato R. et al., 2013). Внутри клеток S100 белки участвуют в регуляции пролиферации, дифференцировки и апоптоза, Ca2+ - гомеостаза и клеточного метаболизма, через взаимодействие с различными В ферментами и рецепторами белками-мишенями TOM числе факторов транскрипции. Внеклеточно S100 белки оказывают регулирующее деятельность большое видов количество различных клеток (нейроны, астроциты, Шванновские клетки, микроглия, тучные клетки, суставные хондроциты, эндотелиальные и гладкомышечные клетки сосудистой системы, миобласты, кардиомиоциты, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, лимфоциты), тем самым участвуя в формировании врожденного и приобретенного иммунного ответа, и регулируя миграцию клеток и хемотаксис, развитие и регенерацию тканей, а также воспалительные процессы и рост опухолей (Donato R. et al., 2009, 2013).

Для нервной системы характерен белок S-100B, который присутствует в астроцитах, шванновских клетках, отдельных популяциях нейронов и некоторых других видах клеток (Fekete E. et al., 1999). Нами получены данные подтверждающие, что в структурах нервной системы ПЖ человека иммунореактивность к S-100 локализована в глиальных клетках (Amella C. et al., 2008; Sunami E. et al., 2001).

Кроме основных видов эндокринных клеток в ПЖ человека еще в 1989 году были обнаружены S100-содержащие клетки (Lászik Z., Krenács T., Dobó E., 1989). Эти клетки, по данным исследователей, были выявлены во всех островках, и образовывали отдельную клеточную популяцию. Клетки позитивные к антителам к белку S100, были иммунонегативны к антителам к инсулину, глюкагону и панкреатическому полипептиду. Также, обычно, S100 позитивные- и D-клетки представляли 2 различные популяции, но иногда удавалось выявить колокализацию S100 и соматостатина. У целого ряда животных тоже были обнаружены S100-позитивные клетки (Takayanagi M., Watanabe T., 1996; Uchida T. and Endo T., 1989; Sunami E et al, 2001; Girod C., Durand N., Raccurt M., 1987). Данные о расположении и форме этих клеток, а также о колокализации с

гормонами эндокринной части ПЖ во многом противоречивы. Так, например, у крыс S100+клетки выявлены на периферии островков и, как считается, образуют глиальную капсулу островка. У морской свинки и яванского макака обнаружено 2 различных вида клеток: один вид клеток обнаруживается на периферии островков, имеет отростки и может представлять собой глиальные клетки. Клетки второго вида были выявлены внутри островков и сходны по своей морфологии с эндокринными клетками. При этом у морской свинки S100+клетки второго вида коэкспрессируют инсулин, а у макака - образуют отдельную популяцию. Кроме этого у некоторых видов животных (Fujita T., 1959) S100+клетки обнаружены в составе нейро-инсулярных комплексов.

В нашем исследовании, в островках Лангерганса человека было обнаружено 2 вида S100-позитивных клеток: клетки, расположенные по периферии островка и клетки, расположенные внутри него. Эти два вида клеток имеют отличия.

Клетки, расположенные на периферии по своей морфологии напоминают клетки, обнаруженные ранее на периферии панкреатических островков грызунов (Doney S., 1984; Uchida T. and Endo T., 1989; Sunami E. et al., 2001; Fujita T., Iwanaga Т., Nakajima Т., 1983). На настоящий момент большинство авторов считают эти клетки глиальными. У грызунов (мыши, крысы) отростки шванновских клеток тесно контактируют с эндокринными клетками, образуя прерывистую капсулу, отграничивающую эндокринные клетки соединительнотканных элементов и ацинарной паренхимы (Donev S. R., 1984; Sunami E. et al., 2001). S100-позитивные клетки, обнаруженные нами на периферии панкреатических островков человека, тоже имели небольшое тело и длинные отростки И были сходны c сателлитными клетками внутрипанкреатических ганглиев и шванновскими клетками. В отличие от других млекопитающих, в ПЖ человека S100+ клетки 1 вида присутствуют лишь в некоторых панкреатических островках. Причем отростки этих клеток покрывают небольшую часть поверхности островка, не образуя замкнутой капсулы. Поэтому маловероятно, что эти клетки, присутствующие в панкреатических островках у человека, могут выполнять барьерную функцию.

При ультраструктурном анализе, проведенном Кривовой Ю.С. периферии некоторых панкреатических островков были обнаружены клетки треугольной или веретеновидной формы с отростками. По своей локализации и морфологическим характеристикам соответствовали S-100-ЭТИ клетки позитивным отросчатым клеткам. Отростки этих клеток проходили по периферии панкреатических островков на различном расстоянии от эндокринных клеток (0.3–4 мкм). На отдельных участках были обнаружены неспециализированные межклеточные контакты между плазматическими мембранами отростков и эндокринными клетками. В межклеточном пространстве между отростками и поверхностью эндокринных клеток в большинстве случаев присутствовали нервные волокна и тонкие нервные окончания (диаметром от 0.4 мкм). В отдельных случаях нервные окончания были окружены отростками. По своим ультраструктурным характеристикам и интеграции с нервными окончаниями, отросчатые клетки, обнаруженные в панкреатических островках у плодов человека и детей, были сходны со шванновскими клетками, описанными ранее в островках других млекопитающих (Donev S. R., 1984; Sunami E. et al, 2001). их функциональная роль не ясна, хотя есть данные, что именно эти клетки являются первой мишенью аутоимунной атаки при сахарном диабете 1 типа (инсулинзависимом) (Winer S., Tsui H., Lau A. et al., 2003). Кроме этого в ряде работ (Uchida T., Endo T., 1989; Girod C., Durand N., Raccurt M., 1987) выявлена связь S100-позитивных клеток с нейро-инсулярными комплексами.

\$100-позитивные клетки 2-го вида, расположенные внутри островка, по своей морфологии не отличаются от эндокринных клеток островка и схожи по описанию с клетками, обнаруженными ранее у взрослых людей, в том числе страдавших сахарным диабетом и панкреатитом (Lászik Z., Krenács T., Dobó E., 1989), а также у различных видов животных (Takayanagi M., Watanabe T., 1996; Uchida T., Endo T., 1989; Girod C., Durand N., Raccurt M., 1987). Часть авторов, в том числе и изучавшие \$100+ клетки у человека (Lászik Z., Krenács T., Dobó E., 1989), считает, что это отдельный вид клеток, в то время как другая часть авторов обнаруживает колокализацию \$100 с инсулином.

В нашем исследовании S100-позитивные клетки 2-го вида выявлены у плодов на разных сроках развития в плащевых и биполярных островках преимущественно в зоне локализации глюкагон- и соматостатин-содержащих клеток. У взрослых при анализе серийных срезов были выявлены различия в количестве и расположении клеток иммунопозитивных к S100 2-го вида и A- и D-клеток. В смешанных островках человека было выявлено гораздо меньше таких S100-позитивных клеток, чем содержащих глюкагон. Их количество было сопоставимо с числом соматостатин-содержащих клеток. Однако содержащие клетки 2-го вида располагаются в таких островках не на периферии и не вдоль капилляров (в отличие от А- и D-клеток), а совместно с В-клетками. При этом S100-клеток меньше, чем инсулин-содержащих и только в небольшой части из них обнаруживается колокализация S100 и инсулина. При применении двойного окрашивания была выявлена четкая колокализация S100-позитивных клеток 2-го вида и нейронспецифической енолазы, при этом общее количество \$100+клеток было гораздо меньше, чем NSE-содержащих. Таким образом, наличие или отсутствие в клетках белка S100 возможно связано с различным функциональным состоянием гормон-продуцирующих клеток.

Островки ПЖ - это функциональные единицы секреции, где активность Вклеток координирует одновременный выброс инсулина. Секреторный ответ целого островка больше, чем сумма ответов отдельных В-клеток. Исследования экспрессию последнего времени выявили внеклеточного кальцийчувствительного рецептора (CaSR) В-клеток у грызунов и человека. Рецептор небольшие локальные изменения свободного кальция, происходят сразу после введения питательных веществ и/или непищевой стимуляции. Данные подтверждают возможность, что CaSR обеспечивает альтернативный механизм аутокринной и паракринной регуляции между Вклетками (Squires P.E. et al, 2014). Некоторые из S100 белков, как раз регулируют функции клеток, благодаря активации поверхностных рецепторов.

Поэтому, учитывая функции кальций-связывающего белка S100 в ЦНС (Donato R et al, 2009, 2013), можно предположить, что S100-позитивные клетки 2

вида играют роль в синхронизации выделения гормонов, так как этот процесс носит кальций-зависимый характер (Squires P.E. et al, 2014).

Таким образом, показано, что эндокринная часть ПЖ человека изменяется в течение жизни не только за счет увеличения (сокращения) числа и размеров структурных элементов (эндокринных клеток или островков). Важную роль в пластичности эндокринного отдела ПЖ, как в развитии, так и при нарушениях углеводного обмена, играет клеточный состав, цитоархитектоника островков и изменение клеточного фенотипа.

4.3 Источники происхождения новых клеток для роста островков и возобновления их популяции

Возникает закономерный вопрос о факторах, вовлеченных в изменение количества эндокринных клеток в ПЖ, в том числе и у взрослых людей. Некоторые исследования продемонстрировали удвоение общего числа В-клеток к концу беременности у млекопитающих, которое постепенно уменьшается после родов, что хорошо иллюстрирует пластичность эндокринной поджелудочной железы (Scaglia L., Smith F.E., Bonner-Weir S., 1995; Bernard-Kargar and Ktorza, 2001; Chhabra P. et al., 2011).

Источники происхождения новых клеток для роста островков и возобновления их популяции неизвестны. В литературе в качестве механизмов пластичности эндокринных клеток ПЖ обычно называются процессы пролиферации, неогенеза, изменения объема клеток и клеточной смерти (некроз и апоптоз) (Аметов А.С., 2008; Bernard-Kargar C., Ktorza A., 2001; Bonner-Weir S., 2001; Chhabra P. et al., 2011). Наибольшее внимание уделяется при этом В-клеткам, при этом остальные клетки изучены недостаточно.

Несмотря на то, что образование новых островков у взрослых, в первую очередь, было продемонстрировано в ответ на повреждения ПЖ (например, такие как перевязка панкреатического протока, частичная панкреотомия и т.д.) и метаболические стрессы, существует достаточно доказательств того, что

пролиферация существующих В-клеток происходит на протяжении всей жизни (Теta et al., 2007; Chhabra P. et al., 2011). В ряде работ было показано, что при формировании в развитии смешанных островков Лангерганса у человека происходит увеличение отношения числа В-клеток к А- клеткам, прежде всего за счет пролиферации В-клеток (Kassem S.A. et al., 2000; Meier J.J. et al., 2008; Gregg В.Е. et al., 2012). В то же время было показано, что у взрослых людей скорость пролиферации В-клеток достаточно низка (3% в день у взрослых людей и 10% в день у плодов) (Hellerström C., Swenne I., Andersson A., 1988). Показательной в этом плане является дискуссия о продолжительности жизни эндокринных клеток островков. Считается, что срок жизни В-клеток у мышей в возрасте до 1 года составляет от 1 до 4 месяцев, в более старшем возрасте скорость пролиферации снижается. Используя эти же методы, для В-клеток человека было показано, что их пролиферация примерно в 10 раз меньше чем у мышей и достигает пика к 5 годам. Однако в других исследованиях было показано, что срок жизни В-клеток человека составляет 20-30 лет или даже больше (Спор N. et al., 2010, 2011).

Многочисленные исследования предполагают, что в дополнение к пролиферации существующих В-клеток, новые В-клетки могут быть получены из дифференцированных клеток ПЖ взрослого человека путем взаимопревращений клеток эндокринной и экзокринной частей ПЖ. Также высказываются предположения о неогенезе из клеток протоков или из каких-либо других клеток-предшественников (Bonner-Weir et al., 2010; Chhabra P. et al., 2011).

В настоящий момент принято считать, что образование эндокринных и пренатальном периоде происходит экзокринных клеток В клеток, расположенных в протоках поджелудочной железы. В нашей работе также были обнаружены эндокринные клетки, ассоциированные с протоками ПЖ, начиная с ранних сроков развития. Существует вероятность, что в постнатальном периоде предшественниками эндокринных клеток ПЖ могут быть дифференцированные клетки протоков (Chhabra P. et al., 2011). Это подтверждается морфологическими наблюдениями о том, что число комплексов, включающих в себя эндокринные расположенные в непосредственной клетки, связи ИЛИ около

увеличивается у взрослых людей при повреждениях ПЖ, нарушениях углеводного обмена, а также при беременности и ожирении. Образование этих комплексов особенно выражено при панкреатите и при фиброзе ПЖ (Gianani R. et al., 2006, 2011). Эти данные показывают, что клетки эпителия протоков могут быть источником для образования новых эндокринных клеток ПЖ. Однако у целого ряда автора возникают вопросы, связанные с функциональной зрелостью клеток, возникающих таким путем (Solar M. et al., 2009, Kushner et al., 2010). В частности, было показано, что после приобретения эпителиальными клетками фенотипа дифференцированной клетки панкреатического протока, их вклад в образование новых эндокринных клеток ПЖ становится ограниченным.

Еще одним потенциальным источником образования новых эндокринных клеток ПЖ являются ацинарные клетки. У многих позвоночных были выявлены одиночные ацино-островковые клетки (Яглов B.B., 1975). Эти клетки одновременно содержат гранулы cпищеварительными ферментами (экзокринные), гранулы, содержащие гормоны (инсулин, глюкагон, соматостатин). В исследований ряде была показана возможность трансдифференцировки ацинарных клеток инсулин-позитивные напрямую (Minami K. et al., 2005; Minami K. and Seino S., 2008) или через промежуточную стадию протоковых клеток (Means A.L. et al., 2005). Однако в других исследованиях было показано, что функциональность таких клеток ограничена (Blaine S.A. et al., 2010)

В последнее время наряду с гипотезами о репликации В-клеток и неогенезе островков из прогениторных стволовых клеток, активно обсуждается гипотеза о возможной дедифференцировке части инсулин-содержащих клеток в глюкагон-содержащие и об обратной трансформации (Thorel K. et al., 2010; Chhabra P. et al., 2011). В основном такие исследования проводились на грызунах, и пока недостаточно данных для подтверждения существования такого механизма образования В-клеток ПЖ у человека. Вместе с тем, в эндокринных клетках развивающейся поджелудочной железы человека наблюдается коэкспрессия нескольких гормонов (De Krijger R.R. et al., 1992). Большинство авторов

отмечают, что таких клеток очень мало (Piper K. et al., 2004; Jeon J. et al., 2009). Некоторые исследователи полагают, что в поджелудочной железе человека эти клетки могут являться клетками-предшественницами эндокринных клеток. Так, например, локализация клеток, коэкспрессирующих несколько гормонов, в отдельных клетках и небольших кластерах может свидетельствовать о том, что они присутствуют в новообразующихся островках (Jeon J. et al., 2009).

В исследованиях L.I. Larsson (1998) и J. Bocian-Sobkowska et al. (1999) было показано, что развитие эндокринной части поджелудочной железы предполагает наличие мультигормональной фазы дифференцировки клеток. J. Jensen et al. (2000) и М.С. Калигин с соавт. (2009, 2011) обнаружили существование одной общей мультигормональной клетки-предшественника для А- и В-клеток поджелудочной железы. Однако ряд авторов считает, что эндокринные клетки, появляющиеся на ранних сроках развития и коэкспрессирующие несколько гормонов, не являются предшественниками эндокринных клеток взрослых особей (Jensen J. et al., 2000).

Gianani R. et al. (2011) в своей обзорной работе упоминает клетки, содержащие одновременно инсулин и глюкагон в ПЖ с фиброзом (однако данные об этом не опубликованы) и предполагает, что в условиях сходных с хроническим панкреатитом и фиброзом ПЖ число А-клеток увеличивается благодаря неогенезу из клеток протоков с последующей трансдифференцировкой в В-клетки.

В нашем исследовании клетки с колокализацией инсулина и глюкагона (АВклетки) выявлены как в пре-, так и в постнатальном развитии ПЖ человека. Эти клетки могут располагаться как поодиночке, так и находиться в составе скоплений эндокринных клеток и в островках разных типов (в том числе и в смешанных). Наибольшее количество таких клеток встречается в пре- и раннефетальном периодах развития. Клетки с колокализацией инсулина и глюкагона удалось также обнаружить на протяжение всего пренатального периода. Интересно отметить, что для многих амфибий характерна коэкспрессия различных гормонов в эндокринных клетках (Putti R. et al., 1997; Etayo J.C. et al., 2000). У рептилий, как и у амфибий, в эндокринных клетках поджелудочной

железы может наблюдаться коэкспрессия нескольких гормонов (Della Rosa A. and Putti R., 1995). Колокализация инсулина и глюкагона была обнаружена и в клетках панкреатических островков грызунов, как во время развития, так и у взрослых животных (Jensen J. et al, 2010, Katsuta H. et al., 2010). Эти данные свидетельствуют о том, что колокализация одновременно инсулина и глюкагона в одной клетке ПЖ человека - анцестральный признак.

Вопрос о происхождении различных видов эндокринных клеток является предметом споров. В пользу общего предшественника для всех видов эндокринных клеток свидетельствует наличие коэкспрессии в эндокринных клетках нескольких гормонов. V.K. Ramiya et al. (2000) в исследованиях in vitro наблюдали образование эндокриноцитов, экспрессирующих глюкагон и инсулин, полипотентных прогениторных стволовых клеток эпителия поджелудочной железы у мышей. Однако некоторые авторы считают, что эндокринные клетки, появляющиеся на ранних сроках развития коэкспрессирующие несколько гормонов, не являются предшественниками эндокринных клеток взрослых особей (Herrera P.L., 2000; Jensen J. et al., 2000). В пользу этого свидетельствуют данные кинетических исследований. При развитии поджелудочной грызунов (мышей) наблюдается железы две ≪волны дифференцировки эндокринных клеток». Во время "первой волны" на ранних сроках развития (с 9,5 дня эмбрионального развития) появляются клетки, коэкспрессирующие несколько гормонов, которые не являются предшественниками эндокринных клеток взрослых особей. Во время «второй волны», между 15,5 и 18,5 днями эмбрионального развития, из гормондифференцируются негативных клеток-предшественниц клетки, которые являются предшественниками эндокринных клеток взрослых особей.

У взрослых людей число АВ-клеток относительно невелико. Эти клетки выявлены в основном в тесном соседстве с капиллярами. В работе Bosco D. et al. (2010) было показано, что в скопления В-клеток, в смешанных островках кровеносные сосуды не проникают. По мнению авторов инсулин-содержащим клеткам приходится образовывать отростки, проходящие между А-клетками,

чтобы дотянутся до капилляров. На нашем материале, используя стандартный были иммунопероксидазный обнаружены В-клетки метод, цитоплазматическими выростами. Однако было выявлено, что клетки, содержащие инсулин и глюкагон на серийных срезах часто занимают одно и то же положение. Следовательно, выявленные на двойном окрашивании клетки содержат одновременно два гормона. С учетом уменьшения в ряде островков процентного соотношения инсулин-содержащих клеток к глюкагон-содержащим ОНЖОМ предположить, что ПО мере развития островка ряд В-клеток в А-клетки. Теоретическая возможность трансформации трансформируется эндокринных клеток ПЖ, как уже было отмечено выше, активно обсуждается в после экспериментов Thorel F. et al., 2010, разрушавшей до 99% островков у мышей при помощи введения дифтерийного токсина. В условиях нехватки инсулина, часть глюкагон-содержащих клеток перепрограммировалась в В-клетки. К сожалению, проверить эти рассуждения на привычных для нас экспериментальных моделях достаточно тяжело в силу того, что, как было указано выше, панкреатические островки грызунов принципиально отличаются от островков Лангерганса человека (Bosco D. et al., 2010, Brissova M.et al., 2005. Cabrera et al., 2006). Изолированные смешанные островки ПЖ человека не поддерживаются в культуре, в том числе из-за нарушений васкуляризации механических повреждений, происходящих во время их выделения (Bosco D. et al., 2010).

Интересно, что клетки, содержащие одновременно инсулин и глюкагон, были выявлены и в островках взрослых людей, страдавших длительное время СД1, у которых сохранялась секреция инсулина. Возможно, что именно наличие таких клеток в эндокринной части ПЖ человека, объясняет остаточную секрецию инсулина, выявленную в нашем исследовании у 30% пациентов с длительно текущим СД. Из данных как настоящего исследования, так и других авторов (Panero F. et al., 2009; Liu E.H. et al., 2009; Keenan H.A. et al., 2011; Oram R.A. et al., 2015) убедительно следует, что остаточная секреция инсулина сохраняется после 20 лет после манифестации диабета. Исследовав концентрацию в периферической

крови глюкагона, С-пептида и антител к инсулину у 300 пациентов, страдающих сахарным диабетом 1 типа не менее 20 лет, у 30% пациентов был обнаружен синтез собственного инсулина. Наиболее ожидаемые результаты были выявлены только у 21% пациентов. В этой группе низкий уровень С-пептида был сопряжен практическим Для большинства отсутствием антител К инсулину. исследователей и клиницистов очевидна ситуация, при которой снижение уровня синтеза собственного инсулина должно приводить к снижению уровня антител (Willcox A. et al., 2009; Coppieters K.T., et al., 2012). В 49% случаев высокий уровень антител к инсулину сохранялся у пациентов с низким уровнем С-пептида в периферической крови. Такое распределение свидетельствует о вторичной хронической иммунизации к экзогенному инсулину. Пациентов с близким к нормальному уровню С-пептида и высоким уровнем антител к инсулину было 7%. Высокий уровень синтеза собственного инсулина и постоянные инъекции экзогенного могут приводить к ответной выработке антител. В четвертой группе пациентов был показан высокий уровень синтеза инсулина без выработки антител к инсулину.

Таким образом, из полученных данных следует, что дифференцировка Вклеток сохраняется или восстанавливается у 30% пациентов с длительным СД1. Количества эндогенного инсулина у пациентов в этой группе должно хватать для прекращения инсулиновой терапии. Данные по этой группе пациентов с СД1 показывают, что, с учётом постоянной инсулинотерапии и нормальной активности В-клеток, у таких больных должны сказываться последствия хронической передозировки инсулина. Они должны проявляться в регулярной гипогликемии, переедании и синдроме рикошетной гипергликемии М. Сомоджи. Вполне возможно, что именно для таких пациентов характерно крайне нестабильное течение СД 1 и постоянные значительные колебания уровня глюкозы в крови. В рамках теории об аутоиммунной природе СД1 присутствие синтеза С-пептида при длительном СД1 не находит объяснения ни теоретических, ни в клинических исследованиях (Liu E.H. et al., 2009; Keenan H.A. et al., 2011; Wang L., Lovejoy N.F., Faustman D.L., 2012). Хотя идея о том, что

аутоиммунный процесс может прекращаться, в настоящее время не доказана, и, считается, что большинство вновь возникающих в процессе неогенеза В-клеток уничтожается, в настоящем исследовании было показано как отсутствие антител к инсулину, так и инсулита у пациентов с длительным СД1 с остаточной секрецией инсулина.

Выявление клеток содержащих одновременно инсулин и глюкагон доказывает возможность одновременного существования двух субпопуляций инсулин-содержащих клеток. Одна субпопуляция (АВ-клетки) одновременно синтезирует два гормона, а вторая – только инсулин (ВВ-клетки). В настоящее время, обсуждается возможность трансформации эндокринных клеток ПЖ (Bonner-Weir S. et al., 2010; Thorel et al., 2010; Spijker H.S. et al., 2013; Weir G.C., Aguayo-Mazzucato C., Bonner-Weir S., 2013; Mezza T. et al., 2014). Однако гипотеза о транс-дифференцировке эндокринных клеток также не объясняет остновку аутоиммунных процессов в некоторых случаях СД1. В нашей работе предлагается альтернативная гипотеза, которая, однако, требует дальнейшей проверки.

Предполагается, что в ПЖ человека существуют 2 субпопуляции инсулинсодержащих клеток, отличающиеся по своему фенотипу: вызывающие (ВВ) и невызывающие (АВ) аутоиммунную агрессию. Эти две группы клеток обладают свойствами. Субпопуляция ВВ-клеток в норме доминирует в разными эндокринной части ПЖ человека и составляет до 90% от всех инсулинпродуцирующих клеток. В начале развития сахарного диабета первого типа повышение нормального уровня антител к инсулину, а затем и их гиперпродукция отражает только снижение количества ВВ-клеток. Процессы компенсаторной дифференцировки ВВ-клеток индивидуально изменчивы и предопределяют темпы снижения синтеза инсулина. Когда процессы аутоиммунного разрушения популяции ВВ-клеток завершаются, наступает так называемая абсолютная инсулиновая недостаточность, характерная для диабета первого типа. Как было показано в клинических исследованиях (Wang L., Lovejoy N.F., Faustman D.L., 2012) число инсулин-продуцирующих клеток сокращается в течение СД1 до 10% По всей видимости, нормального количества. остающиеся

продуцирующие клетки являются суб-популяцией АВ-клеток, которые не вызывают аутоиммунную агрессию. В течение болезни популяция АВ-клеток постепенно увеличивается. Это явно длительный процесс, который позволяет предположить существование пока неизвестных процессов торможения дифференцировки АВ-клеток или механизмов подавления их функциональной активности. Эта теория подтверждается экспериментами, в которых АВ-клетки были обнаружены в ПЖ NOD-мышей, которые не заболевали диабетом, несмотря на полную потерю В-клеток (Chhabra P. et al., 2011).

Резюмируя обсуждение по источникам происхождения новых эндокринных клеток ПЖ для возобновления их популяции и роста островков, надо признать, что этот вопрос далек от своего решения, несмотря на его принципиальную важность для восстановления нормального гомеостаза глюкозы у людей с нарушениями углеводного обмена. Исследования, проведенные в течение последнего времени, показывают несколько основных источников пластичности числа эндокринных клеток: пролиферация, неогенез, трансдифференцировка, а также некроз и апоптоз. Результаты данного диссертационного исследования показывают, что одним из ключей для решения этой проблемы могут быть клетки, содержащие одновременно два гормона. Такие клетки встречаются как в филогенезе ПЖ, так и в пренатальном развитии человека, что позволяет причислить этот признак к анцестральным. Возможно эти клетки играют роль в сохранении и восстановлении секреции инсулина у части людей, страдающих СД1.

4.4 Другие проявления пластичности эндокринной части поджелудочной железы

На состояние эндокринной части ПЖ также могут влиять экзокринная часть ПЖ и кровеносная, лимфатическая и нервная системы. При сравнении образцов поджелудочных желез у лиц молодого и зрелого возраста и лиц пожилого и старческого возраста, не страдавших нарушениями углеводного

обмена, не было выявлено достоверных изменений по наличию воспалительной склеротических изменений, липоматоза Это не И амилоилоза. согласуется с литературными данными о высокой распространенности этих патологий при старении (Saisho Y. et al., 2007, Zeyda M., Stulnig T. M., 2009). Так, например, считается, что ПЖ с возрастом становится более плотной за счет склеротических изменений стромы. Эти изменения преобладают в хвостовой части железы, что связано с худшими условиями ее кровоснабжения (Кронрод Б.А., 1962). Интересно, что при этом в хвостовой части ПЖ содержание эндокринной составляющей выше по сравнению с другими отделами (Каган И.И. и др., 2004; Ульяновская С.А., 2015). Несоответствие между данными настоящего исследования и данными литературы можно объяснить тем, что из исследования возрастных изменений были исключены случаи нарушения углеводного обмена.

При СД обоих типов возникает целый комплекс изменений, затрагивающий обе части ПЖ (Waguri M. et al., 1995; Gaglia J.L. et al., 2011). Обнаруженные гистологические изменения в ПЖ больных СД1 такие как выраженная воспалительная реакция являются характерными и неоднократно описанными (Foulis A.K., Stewart J.A., 1984; Waguri M. et al., 1995; Gaglia J.L. et al., 2011). B нашей работе ни в одном из образцов не было выявлено картины инсулита. Однако в 3 случаях из 5 была выявлена выраженная воспалительная реакция в экзокринной части, причем в 2 случаях В-клетки в эндокринной части практически не выявлялись. Следовательно, эту реакцию сложно считать направленной только против инсулин-содержащих клеток. Воспалительная реакция в экзокринной части ПЖ больных с разной длительностью СД1 была выявлена и другими авторами, например, при проведении национального исследования СД1 в Японии (Waguri M. et al., 1995). Это позволило авторам даже высказать предположение о принципиальном отличии протекания СД1 у японцев по отношению к представителям белой расы. Наибольший вклад в развитие обнаруженной нами реакции вносили CD16+ и CD25+ клетки. CD16 является антигеном NK-клеток и клеток миеломоноцитарного происхождения. Кроме того **CD16** рецептором антитело-зависимой клеточной также является при

цитотоксичности и клеток, экспрессирующих интерлейкин-2. CD25 является маркером лимфоцитарной активации и рецептором фактора роста Т-клеток. Он экспрессируется в активированных Т- и В- лимфоцитах, а по некоторым источникам - в NK-клетках и макрофагах. Присутствие клеток, позитивных к CD71, свидетельствует о том, что в воспалительной реакции участвуют клетки, прошедшие недавно пролиферацию. В формировании наблюдавшейся реакции Т-(CD8+)- и В-лимфоциты (CD20) принимали незначительное участие. Таким образом, в обнаруженной реакции ведущую роль, по всей видимости, играют активированные цитотоксические Т-лимфоциты и NK-клетки, что соответствует литературным данным (Mellanby R.J. et al., 2009; Moberg L. et al., 2005).

Несмотря на теорию об аутоиммунном происхождении СД1, ряд авторов указывает на связь хронического панкреатита с развитием этого заболевания. В ряде исследований было выявлено, что нарушение экзокринной функции ПЖ – это характерная черта СД1. Известно, что у 20-30% больных хроническим панкреатитом развивается панкреатогенный диабет, ЧТО обусловливает необходимость дальнейшего взаимодействия изучения эндокринной экзокринной частей ПЖ (Хронический панкреатит, Маев И.В и др., Москва, ВУМНЦ, 2003; Яглов В.В., Михайлюк И. А., Яглова Н.В., 2013). Еще одним свидетельством того, что обе части ПЖ взаимосвязаны является то, что одним из факторов риска развития СД2 является ожирение, особенно абдоминального типа, для которого характерен липоматоз ПЖ (Аметов А.С., Грановская-Цветкова А.М., Казей Н.С., 1995), что подтверждается и в настоящем исследовании.

Другим примером влияния на эндокринную часть ПЖ состояния других систем организма является поражение периферической нервной системы при СД1. Согласно многим исследованиям, первой мишенью при аутоиммунной атаке при СД1 являются структуры нервной системы (нейроны, нервные волокна, глиальные клетки) (Saravia F. and Homo-Delarche F., 2003; Tsui H. et al., 2003; Winer S. et al, 2003; Persson-Sjögren S., Zashihin A., and Forsgren S., 2005; Mundinger T.O. et al., 2016). Традиционный подход к механизму возникновения нейропатий заключается в том, что гипергликемия вызывает поражение нервов

(Балаболкин М. И., Клебанова Е. М., Креминская В. М, 2005). Однако по мнению ряда исследователей, первым звеном в цепи патологических процессов при диабете являются нарушения в работе расположенных в поджелудочной железе нервных окончаний (Homo-Delarche F., 2004; Saravia F. and Homo-Delarche F., 2003; Vinik A.I., Anandacoomaraswamy D., Ullal J., 2005; Winer S. et al, 2003).

В нашем исследовании было показано, что у взрослых людей с СД1 сокращается количество нервных волокон, выявляемых с помощью ИГХ реакций на нейральные маркеры. Это может быть связано с тем, что при развитии СД1 на начальном этапе происходит аутоиммунизация белками нервной системы (которая может быть вызвана разными факторами). В результате этого лимфоциты могут атаковать эндокринные клетки, которые вырабатывают белки характерные для нервной системы (см. обзор литературы). В поддержку этой гипотезы свидетельствует то, что в сыворотке крови детей с СД1 был зафиксирован повышенный уровень аутоантител к нейрональным белками S100, GFAP, MBP и NGF как при манифестации, так и при продолжительном СД1 (Лотош Н.Ю. и др., 2012; Лотош Н.Ю., 2015). Таким образом, структурные изменения периферических нервов происходят уже на стадии манифестации сахарного диабета и продолжаются с течением времени. Было установлено, что субклинические признаки дистальной полинейропатии встречаются с высокой частотой (более 70 %) на самых ранних стадиях заболевания СД1, в том числе на стадиях нарушения толерантности к глюкозе и манифестации. С началом инсулинотерапии часть нейрофизиологических показателей нормализуются, однако, некоторые из них не зависят от степени компенсации углеводного обмена. То есть, было установлено, что дистальная полинейропатия развивается одновременно с диабетом и не все нейрофизиологические показатели зависят углеводного обмена СД1 (Лотош Н.Ю. и др., 2012; Лотош Н.Ю., 2015). Кроме этого, на модели экспериментального диабета был зафиксирован подъём аутоантител (в сыворотке крови крыс) к нейрональным белкам S100, GFAP, MBP и NGF одновременно с появлением аутоантител к инсулину (Лотош Н.Ю. и др., 2013; Лотош Н.Ю., 2015). Это может свидетельствовать TOM,

патогенетических процесса – гибель В-клеток и клеток нервной системы – идут одновременно. Эти данные согласуются с данными, полученными в настоящей работе, об уменьшении экспрессии NSE в эндокринных клетках при СД1 (см.выше).

Рассмотрим на примере нервной системы возможность влияния других систем организма на пластичность эндокринной части ПЖ более подробно. Как уже отмечалось выше, иннервация ПЖ вызывает в настоящее время пристальный интерес в связи с ролью в возникновении целого ряда заболеваний. В то же время относительно мало известно о динамике иннервации в развитии человека и при различных заболеваниях. Малоизученной остается и тонкая иннервация островков (Amella C. et al., 2008).

В целом, данные полученные нами о динамике развития иннервации ПЖ человека совпадают с данными литературы (Кривова Ю.С., 2010; Amella C. et al., 2008). В том числе они согласуются с данными Кривовой Ю.С. (2010), полученными при использовании других нейральных маркеров (SNAP-25, NCAM, периферин и нейрон-специфический β-III тубулин) и дополняют их. Надо отметить, что оба использованных нами антитела (к NSE и S-100) являются функциональными маркерами клеток. Таким образом, можно предположить, что в структурах нервной системы ПЖ человека, начиная уже с префетального периода, происходят интенсивные метаболические процессы. Полученные данные также подтверждают, что структуры нервного аппарата ПЖ человека в плодном периоде расположены блее плотно, чем у взрослого человека (Кривова Ю. С., 2010). Целым рядом авторов получены сходные данные об иннервации на 8-40 неделе гестационного развития для других внутренних органов человека: легких (Wharton J. et al., 1981), почек (Tiniakos D. et al., 2004) и печени (Tiniakos D. et al., 2008). Наблюдаемые различия между нервным аппаратом ПЖ плодов и взрослых людей могут иметь функциональное значение для морфогенеза.

Иннервация островков Лангерганса начинает формироваться с 14 нед. гр. Это отличается от данных полученных на грызунах, у которых (мыши, монгольские песчанки, хомяки), согласно данным литературы, иннервация

панкреатических островков формируется в первые недели после рождения (Gegrell L., 1975; Thomas N.W. and Findlay J.A., 1978; Burris R. and Hebrok M., 2007). Возможно, это связано с различиями в морфогенезе островков ПЖ у людей и грызунов. Согласно данным литературы, островки человека иннервированы гораздо меньше, чем островки у других исследованных животных (Кривова Ю.С., 2010; Fink T. et al., 1994; Castorina S., Romeo R., Marcello M.F., 1996; Pour P.M. and Saruc M., 2011; Rodriguez-Diaz et al., 2011).

Кроме этого в ПЖ разных видов позвоночных, включая человека, была выявлена тесная интеграция структур нервной и эндокринной эндокринные клетки панкреатических островков и структуры нервной системы (нервные волокна, тела нейронов, глиальные клетки) объединены сложноорганизованные комплексы, которые были названы нейро-инсулярными (Кривова Ю.С., 2007; Persson-Sjögren S., Zashihin A., Forsgren S., 2001; Sunami E. et al., 2001; Burris R. and Hebrok M., 2007; Pour P.M. and Saruc M, 2011). В ПЖ людей как в пре- (начиная с 14 нед. гр), так и в постнатальном развитии были выявлены НИК обоих типов. В исследовании было подтверждено, что количество и разнообразие форм нейроэндокринных комплексов у плодов человека значительно превосходит взрослых людей (Кривова Ю.С., 2010). В ПЖ человека на разных сроках развития были выявлены как различные типы этих комплексов, так и их смешанные и переходные формы. При этом существующая классификация НИК (Böck P., 1986), приведенная в литературном обзоре, оказалась неполной. Она не включает в себя целый ряд вариантов, выявленных в пренатальном развитии ПЖ человека. Уже в раннефетальном периоде удалось выявить НИК I (единичные инсулин- или глюкагоносодержащие клетки в ганглии, ганглий ассоциированный с островком) и II типа: (единичные эндокринные клетки в нерве, нервные окончания, подходящие как к одиночным эндокринным клеткам, так и островкам) и создать их 3D-реконструкции. Анализ трехмерных реконструкций позволил впервые показать ганглии ассоциированные сразу с двумя островками, островки ассоциированные одновременно с 2 ганглиями и НИК смешанного типа. В среднефетальном периоде также были

выявлены НИК "переходного" типа, представляющие собой ганглий, от которого отходит нерв к расположенному рядом островку. Трехмерный анализ позволил выявить, что от одного ганглия могут отходить сразу несколько нервов к нескольким разным островкам. Такие комплексы были выявлены ранее Кривовой Ю.С. (2010) в ПЖ нутрии, для человека они еще не были описаны. Таким образом, в развивающейся ПЖ человека образуется густая сеть, в которой структуры нервной системы связаны с островками Лангерганса. Наибольшее количество нейро-инсулярных комплексов выявлено в плодном периоде, во время активного морфогенеза островков, у взрослых людей их количество достоверно снижено. Функциональная роль нейроэндокринных комплексов до конца не ясна (Persson-Sjögren S., Zashihin A., Forsgren S., 2001). В настоящее время повсеместно принимается идея о регуляторной роли нервной системы в эндокринной секреции (Ahrén B., 2000). При этом предполагается, что вход от внутрипанкреатических ганглиев является потенциальным синхронизирующим механизмом. Существует ряд данных в поддержку гипотезы о функциональной взаимосвязи нервной и эндокринной систем в ПЖ. После экспериментального химического разрушения инсулин-содержащих клеток у новорожденных мышей, регенерация этих клеток сопровождалась восстановлением симпатической иннервации (Burris R. and Hebrok M., 2007). Однако, тесная связь между развивающимися островками и структурами нервной системы свидетельствует о том, что нейроэндокринные взаимодействия могут влиять не только на секрецию гормонов, но и участвовать в морфогенезе островков, предположительно за счет участия в миграции эндокринных клеток из протоков к островкам.

В нашем исследовании были подтверждены и уточнены данные Кривовой Ю.С. (2010), о том, что формирование нервного аппарата при развитии поджелудочной железы человека можно условно разделить на три этапа. В префетальном периоде нервный аппарат поджелудочной железы представлен слаборазветвленными пучками нервных волокон и нервными ганглиями. Второй нервного аппарата поджелудочной (раннеэтап развития железы среднефетальный периоды) характеризуется постепенным увеличением

плотности расположения структур нервной системы и образованием связей между ними и экзокринной и эндокринной частью железы. В раннефетальном периоде. нервные волокна постепенно разветвляются, появляются нервные волокна и нервные ганглии, локализованные между ацинусами, начинает формироваться сеть тонких нервных волокон, а также формируются НИК. В позднефетальном периоде при увеличении размеров поджелудочной железы распределение структур нервной системы (нервных волокон, нервных ганглиев, паренхиматозной сети тонких нервных волокон) становиться более разреженным. НИК І встречаются редко, в то время как плотность распределения НИК ІІ возрастает. Таким образом, иннервация ПЖ в этом периоде развития постепенно становится сходной по распределению структур нервной системы в ткани железы с иннервацией ПЖ взрослых людей. Это исследование подтверждает предположение о том, что морфогенез НИК является динамическим процессом. Понимание роли НИК в становлении клеточной архитектуры островков и их развитии может привести к новым подходам к пониманию механизмов и лечению сахарного диабета.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании показано, что эндокринная часть ПЖ человека характеризуется пластичностью, которая проявляется в распределении основных типов структурной организации эндокринной части, размере и форме островков, соотношении основных гормон-содержащих клеток, их иммуногистохимического профиля, а также в васкуляризации и иннервации.

Эндокринная часть поджелудочной железы человека имеет несколько форм структурной организации: одиночные эндокринные клетки (были выявлены с 10 нед. гр), расположенные в ацинусах или среди клеток протоков; небольшие кластеры эндокринных клеток (с 11 нед. гр); островки диаметром от 50 до 100 мкм, имеющие плащевой тип строения (с 12 нед. гр); биполярные островки (у взрослых людей не выявлены, а в пренатальном развитии появляются на сроке 14 нед. гр); смешанные (зрелые, мозаичные) островки Лангерганса размером больше 100 мкм (с 25 нед гр). Эти формы не сменяют друг друга, а существуют одновременно, появляясь по мере развития ПЖ. В процессе развития эндокринной части ПЖ наблюдается рекапитуляция филогенеза. Таким образом, пластичность эндокринной части ПЖ в развитии человека ограничена факторами гисто- и органогенеза.

В пренатальном развитии человека выявлено изменение как абсолютного, так и относительного количества разных типов организации эндокринной части и их клеточного состава, сопровождающиеся в пре-, ранне- и среднефетальном периодах гетерохронностью созревания в разных частях ПЖ. У взрослых людей, не страдавших нарушениями углеводного обмена, основной вклад в продукцию инсулина вносят островки диаметром от 40 до 100 мкм (т.е. островки плащевого типа). Возрастные изменения ПЖ человека связаны в пожилом и старческом возрасте прежде всего с увеличением количества островков Лангерганса на единицу площади. Для сахарного диабета 1 типа наиболее характерными изменениями являются наличие воспалительного процесса В ткани

поджелудочной железы и уменьшение количества островков, с сопутствующим снижением выявляемых А- и В-клеток. Для сахарного диабета 2 типа наиболее характерными являются избыточное накопление жировой ткани в поджелудочной железе и амилоида в островках Лангерганса и увеличение количества островков на единицу площади. Относительное количество крупных островков возрастает как при старении, так и при сахарном диабете обоих типов и диабетической фетопатии.

Островки Лангерганса являются структурами со своими особенностями развития, роста, цитоархитектуры, кровоснабжения и иннервации, характерными для разных видов. Распределение и количество А-, В- и D-клеток в ПЖ человека зависит от размера островка и его васкуляризации. Островки плащевого типа у человека имеют достаточно скудную васкуляризацию. Смешанные островки Лангерганса обладают выраженной упорядоченной структурой и гораздо более васкуляризованы. В составе такого островка, окруженного соединительнотканной капсулой, были выявлены дольки, ограниченные кровеносными сосудами. В-клеток, Сердцевину долек составляет массив на периферии непосредственной близости с кровеносными сосудами находятся А- и D-клетки. Это позволило создать оригинальную схему морфогенеза смешанных островков у человека взрослых людей. В наиболее крупных островках относительное количество глюкагон- и соматостатин-содержащих клеток, что объясняет изменение соотношения эндокринных клеток разных видов при старении и нарушениях углеводного обмена, отмеченное разными авторами.

В то же время, источники происхождения новых клеток для роста островков и возобновления их популяции неизвестны. В последнее время наряду с гипотезами о репликации В-клеток и неогенезе островков из прогениторных стволовых клеток, активно обсуждается гипотеза о возможной дедифференцировке части инсулин-содержащих клеток в глюкагон-содержащие и об обратной трансформации, что может являться новым источником новых подходов к терапии СД. В ПЖ человека была обнаружена колокализация инсулина и глюкагона, что является анцестральным признаком. Число таких

клеток у взрослого человека невелико. Однако, они были обнаружены и при СД1. Также получены клинические и морфологические данные о возможности сохранения или восстановления продукции инсулина у людей, длительное время страдавших СД1. Возможно, именно клетки, содержащие одновременно инсулин и глюкагон, играют роль в этих процессах.

Эндокринные клетки могут различаться не только по секретируемым гормонам, но и по другим, содержащимся в них, веществам. Например, NSE - содержащие клетки были обнаружены в эндокринной части ПЖ, начиная с 12 нед.гр. Полученные данные позволяют предположить, что NSE может быть полезна в качестве маркера функциональной активности элементов нервной и эндокринной систем в поджелудочной железе человека и играет важную роль в патогенезе диабета.

Начиная с раннефетального периода развития, в островках Лангерганса поджелудочной железы человека были выявлены два вида S100-позитивных клеток, которые различаются по своему строению. Клетки, расположенные на периферии островков, имеют длинные отростки и небольшое тело. Клетки, расположенные внутри островка, не отличаются по своему строению от эндокринных клеток. Возможно, два вида S100+клеток играют роль как в морфогенезе островков, так и в регуляции выброса гормонов эндокринными клетками.

В ПЖ человека обнаружена тесная интеграция структур нервной и эндокринной систем. Используя иммуногистохимическое окрашивание к паннейральным маркерам, нервы и ганглии в ПЖ человека выявлены, начиная с 10 нед гр. Иннервация островков показана, начиная с 14 нед. гр. Анализ иннервации островков позволил выявить в ПЖ плодов многочисленные НИК, число которых сокращается у взрослых. Наибольшая плотность НИК была обнаружена в плодном периоде, во время формирования активного морфогенеза островков. Удалось выявить несколько разных типов НИК, при этом они связаны между собой нервными волокнами, образуя в плодном периоде разветвленную сеть в ПЖ человека. Обнаруженная тесная связь островков со структурами нервной системы

предполагает также участие нейро-инсулярных комплексов в морфогенезе эндокринной части ПЖ.

Таким образом, в проведенном исследовании было показано, что эндокринная часть поджелудочной железы обладает пластичностью, которая проявляется в процессе развития, при старении и нарушениях углеводного обмена в изменении плотности распределения разных форм ее структурной организации и их соотношения, а также в изменении клеточного состава панреатических островков.

ВЫВОДЫ

- 1. Эндокринная часть поджелудочной железы человека на разных этапах развития органа имеет несколько форм структурной организации: одиночные эндокринные клетки (появляются с 10 нед.); небольшие кластеры эндокринных клеток (с 11 нед.); островки диаметром от 50 до 100 мкм, имеющие плащевой тип строения (с 12 нед.); биполярные островки (в пренатальном развитии появляются на сроке 14 нед., а у взрослых людей не выявлены); смешанные островки Лангерганса размером свыше 100 мкм (с 25 нед.). Основные формы организации эндокринной части не сменяют друг друга, а, появляясь по мере развития поджелудочной железы, в дальнейшем существуют одновременно.
- 2. Распределение и количество A-, B- и D-клеток в островках Лангерганса у человека зависит от размера островков и их васкуляризации. Смешанные островки Лангерганса имеют выраженную упорядоченную структуру. В составе таких островков, окруженных соединительнотканной капсулой, выявлены дольки, отграниченные кровеносными сосудами. Центральную часть долек составляет скопление В-клеток, на периферии и вокруг кровеносных капилляров локализованы А- и D- клетки.
- 3. Во все изученные сроки развития поджелудочной железы человека выявлены клетки с колокализацией инсулина и глюкагона (АВ-клетки). Эти клетки обнаружены в том числе и в смешанных островках. Наибольшое количество таких клеток встречается в пре- и раннефетальном периодах развития, что позволяет отнести данный признак к анцестральным.
- 4. В пренатальном онтогенезе у человека количество небольших островков и кластеров эндокринных клеток с диаметром от 40 до 55 мкм постепенно снижается, при этом увеличивается количество средних (диаметром от 55 до 100 мкм) и крупных (диаметром свыше 100 мкм) островков. У взрослых людей, не страдавших нарушениями углеводного обмена, по числу островков и по площади преобладают островки диаметром меньше 100 мкм (т.е. плащевого типа).

- 5. Отношение D-клеток к общему числу инсулин- и соматостатин- содержащих клеток статистически значимо уменьшается у взрослых людей по сравнению с плодным периодом развития. Этот процесс происходит поэтапно: наибольшее содержание D-клеток в различных формах структурной организации эндокринной части поджелудочной железы (одиночные клетки, кластеры, плащевые и биполярные островки) было выявлено в раннефетальном периоде.
- 6. Иннервация островков поджелудочной железы человека обнаружена, начиная с 14 нед. Установлена интеграция структур нервной и эндокринной систем, представленная нейроинсулярными комплексами I и II типов. Выявлены как различные подтипы этих комплексов, так и их смешанные и переходные формы. Нейроинсулярные комплексы связаны между собой и образуют в плодном периоде разветвленную сеть в поджелудочной железе человека. Наибольшая плотность этих комплексов выявлена в плодном периоде, во время активного морфогенеза островков, а у взрослых людей она значимо снижена.
- 7. Начиная с раннефетального периода развития, в островках Лангерганса обнаружены два вида S100-позитивных клеток, которые различаются по строению. Клетки, расположенные на периферии островков, имеют длинные отростки и являются частью нейроинсулярных комплексов. Более крупные клетки, расположенные внутри островка, не отличаются по своему строению от эндокринных клеток.
- 8. Возрастные изменения эндокринной части поджелудочной железы человека в пожилом и старческом возрасте сопровождаются увеличением плотности распределения островков Лангерганса. Относительное количество смешанных островков диаметром больше 200 мкм к общему числу возрастает как при старении, так и при сахарном диабете обоих типов.
- 9. При длительном течении сахарного диабета 1 типа характерным является снижение секреции инсулина и глюкагона, при этом у части пациентов сохраняются или восстанавливаются клетки, которые способны секретировать инсулин.

10. Пластичность эндокринной части поджелудочной железы человека проявляется в процессе развития, при старении и нарушениях углеводного обмена в изменении плотности распределения разных форм ее структурной организации и их соотношения, а также в изменении клеточного состава панреатических островков.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Взр – взрослые люди

КТ – комнатная температура

ИГХ реакции - иммуногистохимические реакции

нед. гр - неделя(и) гестационного развития

НИК - нейро-инсулярный комплекс

ПЖ - поджелудочная железа

ПрФп – префетальный период развития человека

ПФп – позднефетальный период развития человека

РФп – раннефетальный период развития человека

СД - сахарный диабет

СД1 - сахарный диабет 1 типа

СД2 - сахарный диабет 2 типа

СрФп – среднефетальный период развития человека

CD - кластер дифференцировки

GFAP - глиальный фибрилярный кислый белок

МВР - основной белок миелина

NGF-r - рецептор к фактору роста нервов р75

NSE - нейронспецифическая енолаза

PCNA – ядерный антиген клеточной пролиферации

РМР-22 - периферический белок к миелину

S100 - белок S100

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Акмаев И.Г. Нейроиммуноэндокринные аспекты патогенеза сахарного диабета. / И.Г. Акмаев / / Сахарный диабет. 2005. №3. С. 8-12.
- 2. Аметов А.С. Инсулиннезависимый сахарный диабет: Основы патогенеза и терапии. / А.С. Аметов, А.М. Грановская–Цветкова, Н.С. Казей. М.: Российская медицинская академия Минздрава России, 1995. 64 с.
- Аметов А.С. Роль бета-клеток в регуляции гомеостаза глюкозы в норме и при сахарном диабете 2 типа. / А.С. Аметов // Сахарный диабет. – 2008. – №4. – С. 6-11.
- 4. Балаболкин М. И. Диабетология / М. И. Балаболкин. М. : Медицина, 2000. 672 с.
- 5. Балаболкин М. И. Лечение сахарного диабета и его осложнений: Учеб. Пособие. / М. И. Балаболкин, Е. М. Клебанова, В. М. Креминская. М.: ОАО «Издательство «Медицина»», 2005. 512 с.
- Баринова И.В. Диабетическая фетопатия при аутоиммунной гемолитической анемии беременной осложненной стероидным диабетом. / И.В. Баринова, Ю.С. Кривова, В.М. Барабанов, С.В. Савельев, В.А. Петрухин, Ф.Ф. Бурумкулова, Н.В. Шидловская // Архив патологии. 2010. Т. 72, № 1. С. 39-40.
- 7. Башкин А.Д. Развитие нервного аппарата поджелудочной железы человека в пренатальном онтогенезе. / А.Д. Башкин // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 1988. Т. 94, №2. С. 13–18.
- 8. Беттихер О.А. Исходы индуцированных родов у пациенток с гестационным сахарным диабетом. / О.А.Беттихер, И.Е.Зазерская, П.В. Попова, В.Н. Кустаров// Сахарный диабет. 2016. Т.19, №2. С. 158-163.
- 9. Бойко Ю. Г. Возрастная морфометрическая характеристика поджелудочной железы человека / Ю. Г. Бойко, Н. И. Прокопчик // Архив

- анатомии, гистологии и эмбриологии. 1987. Т. XCIII, № 12. С. 79–81.
- 10. Бобрик И. И. Дифференцировка панкреатических эндокриноцитов у человека в эмбриогенезе / И. И. Бобрик, Л. М. Давиденко // Морфология. 1991. Т. 100, вып. 2. С. 42—48.
- 11. Биохимия мозга. / Под ред. Ашмарина И. П., Стукалова П. В., Ещенко Н. Д. СПб.: Издательствр С.-Петербургского университета, 1999. –325 с.
- 12. Внутриутробное развитие человека. Руководство для врачей. / Под ред. Милованова А.П., Савельева С.В. М.: МДВ, 2006. 384 с.
- 13. Глущенко И. Л. Морфометрическая характеристика поджелудочной железы человека в эмбриогенезе : автореф. дис. ... канд. мед. наук / И. Л. Глущенко. Тюмень, 2004. 24 с.
- 14. Гржибовский А.М. Анализ трех и более групп независимых групп количественных данных. /А.М. Гржибовский // Экология человека. 2008.
 №3. С. 50-58.
- 15. Давиденко Л. М. Морфогенез поджелудочной железы человека в пренатальном периоде : доклады Конгресса Ассоциации морфологов, Тюмень, 1994 / Л. М. Давиденко // Морфология. 1993. Т. 105, № 9–10. С. 69–70.
- 16. Давиденко Л. М. Последовательность дифференцировки эндокриноцитов поджелудочной железы человека в пренатальном периоде развития : тезисы докладов 3 Конгресса Международной Ассоциации морфологов, Тверь, 20–21 июня, 1996 / Л. М. Давиденко // Морфология. 1996. Т. 109, № 2. С. 47.
- 17. Дедов И.И. Современные аспекты трансплантации островков поджелудочной железы при сахарном диабете. / И.И. Дедов, М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова // Сахарный диабет. 2004. №2. С. 34-41.
- 18. Дедов И. И. Становление, развитие и перспективы диабетологической службы в РФ. / И. И. Дедов, М. В. Шестакова // в Сахарный диабет: диагностика, лечение, профилактика. Под редакцией Дедова И. И. и Шестаковой М. В., МИА, Москва, 2011. 808 с., С. 20-25.

- 19. Дедов И.И. Современные возможности применения стволовых клеток при сахарном диабете. / И.И. Дедов, И.А. Лисуков, Д.Н. Лаптев // Сахарный диабет. 2014. №2. С. 20–28.
- 20. Дедов И.И. Государственный регистр сахарного диабета в Российской Федерации: статус 2014 г. и перспективы развития / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, О.К. Викулова // Сахарный диабет. 2015. Т. 18, № 3. С. 5–23.
- 21. Дедов И.И. Сахарный диабет как экономическая проблема в Российской Федерации. / И.И. Дедов, В.В. Омельяновский, М.В. Шестакова, М.В. Авксентьева, В.И. Игнатьева // Сахарный диабет. 2016. Т.19, №1 С. 30-43.
- 22. Дилекова О.В. Цитоархитектоника эндокриноцитов поджелудочной железы крупного рогатого скота в постнатальном онтогенезе / О.В. Дилекова // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 3. С. 542-549.
- 23. Елецкий Ю.К. Эволюция структурной организации эндокринной части поджелудочной железы позвоночных / Ю.К. Елецкий, В.В. Яглов. М.: Наука, 1978. 165 с.
- 24. Есаян Р.М. Роль компенсации углеводного обмена у беременных с сахарным диабетом 1типа в развитии перинатальных осложнений. / Р.М. Есаян, О.Р. Григорян, Е.В. Пекарева// Сахарный диабет. 2009. № 3. С. 23–27.
- 25. Жаботинский Ю.М. Нормальная и патологическая морфология вегетативных ганглиев. / Ю.М. Жаботинский. М.: АМН СССР, 1953. 291 с.
- Каган И. И. Поджелудочная железа: микрохирургическая и компьютерно–томографическая анатомия / И. И. Каган, Л. М. Железнов. М.: Медицина, 2004. 152 с.

- 27. Калигин М. С. Клетки-мишени фактора стволовых клеток во внутренних органах человека в ходе онтогенеза : автореф. дис. ... канд. мед. наук / М. С. Калигин. Казань, 2009. 24 с.
- 28. Калигин М.С. С-kit маркер стволовых клеток эндокриноцитов поджелудочной железы человека / М.С. Калигин, А.А. Гумерова, М.А. Титова, Д.И. Андреева, Э.И. Шарипова, А.И. Кипсов // Морфология. 2011. Т. 140, № 4. С. 32–37.
- 29. Кривова Ю.С. Иммуногистохимическое исследование нейроэндокринных взаимодействий в поджелудочной железе нутрии. / Кривова Ю.С., Барабанов В.М., Савельев С.В. // Морфология. 2008. Т. 133, №2. С.68-69.
- 30. Кривова Ю. С. Морфогенез нейроэндокринного аппарата поджелудочной железы человека. : автореф. дисс. ... канд. биол. наук / Ю.С. Кривова. Москва, 2010. 27 с.
- 31. Кронрод Б.А. К вопросу об изменениях поджелудочной железы у лиц пожилого возраста. / Б.А. Кронрод // Труды. Душанбе, 1962. –№2. С.79–99.
- 32. Крыжановский Г.Н. Пластичность. Г.Н. Крыжановский в Дизрегуляционная патология: Руководство для врачей и биологов. Под редакцией Крыжановский Г.Н., М.:"Медицина", 2002. 632 с., С. 36-37.
- 33. Инвитро диагностика. Лабораторная диагностика./ Под ред. Кондрашевой Е. А., Островского А. Ю., Юрасова В. В. М.: Медиздат, 2007. 560 с.
- 34. Молдавская А.А. Современные тенденции в изучении морфологии поджелудочной железы в эмбриогенезе. / А.А. Молдавская, А.В. Савищев // Фундаментальные исследования. 2011. №5. С. 211-217.
- 35. Лотош Н.Ю., Линева О.А., Волков И.Э., Муталова З.М., Савельев С.В., Селищева А.А. Дистальная полинейропатия у детей с сахарным диабетом 1-го типа // Журнал неврологии и психиатрии им.С.С.Корсакова. 2012. № 1. С. 26-30
- 36. Лотош Н.Ю., Савельева Е.К., Селищева А.А., Савельев С.В. Аутоантитела

- к нейроспецифичным белкам S100, GFAP, MBP и NGF в сыворотке крови крыс с диабетом, индуцированным введением стрептозотоцина // Бюллетень Экспериментальной биологии и медицины. 2013. Т. 155, № 1. С. 55-58
- 37. Лотош Н. Ю. «Маркеры, характеризующие гликемический статус и развитие нейрональных нарушений у пациентов с сахарным диабетом 1-го типа» : автореф. дисс. ... канд. биол. наук / Н.Ю. Лотош Москва, 2015. 25 с.
- 38. Можейко Л.А. Цитофункциональные особенности периинсулярных и телеинсулярных ацинусов поджелудочной железы в условиях ахолии. / Л.А. Можейко // Журнал ГрГМУ. 2006. №3. С. 37-39.
- 39. Можейко Л.А. О гетерогенности экзокринного отдела поджелудочной железы и его физиологических резервах. / Л.А. Можейко // Журнал ГрГМУ. 2009. №4. С. 66-69.
- 40. Один В. И. Аутоиммунный сахарный диабет. / В. И. Один СПб.:ВМедА, 2003. 267c.
- 41. Патракеева Е.М. В поисках феномена Сомоджи. / Е.М. Патракеева, К.А. Соловьева, Н.С. Новоселова, А.Г. Залевская // Сахарный диабет. 2016. Т.19, №1 С. 80-88.
- 42. Первушин В.Ю. Сопоставление развития нервного аппарата и паренхиматозных элементов поджелудочной железы человека в эмбриогенезе. / В.Ю. Первушин, Н.П. Ставрова // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. − 1973. − Т. 65, №8. − С. 58-74.
- 43. Петтен Б. М. Эмбриология человека. / Б. М. Петтен Пер. с англ. М.: Медгиз. 1959. 183 с.
- 44. Савельев С.В. Иммуногистохимическое исследование регенерации островков поджелудочной железы человека при сахарном диабете. / С.В. Савельев, Е.В. Андреева, Н.Н. Скалецкий, Г.Н. Скалецкая, В.М. Барабанов, Е.И. Фокин. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2007. №3. С. 49-53.

- 45. Савельева Е.С. Морфологическое исследование поджелудочной железы первичноводных и наземных анамний.: автореф. дисс. ... канд. биол. наук / Е.С. Савельева. Москва, 2013. 25 с.
- 46. Саприна Т.В. Сахарный диабет 2 типа у лиц пожилого возраста решенные и нерешенные вопросы. / Т.В. Саприна, Н.М. Файзулина // Сахарный диабет. 2016. Т.19, №4 С. 322-330.
- 47. Уильямз Г. Руководство по диабету / Г. Уильямз, Д. Пикап М.: МЕДпресс-информ, 2003. 248c.
- 48. Ульяновская С.А. Закономерности морфогенеза поджелудочной железы в пренатальном и раннем постнатальном онтогенезев условиях северного региона. : автореф. дисс. ... д. мед. наук / С.А. Ульяновская Архангельск, 2015. 43 с.
- 49. Фалин Л.И. Развитие и цитодифференцировка островков Лангерганса у эмбрионов и плодов человека. В кн.: Становление эндокринных функций в зародышевом развитии / Л.И. Фалин. М.: Наука. 1966. С.58-81.
- 50. Хронический панкреатит. / И.В. Маев, А.Н. Казюлин, Д.Т. Дичева и др.// Москва, ВУМНЦ, 2003. 80 с.
- 51. Чумасов Е.И. Распределение и структурная организация автономных нервных аппаратов в поджелудочной железе крысы (иммуногистохимическое исследование). / Е. И. Чумасов, Е.С. Петрова, Коржевский Д.Е. // Морфология. 2011. Т.139, №3. С.51-58.
- 52. Юшина М.В. Особенности фетоплацентарного комплекса и прогнозирование плацентарной недостаточности у беременных с гестационным сахарным диабетом. : Дисс. канд. мед. наук. / М. В. Юшина Москва, 2008. 139 с.
 - 53. Юшков П.В. Эволюция и строение поджелудочной железы. / П.В. Юшков// в Сахарный диабет: диагностика, лечение, профилактика. Под редакцией Дедова И. И. и Шестаковой М. В., МИА, Москва, 2011 . 808 с. С. 36
 - 54. Яглов В.В. Морфология и классификация ацино-островковых клеток

- поджелудочной железы. / В.В. Яглов // Архив анатомии, гистологии, эмбриологии. 1975. Т. 69. №12. С. 20-23.
- 55. Яглов В.В. Морофология эндокринной части поджелудочной железы амфибий. / В.В. Яглов // Архив анатомии, гистологии, эмбриологии. 1976а. Т.70, №3. С. 73-78.
- 56. Яглов В.В. Морфология эндокринной части поджелудочной железы рептилий / В.В. Яглов // Архив анатомии, гистологии, эмбриологии. 1976б. Т. 71, №11. С. 89-93.
- 57. Яглов В.В. Морфология эндокринной части поджелудочной железы птиц/ В.В. Яглов // Архив анатомии, гистологии, эмбриологии. 1977а. Т. 72, №1. С. 24-27.
- 58. Яглов В.В. К сравнительной морфологии эндокринной части поджелудочной железы млекопитающих. / В.В. Яглов // Архив анатомии, гистологии, эмбриологии. 1977б. Т.72, №4. С. 83-88.
- 59.Яглов В.В. Морфология эндокринной части поджелудочной железы костистых рыб. / В.В. Яглов // Архив анатомии, гистологии, эмбриологии. 1978. Т. 74, №1. С. 111-115.
- 60. Яглов В.В. Новые концепции биологии диффузной эндокринной системы: итоги и перспективы ее изучения. / В.В. Яглов, Н.В. Яглова // Вестник РАМН. 2012. №4.- С. 74-81.
- 61. Яглов В.В. Биология диффузной эндокринной эпителиальной системы. / В.В. Яглов, И. А. Михайлюк, Н.В. Яглова Ивано-Франковск: Симфония фортэ, 2013. 168 с.
- 62. Abdulreda M.H. The Different Faces of the Pancreatic Islet. / M.H. Abdulreda, R. Rodriguez-Diaz, O. Cabrera, A. Caicedo, P.O. Berggren //Adv Exp Med Biol. 2016. Vol. 938. P. 11-24.
- 63. Accordi F. Pancreatic endocrine cells in Bufo bufo: immunocytochemistry and ultrastructure . / F. Accordi, M.A. Bracci, F.Ventola // J Anat. 1998. Vol. 192, №2. P. 195-202.
- 64. Ahren B. The mechanism of vagal nerve stimulation of glucagon and insulin

- secretion in the dog. / B. Ahren, G. Jr. Taborsky // Endocrinology. 1986. Vol. 118. P. 1551-1557.
- 65. Ahrén B. Autonomic regulation of islet hormone secretion implications for health and disease. / B. Ahren // Diabetologia. 2000. 43, №4. P. 393-410.
- 66. Ahrén B. Neuropeptides and the regulation of islet function. / B. Ahrén, N. Wierup, F. Sundler // Diabetes. 2006. Vol. 55. P. 98–107.
- 67. Ahrén B. Islet nerves in focus—defining their neurobiological and clinical role.

 / B. Ahren // Diabetologia. 2012. Vol. 55. P. 3152–3154.
- 68. Akmaev I.G. Experimental aspects of the cns-insular system. / I.G. Akmaev, A.E. Rabkina //Neurosci Behav Physiol. –1977. Vol.8, № 4. –P. 275-280.
- 69. Akmayev I.G. Ultrastuctural evidence for the existence of a direct hypothalamic-vagal descending patway. / I.G. Akmayev, O.V. Vikhreva, L.K. Konovalova// Brain Research. 1981. Vol. 209. P. 205–209.
- 70. Akmayev I.G. The origin of the hypothalamic-vagal descending patways: an experimental ultrastructural study. / I.G. Akmayev, O.V. Vikhreva, L.K. Konovalova // Brain Research. 1981. Vol. 230. P. 342–345.
- 71. Almaça J. Young capillary vessels rejuvenate aged pancreatic islets. / J. Almaça, J. Molina, E. Arrojo, R. Drigo, M.H. Abdulreda, W.B. Jeon, P.O. Berggren, A. Caicedo, H.G. Nam // Proc Natl Acad Sci U S A. − 2014. −Vol. 111, №49. −P. 17612-17617.
- 72. Amella C. Spatial and temporal dynamics of innervation during the development of fetal human pancreas. / C. Amella, F. Cappello, P. Kahl, H. Fritsch, S. Lozanoff, Sergi C. // Neuroscience. 2008. Vol. 154. P. 1477-1487.
- 73. Andrew A. An experimental investigation into the possible neural crest origin of pancreatic APUD (islet) cells. / A. Andrew // J Embryol Exp Morphol. 1976. Vol. 35, №3. P. 577-593.
- 74. Apelqvist A. Notch signaling controls pancreatic cell differentiation. / A. Apelqvist, H. Li, L. Sommer, P. Beatus, D.J. Anderson, T. Honjo, M. Hrabe de Angelis, U. Lendahl, H. Edlund // Nature. 1999. 400 (6747). P. 877-881.

- 75. Assche F. A. van The fetal endocrine pancreas. / F. A. Assche van, L. Aerts // Contrib Gynecol Obstet. −1979. − №5. − P. 44–57.
- 76. Assmann A. Growth factor control of pancreatic islet regeneration and function. / A. Assmann, Ch. Hinault, R.N. Kulkarni // Pediatr Diabetes. 2009. –Vol. 10, №1. P. 14–32.
- 77. Atkinson M.A. Perspectives Islet Cell Autoantigens in Insulin-dependent Diabetes. / M.A. Atkinson, N. K. Maclaren // Clin. Invest. 1993. Vol. 92, №10. P. 1608-1616.
- 78. Back S.H. Endoplasmic Reticulum Stress in the β-Cell Pathogenesis of Type 2 Diabetes. / S.H. Back, S.W. Kang, J. Han, H.T. Chung // Experimental Diabetes Research. 2012. 2012:618396. Режим доступа: doi:10.1155/2012/618396
- 79. Banerji M. A. Impaired beta-cell and alpha-cell function in African-American children with type 2 diabetes mellitus—"Flatbush diabetes". / M. A. Banerji // J Pediatr Endocrinol Metab. 2002. Vol. 15, Suppl 1. P. 493–501.
- 80. Beall C. The physiology and pathophysiology of the neural control of the counterregulatory response. / C. Beall, M.L. Ashford, R.J. McCrimmon // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. − 2012. − Vol. 302, №2. − P. 215-223.
- 81. Beatens D. Endocrine pancreas: three-dimensional reconstruction shows two types of islets of Langerhans. / D. Beatens, F. Malaisse-Lagae, A. Perrelet, L. Orci // Science. 1979. Vol. 206, №2444. P. 1323-1325.
- 82. Berthoud H.-R. Morphology and distribution of efferent vagal innervation of rat pancreas as revealed with anterograde transport of Dil. / H.-R. Berthoud, T.L. Powly // Brain Res. − 1991. − Vol. 553, №2. − P. 336-341.
- 83. Bernard-Kargar C. Endocrine pancreas plasticity under physiological and pathological conditions. / C. Bernard-Kargar, A. Ktorza // Diabetes. 2001. Vol. 50, Suppl 1. P. S30-35.
- 84. Blaine S.A. Adult pancreatic acinar cells give rise to ducts but not endocrine cells in response to growth factor signaling. / S.A. Blaine, K.C. Ray, R. Anunobi, M.A. Gannon, M.K. Washington, A.L. Means // Development. 2010. Vol. 137, №14. P. 2289-2296.

- 85. Bocian-Sobkowska J. Polyhormonal aspect of the endocrine cells of the human fetal pancreas / J. Bocian-Sobkowska, M. Zabel, W. Wozniak, J. Surdyk-Zasada // J. Histochemistry and Cell Biology. − 1999. − Vol. 112, , № 2. − P. 147–153.
- 86. Böck P. Fine structure of the neuro-insular complex type II in the cat. / P. Böck // Arch Histol Jpn. 1986. Vol. 49. P. 189-97.
- 87. Bock P. Development of pancreas. / P. Bock, M. Abdel-Moneim, M. Egerbacher // Microsc Res Tech. 1997. Vol. 37. P. 374-83.
- 88. Bockman D.E. Anatomy of the Pancreas. / D.E. Bockman // In The Pancreas: Biology, Pathobiology, and Disease. eds. Go VLW, DiMagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA, Scheele GA. New York: Raven Press, 1993. P. 1-8.
- 89. Bonal C. Genes controlling pancreas ontogeny. / C. Bonal, P.L. Herrera // Int J Dev Biol. 2008. Vol.52, №7. P. 823-835.
- 90. Bonner-Weir S. Morphological evidence for pancreatic polarity of beta-cell within islets of Langerhans. / S. Bonner-Weir // Diabetes. 1988. Vol. 37. P. 616–621.
- 91. Bonner-Weir S. Regulation of pancreatic beta-cell mass in vivo. / S. Bonner-Weir // Recent Prog Horm Res. 1994. Vol. 49. P. 91–104.
- 92. Bonner-Weir S. Beta-cell turnover: its assessment and implications. / S. Bonner-Weir // Diabetes. 2001. Vol. 50, Suppl 1. P. S20-24.
- 93. Bonner-Weir S. Beta-cell growth and regeneration: replication is only part of the story. / S. Bonner-Weir, W.C. Li, L. L. Ouziel-Yahalom, L. Guo, G.C. Weir, A. Sharma // Diabetes. 2010. Vol. 59, №. 10. P. 2340–2348.
- 94. Bosco D. Unique Arrangement of α- and β-Cells in Human Islets of Langerhans. / D. Bosco, M. Armanet, Ph. Morel, N. Niclauss, A. Sgroi, Y.D. Muller, L. Giovannoni, G. Parnaud, T. Berney // Diabetes. 2010. Vol. 59. P. 1202–1210.

- 95. Bouwens L. Proliferation and differentiation in the human fetal endocrine pancreas. / L. Bouwens, W.G. Lu, R. De Krijger // Diabetologia. 1997. Vol. 40. P. 398–404.
- 96. Bouwens L. Extra-insular beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas. / L Bouwens, D. G. Pipeleers // Diabetologia. 1998. №4. P. 629-633.
- 97. Brissova M. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. / M. Brissova, M.J. Flower, W.E. Nicholson, A. Chu, B. Hirshberg, D.M. Harlan, A.C. Powers // J. Histochem. Cytochem. − 2005. − Vol. 53, №9. − P. 1087–1097.
- 98. Browning K.N. Characterization of pancreas-projecting rat dorsal motor nucleus of vagus neurons. / K.N. Browning, F.H. Coleman, R.A. Travagli // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. − 2005. − Vol. 288, №5. − P. 950-955.
- Brunicardi F.C. Microcirculation of the islets of langerhans long beach veterans administration regional medical education center symposium. / F.C. Brunicardi, J.Stagner, S. BonnerWeir, H. Wayland, R. Kleinman, E. Livingston, P. Guth, M. Menger, R. McCuskey, M. Intaglietta, A. Charles, S Ashley, A. Cheung, E. Ipp, S. Gilman, T. Howard, E. Jr. Passaro // Diabetes. 1996. Vol. 45. P. 385-92.
- 100. Brunicardi F.C Neural regulation of the endocrine pancreas. / F.C. Brunicardi, D.M. Shavelle, D.K. Andersen // Int J Pancreatol. 1995. Vol.18, №3. P. 177-195.
- 101. Bunnag S.C. Microcirculation in the islets of Langerhans of the mouse. / S.C. Bunnag, S. Bunnag, N.E.Warner // Anat Rec. 1963. Vol. 146. P. 117-123.
- 102. Buono S. Morphology of pancreas of some species belonging to the genera Phelsuma and Gecko (family Gekkonidae): evidence of apoptotic process during the seasonal cycle. / S. Buono , G. Odierna, R. Putti // Anat Embryol (Berl). 2006. Vol. 211, №5. P. 413-421.

- 103. Burris R. Pancreatic innervation in mouse development and β-cell regeneration. / R. Burris, M. Hebrok // Neuroscience. 2007. Vol. 150. P. 592-602.
- 104. Butler A.E. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. / A.E. Butler, J. Janson, S. Bonner-Weir, R. Ritzel, R.A. Rizza, P.C. Butler // Diabetes. 2003. Vol. 52. P. 102–110.
- 105. Cabrera O. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. / O. Cabrera, D.M. Berman, N.S. Kenyon, C. Ricordi, P.O. Berggren, A. Caicedo // PNAS. 2006. Vol. 103, № 7. P. 2334–2339.
- 106. Cabrera-Vásquez S. Remodelling sympathetic innervation in rat pancreatic islets ontogeny. / S. Cabrera-Vásquez, V. Navarro-Tableros, C. Sánchez-Soto, G. Gutiérrez-Ospina, M. Hiriart // BMC Dev Biol. 2009. Vol. 17, № 9. Режим доступа: doi: 10.1186/1471-213X-9-34.
- 107. Carlotti F. β-Cell Generation: Can Rodent Studies Be Translated to Humans? / F. Carlotti, A. Zaldumbide, J.H. Ellenbroek, H.S. Spijker, R.C. Hoeben, E.J.de Koning // Journal of Transplantation. 2011. Режим доступа: doi:10.1155/2011/892453.
- 108. Castorina S. Immunohistochemical study of intrinsic innervation in the human pancreas. / S.Castorina, R.Romeo, M.F. Marcello // J. Biol. Res. – Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. – 1996. – Vol. 72. – P. 1-7.
- 109. Cerf M.E. Islet organogenesis, angiogenesis and innervation. / M.E. Cerf // Cell Biol Int. 2011. –Vol. 35. P. 1065- 1978.
- 110. Chandavar V.R.Immunocytochemical detection of glucagons and insulin cells in endocrine pancreas and cyclic disparity of plasma glucose in the turtle Melanochelys trijuga. / Chandavar V.R., Naik P.R. // J Biosci. − 2008. − Vol. 33, №2. − P. 239-247.
- 111. Chera S. Diabetes recovery by age-dependent conversion of pancreatic δ -cells into insulin producers. / S. Chera, D. Baronnier, L. Ghila, V. Cigliola, J.N.

- Jensen, G. Gu, K. Furuyama, F. Thorel, F.M. Gribble, F. Reimann, P.L. Herrera // Nature. 2014. Vol. 514(7523). P. 503-507.
- 112. Chen X.H. Localization of sympathetic and parasympathetic neurons innervating pancreas and spleen in the cat. / X.H. Chen, M. Itoh, W. Sun, T. Miki, Y. Takeuchi // J Auton Nerv Syst. 1996. Vol. 59, №1-2. P. 12-16.
- 113. Chhabra P. Present Accomplishments and Future Prospects of Cell-Based Therapies for Type 1 Diabetes Mellitus. / P. Chhabra, C. D. Kensinger, D.J. Moore, K. L. Brayman // In: Type 1 Diabetes Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy, ed. by D. Wagner. Shanghai: InTech. 2011. 660 p., P. 295-335. Режим доступа: http://www.intechopen.com/books/type-1-diabetes-pathogenesis-genetics-and-immunotherapy/present-accomplishments-and-future-prospects-of-cell-based-therapies-for-type-1-diabetes-mellitus
- 114. Chiu Y.C. Three-D imaging and illustration of the perfusive mouse islet sympathetic innervation and its remodelling in injury. / Y.C. Chiu, T.E. Hua, Y.Y. Fu, P.J. Pasricha, S.C. Tang // Diabetologia. 2012. Vol. 55. P. 3252-61.
- 115. Cirulli V. Expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in rat islets and its role in islet cell type segregation. / V. Cirulli, D. Beatens, U. Rutishauser, P.A. Halban, L. Orci, D.G. Rouiller // J Cell Sci. 1994. Vol. 107, №6. P. 1429-1436.
- 116. Clark A. Quantitative morphology of endocrine cells in human fetal pancreas. / A. Clark, A.M.Grant // Diabetologia. 1983. 25, №1. P. 31-35.
- 117. Clark A. Islet amyloid, increased alpha-cells, reduced beta-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. / A. Clark, C.A. Wells, I.D. Buley, J.K. Cruickshank, R.I. Vanhegan, D.R. Matthews, G.J. Cooper, R.R. Holman, R.C. Turner // Diabetes Research. –1988. Vol. 9. P. 151–159.
- 118. Coppieters K.T. Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. / K.T. Coppieters, F. Dotta, N. Amirian, P.D. Campbell, T.W.H. Kay, M.A.

- Atkinson, B.O. Roep, M.G. von Herrath // J. Exp. Med. 2009. Vol. 209, №1. P. 51-60.
- 119. Coupland R.E. The innervation of pancreas of the rat, cat and rabbit as revealed by the cholinesterase technique. / R.E. Coupland // J Anat. 1958. Vol. 92, №1. P. 143-149.
- 120. Cnop M. The long lifespan and low turnover of human islet beta cells estimated by mathematical modelling of lipofuscin accumulation. / M. Cnop, S.J. Hughes, M. Igoillo-Esteve, M.B. Hoppa, F. Sayyed, L. van de Laar, J.H. Gunter, de E.J. Koning, G.V. Walls, D.W. Gray, P.R. Johnson, B.C. Hansen, J.F. Morris, M. Pipeleers-Marichal, I. Cnop, A. Clark // Diabetologia. 2010. Vol. 53, №2. P. 321-330.
- 121. Cnop M. Longevity of human islet α- and β-cells. / M. Cnop, M. Igoillo-Esteve, S.J. Hughes, J.N. Walker, I. Cnop, A. Clark //Diabetes Obes Metab. 2011. Vol. 13, Suppl 1. P. 39-46.
- 122. De Krijger R.R. The midgestational human fetal pancreas contains cells coexpressing islet hormones. / R.R. De Krijger, H.J. Aanstoot, G. Kranenburg M. Reinhard, W.J. Visser, G.J. Bruining // Dev Biol. − 1992. − Vol. 153, №2. − P. 368-375.
- 123. Della Rosa A. The endocrine pancreas of lacertids: an immunocytochemical study of the genera Pedioplanis and Meroles. / A. Della Rosa, R. Putti // Eur J Histochem. 1995. Vol. 39, №1. P. 47-58.
- 124. Del Prato S. Beta- and alpha-cell dysfunction in type 2 diabetes. / S. Del Prato, P. Marchetti // Horm Metab Res. 2004. Vol. 36. P. 775–781.
- 125. Deng S. Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. / S. Deng, M. Vatamaniuk, X. Huang, N. Doliba, M.M. Lian, A. Frank, E. Velidedeoglu, N.M. Desai, B. Koeberlein, B. Wolf, C.F. Barker, A. Naji, F.M. Matschinsky, J.F. Markmann // Diabetes. 2004. Vol. 53. P. 624–632.

- 126. Dolenšek J. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. / J. Dolenšek, M. S. Rupnik, A. Stožer // Islets. 2015. 7:1 Режим доступа: doi: 10.1080/19382014.2015.1024405
- 127. Donato R. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. / R. Donato , G. Sorci, F. Riuzzi , C. Arcuri, R. Bianchi, F. Brozzi, C. Tubaro, I. Giambanco // Biochim Biophys Acta. − 2009. − Vol. 1793, №6. − P. 1008–1022.
- 128. Donato R. Functions of S100 proteins. / R. Donato, B.R. Cannon, G. Sorci, F. Riuzzi, K. Hsu, D.J. Weber, C.L. Geczy // Curr Mol Med. 2013. Vol. 13, №1. P. 24–57.
- 129. Donev S. Ultrastructural evidence for presence of a glial sheath investing the islets of Langerhans in the pancreas of mammals. / S. Donev // Cell Tissue Res. 1984. Vol. 237. P. 343-348.
- 130. Doniach I. Diabetes Mellitus. / I. Doniach // Pathology of the Pancreas Proc. roy, Soc. Med. 1975. V. 68. P. 255-256.
- 131. Eberhard D. The pancreatic beta-cell in the islet and organ community. /
 D. Eberhard, E. Lammert // Curr Opin Genet Dev. 2009. Vol. 19. P. 469-475.
- 132. El-Gohary Y. Three-dimensional analysis of the islet vasculature. / Y. El-Gohary, S. Sims-Lucas, N. Lath, S. Tulachan, P. Guo, X. Xiao, C. Welsh, J. Paredes, J. Wiersch, K. Prasadan, C. Shiota, G.K. Gittes // Anat Rec (Hoboken). 2012. Vol. 295. P. 1473-1481.
- 133. Esni F. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) is requires for islet cell type segregation and normal ultrastructure in pancreatic islets. / F. Esni, I.B. Taljedal, A.K. Perl, H. Cremer, G. Christofori, H. Semb // J Cell Biol. − 1999. − Vol. 144, №2. − P. 325-337.
- 134. Etayo J.C. Characterization of pancreatic endocrine cells of the European common frog Rana temporaria. / J.C. Etayo, L.M. Montuenga, P. Sesma, O. Díaz de Rada, J. Rovira, A.C. Villaro // Gen Comp Endocrinol. 2000. Vol. 117, №3. P. 366-380.

- Experimental and Other Scientific Purposes. [Convention Europeenne Sur la Protection Des Animaux Vertebres Utilises A Des Fins Experimentales Ou A D'autres Fins Scientifiques]. Strasbourg. 18. 03. 1986.
- 136. Fekete E. Different distribution of S-100 protein and glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactive cells and their relations with nitrergic neurons in the human fetal small intestine. / E. Fekete, J.P. Timmermans, B.A. Resch, D.W. Scheuermann // Histol. Histopathol. − 1999. − Vol. 14, № 3. − P. 785-790
- 137. Ferner H. Das Inselsystem des pankreas: Entwicklung, Histobiologie und Pathophysiologie mit besonderer Berucksichtigung des Diabetes mellitus. / H. Ferner // Thieme 1952
- 138. Fink T. Growth-associated protein-43 and protein gene-product 9,5 innervation in human pancreas: changes in chronic pancreatitis. / T. Fink, P. Di Sebastiano, M. Bochlerj, H.G. Beger, E. Weihe // Neuroscience. 1994. Vol. 63. P. 249-266.
- 139. Fontaine J. Analysis of entoderm formation in the avian blastoderm by use of quail-chick chimeras. The problem of the neuroectodermal origin of the cells of the APUD series. / Fontaine J., Le Douarin N. // J Embryol Exp Morphol. 1977. Vol. 41. P. 209-222.
- 140. Foulis A.K. The pancreas in recent onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: insulin content of islet, insulitis and associated changes in the exocrine acinar tissue. / A.K. Foulis, J.A. Stewart // Diabetologia. 1984. Vol. 26. P. 456-461.
- 141. Freinkel N. Of pregnancy and progeny. Diabetes 29:1023–1035, 1980
- 142. Fujita T. Histological studies on the neuro-insular complex in the pancreas of some mammals. / T. Fujita // Z Zselloforsch. 1959. Vol. 50, P. 94-109.
- 143. Fujita T. The gastro-enteric endocrine cell and its paraneuronic nature. / T. Fujita // In Chromaffin, enterochromaffin and related cells., ed. by R.E. Coupland and T. Fujita. Amsterdam: Elsiver. 1976. P. 191-208.

- 144. Fujita T. Immunohistochemical detection of nervous system-specific proteins in normal and neoplastic paraneurons in the gut and pancreas. / T. Fujita, T. Iwanaga, T. Nakajima // In: Gut peptides and ulcer. ed. Miyoshi A. Tokyo, Biomedical Research Foundation. 1983. P. 81–88.
- 145. Fujisawa M. CD-56 positive cells with or without synaptophysin expression are recognized in the pancreatic duct epithelium: a study with adult and fetal tissues and specimens from chronic pancreatitis. / M. Fujisawa, K. Notohara, C. Tsukayama, R. Mizuno, S. Okada / Acta Med. 2003. Vol. 57, P. 279-284.
- 146. Furuzawa Y. Anatomical localization of sympathetic postganglionic and sensory neurons innervating the pancreas of the cat. / Y. Furuzawa, Y. Ohmori, T. Watanabe // J Vet Med Sci. 1996. Vol. 58, №3. P. 243–248.
- 147. Gaglia J.L. Noninvasive imaging of pancreatic islet inflammation in type 1A diabetes patients. / J.L. Gaglia, A.R. Guimaraes, M. Harisinghani, S.E. Turvey, R. Jackson, C. Benoist, D. Mathis, R.Weissleder // J Clin Invest. − 2011. Vol. 121, №1. P. 442-445.
- 148. Gaidar Y. A. Distribution of N-caderin and NCAM in neurons and endocrine cells of the human embryonic and fetal gastroenteropancreatic system / Y. A. Gaidar, E. A. Lepekhin, G. A. Sheichetova // Acta-Histochem. 1998. Vol. 100, N 1. P. 83–97.
- 149. Gannon M. Persistent expression of HNF6 in islet endocrine cells causes disrupted islet architecture and loss of beta cell function. / M. Gannon, M.K. Ray, K.Van Zee, F. Rausa, R.H. Costa, C.V. Wright // Development. − 2000. − Vol. 127, №13. − P. 2883-2895.
- 150. García-Suárez O. Immunohistochemical profile of human pancreatic pacinian corpuscles. / O. García-Suárez, M.G. Calavia, F.J. Pérez-Moltó, C. Alvarez-Abad, P. Pérez-Piñera, J.M. Cobo, J.A. Vega // Pancreas. 2010. Vol. 39, №3. P. 403-10.
- 151. Gardemann A. Intraportal transplantation of pancreatic islets into livers of diabetic rats: reinnervation of islets and regulation of insulin secretion by the

- hepatic sympathetic nerves. / A. Gardemann, K. Jungermann, V. Grosse, L. Cossel, F. Wohlrab, H.J. Hahn, W. Blech, W. Hildebrandt // Diabetes. 1994. Vol. 43. P. 1345–1352.
- 152. Gannon M. Persistent expression of HNF6 in islet endocrine cells causes disrupted islet architecture and loss of beta cell function. / M. Gannon, M.K. Ray, K. Van Zee, F. Rausa, R.H. Costa, C.V. Wright // Development. 2000. Vol. 127, №13. 2883-2895.
- 153. Gegrell L. The postnatal occurrence of biogenic monoamines in pancreatic islets of golden humsters. / Gegrell L. // Acta Endocrinol (Kbh). 1975. Vol. 78, №2. P. 289-293.
- 154. Georgia S. Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass./ S. Georgia, A. Bhushan // J Clin Invest. 2004. Vol. 114. P.963-968.
- 155. Gepts W. Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus.

 / W.Gepts // Diabetes. 1965. Vol. 14, №10. P. 619-633.
- 156. Gepts W. The pancreatic islets in diabetes. / W. Gepts, P.M.Lecompte // The American journal of medicine. 1981. Vol. 70. P. 105–115.
- 157. Gianani R. Initial results of screening of nondiabetic organ donors for expression of islet autoantibodies. / R. Gianani, A. Putnam, T. Still, L. Yu, D. Miao, R.G. Gill, J. Beilke, P. Supon, A. Valentine, A. Iveson, S. Dunn, G.S. Eisenbarth, J. Hutton, P. Gottlieb, A.Wiseman // J Clin Endocrinol Metab. 2006. –Vol.91, No.5. P.1855-1861.
- 158. Gianani R. Beta cell regeneration in human pancreas. / R. Gianani //Semin Immunopathol. –2011. –Vol.33, No.1. P.23-27
- 159. Gilliam L.K. Tyraminemediated activation of sympathetic nerves inhibits insulin secretion in humans. / L.K. Gilliam, J.P. Palmer, G.J. Jr. Taborsky // J Clin Endocrinol Metab. 2007. Vol. 92. P. 4035-4038.
- 160. Gilon P. Mechanism and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic β-cell function. / P. Gilon, J.-C. Henquin // Endocr Rev. 2001. Vol. 22,№5. P. 565-604.

- 161. Girod C. Immunostaining of a cell type in the islets of Langerhans of the monkey Macaca irus by antibodies against S-100 protein. / C. Girod, N. Durand, M. Raccurt // Cell Tissue Res. 1987. Vol. 247, №1. P.11-16.
- Glaser B. Genetics of neonatal hyperinsulinism. / B. Glaser, P. Thornton,
 T. Otonkoski, C. Junien //Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal
 Edition. 2000. T. 82. №. 2. P. F79-F86.
- Gollin J. G. Effect of maternal diabetes on the fetal exocrine pancreas / J.
 G. Gollin, C. Gracia, G. Gollin // Early. Hum. Dev. 1999. Vol. 53, N 3. P.
 179–183.
- 164. Gomez Dumm C.L. Sequential morphological changes in pancreatic islets of spontaneously diabetic rats. / C.L. Gomez Dumm, M.C. Semino, J.J. Gagliardino // Pancreas. – 1990. – Vol. 5. – P. 533–539.
- 165. Gradwohl G.Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. / G. Gradwohl, A. Deirich, M. Lemeur, F. Guillemot // Proc Natl Acad Sci USA. 2000. Vol. 97, №4. P. 1607-1611.
- 166. Grapin-Botton A. Key events of pancreas formation are triggered in gut endoderm by ectopic expression of pancreatic regulatory genes. / A. Grapin-Botton, A.R. Majithia, D.A. Meltom // Genes Dev. − 2001. − Vol.15, №4. − P. 444-454.
- 167. Gregg B.E. Formation of a human beta-cell population within pancreatic islets is set early in life. / B.E. Gregg, P.C. Moore, D. Demozay, B.A. Hall, M. Li, A. Husain, A.J. Wright, M.A. Atkinson, C.J. Rhodes // J Clin Endocrinol Metab. 2012. Vol. 97. P. 3197-3206.
- 168. Gregg E.W. Changes in Diabetes-Related Complications in the United States, 1990–2010. / E.W. Gregg, Y. Li, J. Wang, N.R. Burrows, M.K. Ali, D. Rolka, D.E. Williams, L. Geiss // N Engl J Med. 2014. Vol. 370. P. 1514-1523.

- 169. Gromada J. α-Cells of the Endocrine Pancreas: 35 Years of Research but the Enigma Remains. / J. Gromada, I. Franklin, C.B. Wollheim // Endocrine Reviews. 2007. Vol. 28, №1. P. 84–116.
- 170. Halban P. A. The possible importance of contact between pancreatic islet cells for the control of insulin release. / P.A. Halban, C.B. Wollheim, B. Blondel, P. Meda, E.N. Niesor, D.H. Mintz // Endocrinology. 1982. Vol. 111. P. 86–94.
- 171. Harris M.I. Early detection of undiagnosed diabetes mellitus: a US perspective. / M.I. Harris, R.C. Eastman // Diabetes Metab Res Rev. 2000. Vol. 1. P. 230–236.
- 172. Hauge-Evans Astrid C. Somatostatin Secreted by Islet-Cells Fulfills Multiple Roles as a Paracrine Regulator of Islet Function. / A.C. Hauge-Evans, A.J. King, D. Carmignac, C.C.Richardson, I.F. Robinson, M.J. Low, M.R. Christie, Sh.J. Persaud, P.M. Jones // Diabetes. 2009. Vol. 58. P. 403-411.
- 173. Havel P.J. Activation of autonomic nerves and the adrenal medulla contributes to increased glucagon secretion during moderate insulininduced hypoglycemia in women. / P.J. Havel, B. Ahren // Diabetes. 1997. Vol. 46. P. 801-807.
- Heremans Y. Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin 3. / Y. Heremans, M.Van De Casteele, P. in't Veld, G. Gradwohl, P. Serup, O. Madsen, D. Pipeleers, H. Heimberg // J Cell Biol. 2002. Vol. 159, №2. P. 303-312.
- 175. Henseleit K.D. Nkx6 transcription factor activity is required for alpha- and beta-cell development in the pancreas. / K.D. Henseleit, S.B. Nelson, K. Kuhlbrodt, J.C. Hennings, J. Ericson, M. Sander // Development. 2005. Vol. 132, №13. P. 3139-3149.
- 176. Herrera P. L. Ablation of islet endocrine cells by targeted expression of hormone-promoter-driven toxigenes / P. L. Herrera, J. Huarte, R. Zufferey // Proc. Natl. Acad. Sci. 1994. Vol. 91. P. 12999–13003.

- 177. Honjin R. The innervation of the pancreas of the mouse, with special reference to the structure of the peripheral extension of the vegetative nervous system. / R. Honjin // J CompNeurol. 1956. Vol. 104. P. 331-371.
- 178. Hellman B. Actual distribution of the number and volume of the islets of langerhans in different size classes in non-diabetic humans of varying ages. / B. Hellman // Nature. 1959. Vol. 184. P. 1498-1499.
- 179. Hellerström C. Islet cell replication and diabetes. / C. Hellerström, I. Swenne, A. Andersson // In The Pathology of the Endocrine Pancreas in Diabetes. ed. Lefebvre P.J., Pipeleers D.G. Eds. Heidelberg, Germany, Springer-Verlag. 1988.
- 180. Henderson J.R. The pancreas as a single organ: the influence of the endocrine upon the exocrine part of the gland. / J.R. Henderson, P.M. Daniel, P.A.Fraser // Gut. 1981. Vol. 22. P. 158-67.
- 181. Henderson J.R. A morphometric study of the endocrine and exocrine capillaries of the pancreas. / J.R. Henderson, M.C. Moss // Q J Exp Physiol. 1985. Vol. 70. P. 347-356.
- 182. Homo-Delarche F. Neuroendocrine immuno-ontogeny of the pathogenesis of autoimmune disease in the nonobese diabetic (NOD) mouse. / F. Homo-Delarche // ILAR J. 2004, Vol. 45, № 3. P. 237-258.
- Höppener J.W. Islet amyloid and type 2 diabetes mellitus. / J.W. Höppener,
 B. Ahrén, C.J. Lips / / N Engl J Med. 2000. Vol.343, №6. P. 411-419.
- 184. Hornblad A. An improved protocol for optical projection tomography imaging reveals lobular heterogeneities in pancreatic islet and beta-cell mass distribution. / A. Hornblad, A. Cheddad, U. Ahlgren // Islets. 2011. Vol. 3. P. 204-208.
- 185. Hornblad A. Impaired spleen formation perturbs morphogenesis of the gastric lobe of the pancreas. / A. Hornblad, A.U. Eriksson, E. Sock, R.E. Hill, U. Ahlgren // PLoSONE. 2011. 6:e21753. Режим доступа: doi:10.1371/journal.pone.0021753

- 186. Hovsepyan M.R. Astrocytic and neuronal biochemical markers in the sera of subjects with diabetes mellitus. / M.R. Hovsepyan, M.J. Haas, A.S. Boyajyan, A.A. Guevorkyan, A.A. Mamikonyan, S.E. Myers, A.D. Mooradian // Neurosci Lett. 2004, Vol. 369, №3 P. 224-227.
- 187. IDF Diabetes Atlas. 5-th edition. Brussels, International Diabetes Foundation, 2011; 150 p.
- 188. IDF Diabetes Atlas. 6-th ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2013; 159 p.
- 189. Jahansouz C. Evolution of β-Cell Replacement Therapy in Diabetes Mellitus: Islet Cell Transplantation. / C. Jahansouz, S.C. Kumer, K.L. Brayman // Journal of Transplantation. 2011. Режим доступа: doi:10.1155/2011/247959.
- 190. Jensen J. Independent development of pancreatic α– and β–cells from neurogenin3–expressing precursors a role for the notch pathway in repression of premature differentiation / J. Jensen, R. S. Heller, T. Fundler–Nielsen // J. Diabetes. 2000. Vol. 49. P. 163–176.
- 191. Jeon J. Endocrine cell clustering during human pancreas development. / J. Jeon, M. Correa-Medina, C. Ricordi, H. Edlund, J.A. Diez // J Histochem Cytochem. 2009. Vol. 57, №9. P. 811-824.
- 192. Jo J. How noise and coupling induce bursting action potentials in pancreatic beta-cells. / J. Jo, H. Kang, M.Y. Choi, D.S. Koh. / Biophys J. 2005. Vol. 89. P. 1534–1542.
- 193. Jo J. Size distribution of mouse langerhans islets. / J. Jo, M.Y. Choi, D-S. Koh // Biophys J. 2007. Vol. 93. P. 2655-2666.
- 194. Jo J. Formation of pancreatic islets involves coordinated expansion of small islets and fission of large interconnected islet-like structures. / J. Jo, G. Kilimnik, A. Kim, C. Guo, V. Periwal, M. Hara // Biophys J. 2011. Vol. 101. P. 565-574.

- 195. Johansson M. Perinatal development of the pancreatic islet microvasculature in rats. / M. J ohansson, A. Andersson, P.-O. Carlsson, L. Jansson // J Anat. 2006. Vol. 208, №2. P. 191-196.
- 196. Johnson K.H. Islet amyloid, islet-amyloid polypeptide, and diabetes mellitus. / K.H. Johnson, T.D. O'Brien, C. Betsholtz, P. Westermark // N Engl J Med. 1989. Vol. 321. P. 513-518.
- 197. Jorgensen M.C. An illutrated review of early pancreas development in the mouse. / M.C. Jorgensen, J. Ahnfelt-Ronne, J. Hald, O.D. Madsen, P. Serup, J. Hecksher-Sorensen // Endocr Rev. 2007. Vol. 28, №6. P. 685-705.
- 198. Kaiser E. Clinical biochemistry of neuron specific enolase. / E. Kaiser, R. Kuzmits, P. Pregant, O. Burghuber, W. Worofka // Clin Chim Acta. 1989. Vol. 183, №1. P. 13-31.
- 199. Karam J.H. Insulin secretion in obesity: pseudodiabetes? / J.H. Karam, G.M. Grodsky, P.H. Forsham // Am J Clin Nutr. 1968. Vol. 21, № 12. P. 1445–1454.
- 200. Kassem S.A. Beta-cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy. / S.A. Kassem, I. Ariel, P.S. Thornton, I. Scheimberg, B. Glaser // Diabetes. 2000. Vol. 49. P. 1325-1333.
- 201. Katsuta H. Single pancreatic beta cells co-express multiple islet hormone genes in mice. / H. Katsuta, T. Akashi, R. Katsuta, M. Nagaya, D. Kim, Y. Arinobu, M. Hara, S. Bonner-Weir, A.J. Sharma, K. Akashi, G.C.Weir // Diabetologia. 2010. Vol. 53. P. 128–138.
- 202. Keenan H.A. Residual insulin production and pancreatic β-cell turnover after 50 years of diabetes: Joslin Medalist Study. / H.A. Keenan, J.K. Sun, J. Levine, A. Doria, L.P. Aiello, G. Eisenbarth, S. Bonner-Weir, G.L. King // Diabetes. 2010. Vol. 59. P. 2846-2853.
- 203. Kharouta M. No mantle formation in rodent islet the prototype of islet revisited. / M. Kharouta, K. Miller, P. Wojcik, G. Kilimnik, A. Dey, DF Steiner, M. Hara // Diabetes Res Clin Pract. 2009. Vol. 85. P. 252–257.

- 204. Kilimnik G. Altered islet composition and disproportionate loss of large islets in patients with type 2 diabetes. / G. Kilimnik, B. Zhao, J. Jo, V. Periwal, P. Witkowski, R. Misawa, M. Hara // PloS one. 2011;6:e27445.
- 205. Kilimnik G. Quantification of islet size and architecture. / G. Kilimnik, J. Jo, V. Periwal, M.C. Zielinski, M. Hara // Islets. 2012. №4. P. 167-172.
- 206. Kim J. Differential expression of GAD65 and GAD67 in human, rat, and mouse pancreatic islets. / J. Kim, W. Richter, H.J. Aanstoot, Y. Shi, Q. Fu, R. Rajotte, G. Warnock, S. Baekkeskov // Diabetes. 1993. Vol. 42, №12. P.1799-1808.
- 207. Kim A. Islet architecture a comparative study. / A. Kim, K. Miller, J. Jo, P. Wojcik, G. Kilimnik, et al. // Islets. 2009. №1. P. 129–136.
- 208. Kirchgessner A.L Innervation of the pancreas by neurons in the gut. / A.L. Kirchgessner, M.D. Gershon // J Neurosci. 1990. Vol. 10, №5. P. 1626-1642.
- 209. Kirchgessner A.L. Guinea pig pancreatic ganglia: projections, transmitter content, and the type-specific localization of monoamine oxidase. / A.L. Kirchgessner, J.E. Pintar // J Comp Neurol. − 1991. − Vol. 305, №4. − P. 613-631.
- 210. Kitagawa H. Carcinomas of the ventral and dorsal pancreas exhibit different patterns of lymphatic spread. / H. Kitagawa, T. Ohta, I. Makino, T. Tani, H. Tajima, H. Nakagawara, I. Ohnishi, H. Takamura, M. Kayahara, H. Watanabe, T. Gabata, O. Matsui, Y. Zen // Front Biosci. 2008. Vol. 13. P. 2728-2735.
- 211. Klöppel G. Islet pathology and pathogenesis of type1 and type2 diabetes mellitus revisited. / G. Klöppel, M. Löhr, K. Habich, M. Oberholzer, P. Heitz // Surv Synth Path Res. 1985. Vol. 4. P. 110–125.
- 212. Kobayashi S. Fine structure of mammalian and avian pancreatic islets with special reference to D cells and nervous elements. / S. Kobayashi, T. Fujita // Z Zellforsch Mikrosk Anat. −1969. Vol. 100, №3. P. 340-363.

- Konstantinova I. Microvascular development: learning from pancreatic islets. / I. Konstantinova, E. Lammert // BioEssays. 2004. Vol. 26. P. 1069-1075.
- 214. Ku S.K. An immunohistochemical study of the pancreatic islets of the Mongolian gerbils, Meriones unguiculatus. / S.K. Ku, H.S. Lee, K. Park, J.H. Lee // J Vet Sci. – 2001. – Vol. 2, №1. – P. 9-14.
- 215. Ku S.K. An immunohistochemical study on the pancreatic endocrine cells of the C57BL/6 Mouse. / S.K. Ku, H.S. Lee, J.H. Lee // J Vet Sci. 2002. Vol. 3, №. 4. P. 327–333.
- 216. Kushner J.A. Ductal origin hypothesis of pancreatic regeneration under attack. / J.A. Kushner, G.C. Weir, S. Bonner-Weir / Cell Metab. 2010. Vol.11, No.1. P. 2-3.
- 217. Langerhans P. Beitrage zur mikroskopischen Anatomie der Bauchspeicheldruse. /P. Langerhans// Inaugural-Dissertation. – Berlin: Lange. – 1869.
- 218. Larsson L. I. On the development of the islets of Langerhans / L. I. Larsson // Microsc. Res. Tech. 1998. Vol. 43, N 4. P. 284–291.
- 219. Lászik Z. S-100 protein immunoreactivity in human islets of Langerhans. /
 Z. Lászik, T. Krenács, E. Dobó // Acta Morphol Hung. 1989. Vol. 37, –
 №1-2. P. 117-124.
- 220. Lee J.H. An immunohistochemical study of endocrine cells in the pancreas of the Red-billied frog (Bombina orientalis). / J.H. Lee, S.K. Ku, H.S. Lee, H. Kitagawa // Eur J Histochem. 2003. Vol. 47, №2. P. 165-172.
- 221. Lewis M.P. Pancreatic blood flow and its role in the pathophysiology of pancreatitis. / M.P. Lewis, H.A. Reber, S.W. Ashley // J Surg Res. 1998. Vol.75. P. 81-89.
- 222. Levetan C.S. Unrecognized diabetes among hospitalized patients. / C.S. Levetan, M. Passaro, K. Jablonski, M. Kass, R.E. Ratner // Diabetes Care. 1998. Vol. 21. P. 246–249.

- 223. Lima M.J. Suppression of epithelial-to-mesenchymal transitioning enhances ex vivo reprogramming of human exocrine pancreatic tissue toward functional insulin-producing β-like cells. / M.J. Lima, K.R. Muir, H.M. Docherty, R. Drummond, N.W. McGowan, S. Forbes, Y. Heremans, I. Houbracken, J.A. Ross, S.J. Forbes, P. Ravassard, H. Heimberg, J. Casey, K. Docherty // Diabetes. 2013. Vol. 62. P. 2821-2833.
- 224. Lindsay T.H. A quantitative analysis of the sensory and sympathetic innervation of the mouse pancreas. / T.H. Lindsay, K.G. Halvorson, C.M. Peters, J.R. Ghilardi, M.A. Kuskowski, G.Y. Wong, P.W. Mantyh. // Neuroscience. 2006. Vol. 137, № 4. P. 1417-1426.
- 225. Liu E.H. Pancreatic beta cell function persists in many patients with chronic type 1 diabetes, but is not dramatically improved by prolonged immunosuppression and euglycaemia from a beta cell allograft. / E.H. Liu, B.J. Digon, B. Hirshberg, R. Chang, B.J. Wood, Z. Neeman, A. Kam, R.A. Wesley, S.M. Polly, R.M. Hofmann, K.I.Rother, D.M. Harlan // Diabetologia. 2009. Vol. 52. P. 1369–1380.
- 226. Love J.A. Morphology and histochemistry of the rabbit pancreatic innervation. / J.A. Love, K. Szebeni // Pancreas. 1999. Vol. 18, №1. P. 53-64.
- 227. Love J.A. Autonomic pathways regulating pancreatic exocrine secretion. / J.A. Love, E. Yi, T.G.Smith // Auton Neurosci. – 2007. – Vol. 133, №1. – P. 19-34.
- 228. Low J. Glucose principally regulates insulin secretion in mouse islets by controlling the numbers of granule fusion events per cell. / J. Low, J. Mitchell, O. Do, J. Bax, A. Rawlings, M. Zavortink, G. Morgan, R. Parton, H. Gaisano, P. Thorn // Diabetologia. 2013. –Vol. 56. P. 2629-2637.
- 229. Lucini C. An immunohistochemical study of the endocrine pancreas of duck. / C. Lucini, L. Castaldo, O. Lai // Eur J Histochem. − 1996. − Vol. 40, №1. − P. 45-52.

- MacDonald P. E. Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells. / P.
 E. MacDonald, J. W. Joseph, P. Rorsman //Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2005, V. 360 (1464) P. 2211–2225.
- 231. Marchetti P. The beta-cell in human type 2 diabetes. / P. Marchetti, R. Lupi, S. Del Guerra, M. Bugliani, L. Marselli, U. Boggi // Adv Exp Med Biol. 2010. Vol. 654. P. 501–514.
- Matveyenko A.V. Relationship between beta-cell mass and diabetes onset.
 A.V. Matveyenko, P.C. Butler // Diabetes Obes Metab. 2008. Vol. 10(Suppl). P. 23–31.
- 233. Means A.L. Pancreatic epithelial plasticity mediated by acinar cell transdifferentiation and generation of nestin-positive intermediates. / A.L. Means, I.M. Meszoely, K. Suzuki, Y. Miyamoto, A.K. Rustgi, R.J. Jr. Coffey, C.V. Wright, D.A. Stoffers, S.D. Leach // Development. 2005. Vol.132, No.16. P. 3767-3777.
- 234. Mei Q. Early, selective, and marked loss of sympathetic nerves from the islets of BioBreeder diabetic rats. / Q. Mei, T.O. Mundinger, A. Lernmark, G.J. Jr. Taborsky. // Diabetes. 2002. Vol. 51, №10. P. 2997-3002.
- 235. Meier J.J. Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. / J.J. Meier, A.E. Butler, Y. Saisho, T. Monchamp, R. Galasso, A. Bhushan, R.A. Rizza, P.C. Butler // Diabetes. 2008. Vol. 57. P. 1584-1594.
- 236. Meier J.J. Beta-cell development and turnover during prenatal life in humans. / J.J. Meier, C.U. Kohler, B. Alkhatib, C. Sergi, T. Junker, H.H. Klein, W.E. Schmidt, H. Fritsch // Eur J Endocrinol. 2010. Vol. 162. P. 559-568.
- 237. Mellanby R. J. Role of regulatory T-cells in autoimmunity / R. J. Mellanby, D. C.Thomas, J. Lamb // Clinical Science. 2009. Vol. 116. P. 639–649.
- 238. Merkwitz C. The ductal origin of structural and functional heterogeneity between pancreatic islets. / C. Merkwitz, O.W. Blaschuk, A. Schulz, P. Lochhead, J. Meister, A. Ehrlich, A.M. Ricken // Prog Histochem Cytochem. 2013. Vol. 48. P. 103-40.

- 239. Meyers M. Patterns of spread of disease from the pancreas. / M. Meyers,
 C. Charnsangavej, M. Oliphant // In: Meyers' Dynamic Radiology of the
 Abdomen. Springer New York, 2011. P. 259-274.
- 240. Mezza T. Insulin resistance alters islet morphology in nondiabetic humans.
 / T. Mezza, G. Muscogiuri, G.P. Sorice, G. Clemente, J. Hu, A. Pontecorvi, J.J. Holst, A. Giaccari, R.N. Kulkarni // Diabetes. 2014. Vol. 63. P. 994-1007.
- 241. Mezza T The regulation of pre- and post-maturational plasticity of mammalian islet cell mass. / T. Mezza, R.N.Kulkarni // Diabetologia. –2014. Vol. 57, №7. P.1291-1303.
- 242. Mikami Y. Surgical Vascular Anatomy and Histology. / Y. Mikami, A. Otsuka, M. Unno //In Diseases of the Pancreas. Eds. Beger H., Matsuno S., Cameron J., Rau B., Sunamura M., Schulick R. Springer, Berlin Heidelberg, 2008. P.19-28.
- 243. Miller K. Islet formation during the neonatal development in mice. / К. Miller, A. Kim, G. Kilimnik, J. Jo, U. Moka, V. Periwal, M. Hara// PLoS One.
 2009. 4:e7739. Режим доступа: doi:10.1371/journal.pone.0007739
- 244. Minami K. Lineage tracing and characterization of insulin-secreting cells generated from adult pancreatic acinar cells. / K. Minami, M. Okuno, K. Miyawaki, A. Okumachi, K. Ishizaki, K. Oyama, M. Kawaguchi, N. Ishizuka, T. Iwanaga, S.Seino // Proc Natl Acad Sci U S A. 2005. Vol.102, No.42. P. 15116-15121.
- 245. Minami K. Pancreatic acinar-to-beta cell transdifferentiation in vitro. / K. Minami, S. Seino// Front Biosci. 2008. Vol.13. P.5824-5837.
- 246. Miralles F. Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development / F. Miralles, P. Czernichow, R. Scharfmann // J. Development. 1998. Vol. 125, N 6. P. 52–59.
- 247. Moberg L. Neutrophilic granulocytes are the predominant cell type infiltrating pancreatic islets in contact with ABO-compatible blood. / L.

- Moberg, O. Korsgren, B. Nilsson // Clinical and Experimental Immunology. 2005. Vol.142. P. 125-131.
- 248. Montanya E. Insulin resistance compensation: not just a matter of β-Cells?

 / E. Montanya // Diabetes. 2014. Vol. 63, №. 3. P. 832–834.
- 249. Molina J. Control of insulin secretion by cholinergic signaling in the human pancreaticislet. / J. Molina, R. Rodriguez-Diaz, A. Fachado, M.C. Jacques-Silva, P.O. Berggren, A. Caicedo // Diabetes. – 2014. – Vol. 63. – P. 2714-2726.
- 250. Mundinger TO, Mei Q, Foulis AK, Fligner CL, Hull RL, Taborsky GJ. Human type 1 diabetes is characterized by an early, marked, sustained and islet-selective loss of sympathetic nerves. Diabetes. 2016;:db160284. DOI: 10.2337/db16-0284
- 251. Murakami T. The blood vascular bed of the human pancreas, with special reference to the insulacinar portal system scanning electron-microscopy of corrosion casts. / T. Murakami, T. Fujita, T. Taguchi, Y. Nonaka, K. Orita //Arch Histol Cytol. 1992. Vol. 55. P. 381-395.
- 252. Murakami T. The insulo-acinar portal and insulovenous drainage systems in the pancreas of the mouse, dog, monkey, and certain other animals a scanning electron-microscopic study of corrosion casts. / T. Murakami, T. Fujita, T. Miyake, A. Ohtsuka, T. Taguchi, A. Kikuta // Arch Histol Cytol. 1993. Vol. 56. P. 127-147.
- 253. Murakami T. Pancreatic insulo-acinar portal systems in humans, rats, and some other mammals: Scanning electron microscopy of vascular casts. / T. Murakami, S. Hitomi, A. Ohtsuka, T. Taguchi, T. Fujita // Microsc Res Tech. 1997. Vol. 37. P. 478-488.
- 254. Murray G. I. Immunohistochemistry of neurone specific enolase with y subunit specific anti-peptide monoclonal antibodies. / G. I. Murray, M. E. Duncan, W. T. Melvin, J. E. Fothergill // J. Clin. Pathol. 1993. Vol 46. P. 993-996.

- 255. Myojin T. Immunohistochemical localization of neuropeptides in bovine pancreas. / T. Myojin, N. Kitamura, E. Hondo, E.T. Baltazar, G.T. Pearson, J. Yamada // Anat Histol Embryol. 2000. Vol. 29, № 3. P. 167-172.
- 256. Nagai H. Configurational anatomy of the pancreas: its surgical relevance from ontogenetic and comparative anatomical viewpoints. / H. Nagai // J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2003. Vol. 10. P. 48-56.
- 257. Nair G. Islet formation in mice and men: lessons for the generation of functional insulin-producing β-cells from human pluripotent stem cells. / G. Nair, M. Hebrok // Curr Opin Genet Dev. 2015. Vol. 32. P. 171–80.
- 258. Naya F.J. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/NeuroD-deficient mice. / F.J. Naya, H.P. Huang, Y. Qui, H. Muton, F.J. Demayo, A.B. Leiter, M.J. Tsai // Genes Dev. − 1997. − Vol. 11, №18. − P. 2323-2334.
- 259. Nikitin V.B. A comparative studies of he thick-toed geckos after 16 and 12 days spaceflights in Foton-M experiment. / V.B. Nikitin, A.E. Proshchina, A.S. Kharlamova, V.M. Barabanov, J.S. Krivova, O.S. Godovalova, E.S. Savelieva, A.N. Makarov, V.I. Gulimova, I.L. Okshtein, S.V. Naidenko, K.A. Souza, E.A.C. Almeida, E.A. Ilyin, S.V. Saveliev // Proceedings of the Symposium Life in Space for Life on Earth. / European Space Agency (Special Publication) ESA SP Life in Space for Life on Earth. 2008. Angers.
- 260. Ninov N. Metabolic regulation of cellular plasticity in the pancreas./ N. Ninov, D. Hesselson, P. Gut, A. Zhou, K. Fidelin, D.Y. Stainier // Curr Biol. 2013. Vol. 23, №13. P. 1242-1250.
- 261. Nordquist L. Renal and vascular benefits of C-peptide: Molecular mechanisms of C-peptide action. / L. Nordquist, F. Palm, B.T. Andresen //Biologics. –2008. Vol. 2. P. 441-452.
- 262. Nyman L.R. Realtime, multidimensional in vivo imaging used to investigate blood flow in mouse pancreatic islets. / L.R. Nyman, K.S. Wells, W.S. Head, M. McCaughey, E. Ford, M. Brissova, D.W. Piston, A.C. Powers / J Clin Invest. 2008. Vol. 118. P. 3790-3797.

- 263. Nyman L.R. Glucose-dependent blood flow dynamics in murine pancreatic islets in vivo. / L.R. Nyman, E. Ford, A.C. Powers, D.W. Piston. // Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010. Vol. 298. E807-E14.
- 264. Osundiji M.A. Brain control of insulin and glucagon secretion. / M.A. Osundiji, M.L. Evans // Endocrinol Metab Clin North Am. 2013. Vol. 42, №1. P. 1-14.
- 265. Oram R.A. Most people with long-duration type 1 diabetes in a large population-based study are insulin microsecretors. / R.A. Oram, T.J. McDonald, B.M. Shields, M.M. Hudson, M.H. Shepherd, S. Hammersley, E.R. Pearson, A.T. Hattersley // Diabetes Care. 2015. Vol. 38, №2. P. 323-328.
- 266. Orci L. Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells. / L. Orci, R. H. Unger // Lancet. 1975. Vol. 2. P. 1243–1244.
- 267. Oster A. Rat pancreatic development in relation to two homeobox gene products (Pdx1 and Nkx6.1). / A. Oster, J. Jensen, P. Serup, Ph. Galante, O.D. Madsen, L.-I. Larsson // J Histochem Cytochem. 1998. Vol. 46, №6. P. 707-715.
- 268. Pan F.C. Pancreas development in humans. / F.C. Pan, M. Brissova // Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2014. Vol. 21, №2. P. 77–82.
- 269. Panero F. Fasting plasma C-peptide and micro- and macrovascular complications in a large clinic-based cohort of type 1 diabetic patients. / F. Panero, G. Novelli, C. Zucco, P. Fornengo, M. Perotto, O. Segre, G. Grassi, P. Cavallo-Perin, G. Bruno // Diabetes Care. 2009. Vol. 32. P. 301–305.
- 270. Pearse A.G.E. Neurotransmission and the APUD concept. In: (ed. by) R.E. Coupland and T. Fujita: Chromaffin, enterochromaffin and related cells. Amsterdam.: Elsiver. 1976. P. 147-154.
- 271. Pepper A.R. Revascularization of transplanted pancreatic islets and role of the transplantation site. / A.R. Pepper, B. Gala-Lopez, O. Ziff, A.M.Shapiro // Clin Dev Immunol. 2013. 2013:352315. Режим доступа: doi: 10.1155/2013/352315.

- 272. Persson-Sjögren S. Nerve cells associated with the endocrine pancreas in young mice: an ultrastructural analysis of the neuroinsular complex type I. / S. Persson-Sjögren, A. Zashihin, S. Forsgren // Histochem. J. 2001. Vol. 33. P. 373-378.
- 273. Pictet R.L. The neural crest and the origin of the insulin producing and other gastrointestinal hormone producing cells. / R.L. Pictet, L.B. Rall, P. Phelps, W.J. Rutter // Science. 1976. Vol. 191, №4223. P. 191-192.
- 274. Piper K. Beta cell differentiation during early human pancreas development. / K. Piper, S. Brickwood, L.W. Turnpenny, I.T. Cameron, S.G. Ball, D.I. Wilson, N.A. Hanley // J Endocrinol. − 2004. − Vol. 181, №1. − P. 11-23.
- 275. Pisania A. Quantitative analysis of cell composition and purity of human pancreatic islet preparations. / A. Pisania, G.C. Weir, J.J. O'Neil, A. Omer, V. Tchipashvili, J. Lei, C.K. Colton, S. Bonner-Weir // Lab Invest. − 2010. − Vol. 90, № 11. − P. 1661–1675.
- 276. Portela-Gomes G.M. Neuroendocrine cell markers for pancreatic islets and tumors. / G.M. Portela-Gomes, G.W. Hacker, R. Weitgasser // Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2004. Vol. 12, №3. P. 183-192.
- 277. Pour P.M. The pattern of neural elements in the islets of normal and diseased pancreas and in isolated islets. / JOP. − 2011. − №12. − P. 395-403.
- 278. Prentki M. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. / M. Prentki, C.J. Nolan // J Clin Invest. 2006. Vol. 116. P. 1802–1812.
- 279. Putti R. An immunohistochemical study of the pancreas in the three genera of lacertids. / R. Putti, A. Della Rossa, L. Varano, V. Laforgia, A. Cavagnuolo // Gen Comp Endocrinol. 1992. Vol. 87, №2. P. 249-259.
- 280. Putti R. Islets and diffuse endocrine component in the pancreas of three red frogs species: relationships between endocrine and exocrine tissue. / R. Putti, A. Della Rossa, M. Maglio, G. Tagliafierro // Tissue Cell. − 1997. − Vol. 29, №3. − P. 355-363.

- 281. Quilter, C. R. Impact on offspring methylation patterns of maternal gestational diabetes mellitus and intrauterine growth restraint suggest common genes and pathways linked to subsequent type 2 diabetes risk. / C. R. Quilter, W. N. Cooper, K. M. Cliffe, B. M. Skinner, P. M. Prentice, L. Nelson, J. Bauer, K. K. Ong, M. Constância, W. L. Lowe, N. A. Affara, D. Dunger // B.FASEB J. 2014.28, 000–000
- 282. Rahier J. Localization of pancreatic polypeptide cells in a limited lobe of the human neonate pancreas: remnant of the ventral primordium? / J. Rahier, J. Wallon, W. Gepts, J. Haot // Cell Tissue Res. 1979. Vol. 200. P. 359-66.
- 283. Rahier J. Abundance of somatostatin cells in the human neonatal pancreas.

 / J. Rahier, J. Wallon, J.C. Henquin // Diabetologia. 1981. Vol. 18. P. 251-254.
- 284. Rahier J. Cell populations in the endocrine pancreas of human neonates and infants. / J. Rahier, J. Wallon, J.C. Henquin // Diabetologia. 1981. Vol. 20. P. 540-546.
- 285. Rahier J. Cellular composition of the human diabetic pancreas. / J. Rahier, R.M. Goebbels, J.C. Henquin // Diabetologia. 1983. Vol. 24. P. 366—371.
- 286. Rahier J. Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. / J. Rahier, Y. Guiot, R.M. Goebbels, C. Sempoux, J.C. Henquin // Diabetes Obes Metab. 2008. Vol. 10. P. 32-42.
- 287. Rankin M.M. Adaptive beta-cell proliferation is severely restricted with advanced age. / M.M. Rankin, J.A. Kushner // Diabetes. 2009. Vol. 58. P. 1365-1372.
- 288. Ravier M.A. Loss of connexin36 channels alters beta-cell coupling, islet synchronization of glucose-induced Ca2+ and insulin oscillations, and basal insulin release. / M.A. Ravier, M. Guldenagel, A. Charollais, A. Gjinovci, D. Caille, G. Sohl, C.B. Wollheim, K. Willecke, J.C. Henquin, P. Meda // Diabetes. 2005. Vol. 54. P. 1798–1807.

- 289. Razavi R. TRPV1⁺ sensory neurons control β cell stress and islet inflammation in autoimmune diabetes. / R. Razavi, Y. Chan, F.N. Afifiyan, X.J. Liu, X. Wan, J. Yantha, H. Tsui, L. Tang, S. Tsai, P. Santamaria, J.P. Driver, D. Serreze, M.W. Salter, H.-M. Dosch // Cell. − 2006. − Vol. 127, №6. − P. 1123-1135.
- 290. Reers Chr. Impaired islet turnover in human donor pancreata with aging. / Chr. Reers, S. Erbel, I. Esposito, B. Schmied, M.W. Büchler, P.P. Nawroth, R.A. Ritzel // European Journal of Endocrinology. 2009. Vol. 160. P. 185–191.
- 291. Rinaman L. The organization of vagal innervation of rat pancreas using cholera toxin-horseradish peroxidase conjugate. / L. Rinaman, R.R. Miselis // J Auton Nerv Syst. 1987. Vol. 21, № 2-3. P. 109-125.
- 292. Robb PM. Development of the islets of Langerhans in man. / P.M. Robb //
 Nature. 1961a. Vol. 190. P. 1018.
- 293. Robb P. The development of the islets of Langerhans in the human foetus. / P. Robb // Exp Physiol. 1961 δ. Vol. 46. P. 335-43.
- 294. Rodriguez-Diaz R. Innervation Patterns of Autonomic axons in the Human Endocrine Pancreas. / R. Rodriguez-Diaz, M.H. Abdulreda, A.L. Formoso, I. Gans, C. Ricordi, P-O. Berggren, A. Caicedo // Cell Metabolism. 2011. Vol. 14, №1, P. 45-54.
- 295. Rodriguez-Diaz R. Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming beta cell function in humans. / R. Rodriguez-Diaz, R. Dando, C. Jacques-Silva, A. Fachado, J. Molina, M.H. Abdulreda, C. Ricordi, St.D. Roper, P-O. Berggren, A. Caicedo // Nature Medicine. 2012. Vol. 17. P. 888 892.
- 296. Rodriguez-Diaz R. Noninvasive in vivo model demonstrating the effects of autonomic innervation on pancreatic islet function. / R. Rodriguez-Diaz, S. Speier, R.D. Molano, A. Formoso, I. Gans, M.H. Abdulreda, O. Cabrera, J. Molina, A. Fachado, C. Ricordi, I. Leibiger, A. Pileggi, P.O. Berggren, A. Caicedo // Proc Natl Acad Sci. 2012. Vol. 109. P. 21456-21461.

- 297. Rodriguez-Diaz R. Novel approaches to studying the role of innervation in the biology of pancreatic islets. / R. Rodriguez-Diaz, A.Caicedo // Endocrinol Metab Clin North Am. 2013. Vol. 42. P. 39-56.
- 298. Rosario W. The Brain to Pancreatic Islet Neuronal Map Reveals Differential Glucose Regulation from Distinct Hypothalamic Regions. / W. Rosario, I. Singh, A. Wautlet, C. Patterson, J. Flak, T.C. Becker, A. Ali, N. Tamarina, L.H. Philipson, L.W. Enquist, M.G. Jr. Myers, C.J. Rhodes // Diabetes. − 2016. − Vol.65,№9. − P. 2711-23.
- 299. Rupnik M. The physiology of rodent beta-cells in pancreas slices. / M. Rupnik // Acta Physiologica. 2009. Vol. 195. P. 123-138.
- 300. Saisho Y. Pancreas Volumes in Humans from Birth to Age One Hundred Taking Into Account Sex, Obesity, and Presence of Type–2 Diabetes. / Y. Saisho, A.E. Butler, J.J. MeierMonchamp T, M. Allen-Auerbach, R.A. Rizza, P.C. Butler // Clinical Anatomy. 2007. Vol. 20. P. 933–942.
- 301. Saisho Y. Beta-cell mass and turnover in humans: effects of obesity and aging. / Y. Saisho, A.E. Butler, E. Manesso, D. Elashoff, R.A. Rizza, P.C. Butler // Diabetes Care. 2013. Vol. 36. P. 111-117.
- 302. Saito K. Morphometrical analysis on topographical difference in size distribution, number and volume of islets in the human pancreas. / K. Saito, N. Iwama, T. Takahashi // Tohoku J Exp Med. 1978. Vol. 124. P. 177- 186.
- 303. Saito K . Differential volumetry of A, B and D Cells in the pancreatic islets of diabetic and nondiabetic subjects. / K. Saito, N. Yaginuma, T. Takahashi // Tohoku J Exp Med. 1979. Vol. 129 P. 273-283.
- 304. Salvioli B. Neurology and neuropathology of the pancreatic innervation. / M. Bovara, G. Barbara, F. De Ponti, V. Stanghellini, M. Tonini, S. Guerrini, C. Cremon, M. Degli Esposti, M. Koumandou, R. Corinaldesi, C. Sternini, De R. Giorgio // JOP. 2002. Vol. 3. P. 26-33.
- 305. Santos R.M. Widespread synchronous [Ca2+]i oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. / R.M. Santos, L.M. Rosario, A.

- Nadal, J. Garcia-Sancho, B. Soria, M. Valdeolmillos// Pflugers Archiv: European journal of physiology. 1991. Vol. 418. P. 417–422.
- 306. Saravia F. Is innervation an early target in autoimmune diabetes? / F. Saravia, F. Homo-Delarche // Trends Immunol. 2003. Vol. 24, №11. P. 574-579.
- 307. Scaglia L. Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas. / L. Scaglia, F.E. Smith, S. Bonner-Weir //Endocrinology. 1995. Vol.136, No.12. P. 5461- 5468.
- 308. Scharfmann R. Beta cells within single human islets originate from multiple progenitors / R. Scharfmann, X. Xiao, H. Heimberg, M. Jacques, Ph. Ravassard // PLoS ONE. 2008. 3. №10. e3559.
- 309. Scheen A. J. Diabetes mellitus in the elderly: insulin resistance and/or impaired insulin secretion. / A. J. Scheen // Diabetes & Metabolism. 2005. Vol. 31. №2. P. 27–34.
- 310. Schultze-Jena B.S. Das quantitative und qualitative Inselbild menschlichen Fete und Neugeborener. / B.S. Schultze-Jena // Virchow's Arch. pathol. Anat. undPhisiol. 1953. Vol. 323. P. 653-662.
- 311. Schwitzgebel V.M. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. / V.M. Schwitzgebel, D.W. Scheel, J.R. Conners, J. Kalamaras, J.E. Lee, D.J. Anderson, L. Sussel, J.D. Johnson, M.S. German // Development. − 2000. − Vol. 127, №16. − P. 3533-3542.
- 312. Serizawa Y. Neuro-insular complex type I in the mouse. Re-evaluation of the pancreatic islet as a modified ganglion. / Y. Serizawa, S. Kobayashi, T. Fujita // Arch Histol Jpn. 1979. Vol. 42. P. 389-394.
- 313. Shah P. Angiopoetin-2 Signals Do Not Mediate the Hypervascularization of Islets in Type 2 Diabetes. / P. Shah, N. Lueschen, A. Ardestani, J. Oberholzer, J. Olerud, P.O. Carlsson, K. Maedler // PLoS One. 2016. Vol.11, №9. e0161834. Режим доступа: doi: 10.1371/journal.pone.0161834.

- 314. Sherry N. A. Natural History of β–Cell Function in Type 1 Diabetes. / N. A. Sherry, E. B.Tsai, K. C. Herold // Diabetes. 2005. V ol. 54. Supplement 2. P. 32–39.
- 315. Sima A.A. Type 1 Diabetic Neuropathy and C-peptid. / A.A. Sima, W. Zhang, G. Grunberger // Experimental Diab Res. 2004. Vol. 5. P.65–77.
- 316. Simsek N. Immunohistochemical studies on the splenic lobe of the pancreas in young Japanese quails (Coturnix c. japonica). / N. Simsek, Z. Ozüdoğru, B. Alabay // Dtsch Tierarztl Wochenschr. −2008. Vol. 115, №5. P. 189-193.
- 317. Slack J. M. W. Developmental biology of the pancreas / J. M. W. Slack // J. Development. 1995. Vol. 121, N 6. P. 16–21.
- 318. Smolen P. Why pancreatic islets burst but single beta cells do not. The heterogeneity hypothesis. / P. Smolen, J. Rinzel, A. Sherman // Biophys J. 1993. Vol. 64. P. 1668–1680.
- 319. Solar M. Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth. / M. Solar, C. Cardalda, I. Houbracken, M. Martín, M.A. Maestro, N. De Medts, X. Xu, V. Grau, H. Heimberg, L. Bouwens, J.Ferrer // Dev Cell. 2009. –Vol.17, No.6. P. 849-860.
- 320. Sone H. Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. / H. Sone, Y. Kagawa // Diabetologia. 2005. Vol. 48. P. 58-67.
- 321. Speier S. A novel approach to in situ characterization of pancreatic β-cells. / S. Speier, M. Rupnik // Pflugers Archiv. 2003. Vol. 446. P. 553-558.
- 322. Speier S. Noninvasive in vivo imaging of pancreatic islet cell biology. / S. Speier, D. Nyqvist, O. Cabrera, J. Yu, R.D. Molano, A. Pileggi, T. Moede, M. Kohler, J. Wilbertz, B. Leibiger, A. Caicedo, P.O. Berggren // Nat Med. 2008. Vol. 14. P. 574-578.
- 323. Spijker H.S. Conversion of mature human β-cells into glucagon-producing α-cells. / H.S. Spijker, R.B. Ravelli, A.M. Mommaas-Kienhuis, A.A. van

- Apeldoorn, M.A. Engelse, A. Zaldumbide, S. Bonner-Weir, T.J. Rabelink, R.C. Hoeben, H. Clevers, C.L. Mummery, F. Carlotti, E.J. de Koning // Diabetes. 2013. Vol. 62. P. 2471-2480.
- 324. Squires P.E. The calcium-sensing receptor and β -cell function. / P.E. Squires , P.M. Jones , M.Y.Younis , C.E. Hills // Vitam Horm. 2014. Vol. 95. P. 249–267.
- 325. Stagner J.I. Retrograde perfusion as a model for testing the relative effects of glucose versus insulin on the A cell. / J.I. Stagner, E. Samols // The Journal of clinical investigation. 1986. Vol. 77. P. 1034–1037.
- 326. Stagner J.I. The vascular order of islet cellular perfusion in the human pancreas. / J.I. Stagner, E. Samols // Diabetes. 1992. Vol. 41. P. 93-97.
- 327. Standop J. Pacinian corpuscle in the human pancreas. / J. Standop, A. Ulrich, M.B. Schneider, A. Andrén-Sandberg, P.M. Pour // Pancreas. 2001. Vol. 23, № 1. P. 36-39.
- 328. Stefan Y. The pancreatic polypeptide-rich lobe of the human pancreas: Definitive identification of its derivation from the ventral pancreatic primordium. / Y. Stefan, S. Grasso, A. Perelet, L. Orci // Diabetologia. 1982. Vol. 23. P. 141-142.
- 329. Stefan Y. A. Quantitative Immunofluorescent Study of the Endocrine Cell Populations in the Developing Human Pancreas. / Y. Stefan, S. Grasso, A. Perelet, L. Orci // Diabetes. 1983. Vol. 32. P. 293-301.
- 330. Steiner D.J. Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition. / D.J. Steiner, A. Kim, K. Miller, M. Hara // Islets. 2010. Vol. 2. P. 135–145.
- 331. Stolovich-Rain M. Pancreatic beta cells in very old mice retain capacity for compensatory proliferation. / M. Stolovich-Rain, A. Hija, J. Grimsby, B. Glaser, Y. Dor // J Biol Chem. 2012. Vol. 287. P. 27407-27414.
- 332. Stozer A. Glucose-Stimulated Calcium Dynamics in Islets of Langerhans in Acute Mouse Pancreas Tissue Slices. / A. Stozer, J. Dolensek, M.S. Rupnik //

- PLoS One. 2013. 8:e54638. Режим доступа: doi:10.1371/journal.pone.0054638
- 333. Su H.C. Dual intrinsic and extrinsic origins of CGRPand NPY-immunoreactive nerves of rat gut and pancreas. / H.C. Su, A.E. Bishop, R.F. Power, Y. Hamada, J.M. Polak // J Neurosci. 1987. № 7. P. 2674-2687.
- 334. Sunami E. Morphological characteristics of Schwann cells in the islets of Langerhans of the murine pancreas. / E. Sunami, H. Kanazawa, H. Hashizume, M. Takeda, K. Hatakeyama, T. Ushiki //Arch Histol Cytol. − 2001. − Vol. 64, №2. − P. 191-201.
- 335. Szallasi A. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. / A. Szallasi, Blumberg P.M. // Pharmacol Rev. 1999. Vol. 51. P. 159–212.
- 336. Taborsky G.J.Jr. Autonomic mediation of glucagon secretion during hypoglycemia: implications for impaired alpha-cell responses in type 1 diabetes. / G.J.Jr. Taborsky, B. Ahren, P.J. Havel // Diabetes. – 1998. – Vol. 47. – P. 995-1005.
- 337. Takahashi N. Fusion pore dynamics and insulin granule exocytosis in the pancreatic islet. / N. Takahashi, T. Kishimoto, T. Nemoto, T. Kadowaki, H. Kasai / Science. 2002. Vol. 297. P. 1349-1352.
- 338. Takayanagi M. Immunocytochemical colocalizations of insulin, aromatic L-amino acid decarboxylase, dopamine beta-hydroxylase, S-100 protein and chromogranin A in B-cells of the chicken endocrine pancreas. / M. Takayanagi, T. Watanabe // Tissue Cell. − 1996. − Vol. 28, №1. − P. 17-24.
- 339. Teff K.L. Cephalic phase insulin release in normal weight males: verification and reliability. / K.L. Teff, R.D. Mattes, K. Engelman // Am J Physiol. 1991. Vol. 261. P. E430-436.
- 340. Teitelman G. Precursor cells of mouse endocrine pancreas coexpress insulin, glucagon and the neuronal proteins tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y, but not pancreatic polypeptide. / G.Teitelman, S. Alpert, J.M. Polak, A. Martinez, D. Hanahan // Development. − 1993. − Vol. 118, №4. − P. 1031-1039.

- 341. Tengholm A. Oscillatory control of insulin secretion. / A. Tengholm, E. Gylfe // Mol Cell Endocrinol. 2009. Vol. 297, № 1-2. P. 58-72.
- Tezel E. Expression of neural cell adhesion molecule in pancreatic cancer. /
 E. Tezel, Y. Kawase, S. Takeda, K. Oshima, A. Nakao // Pancreas. 2001. –
 Vol. 22, № 2, P. 122-125.
- 343. Teta M. Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice. / M. Teta, S.Y. Long, L.M. Wartschow, M.M. Rankin, J.A.Kushner // Diabetes. 2005. Vol. 54. P. 2557-2567.
- 344. Teta M. Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors. / M. Teta, M.M. Rankin, S.Y. Long, G.M. Stein, J.A. Kushner // Dev Cell. 2007. Vol. 12. P. 817-826
- 345. Thomas N.W. Innervation of the endocrine pancreas in the mongolian gerbil (Meriones unguiculatus). / N.W. Thomas, J.A. Findlay // In: Coupland R.E., Forssmann W.G. (eds). Peripheral neuroendocrine interactions. New York.: Springer Verlag. 1978. P. 134-143.
- 346. Thorel F. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. / F.Thorel, V. Népote, I. Avril, K. Kohno, R. Desgraz, S. Chera, P.L. Herrera // Nature. − 2010. − Vol. 464, № 7292. − P. 1149-1154.
- 347. Tiniakos D. Ontogeny of intrinsic innervation in the human kidney. / D. Tiniakos, V. Anagnostou, S. Stavrakis, D. Karandrea, E. Agapitos, C. Kittas // Anat. Embryol. (Berl). 2004. Vol. 209, № 1. P. 41-47.
- 348. Tiniakos D. G. Ontogeny of human intrahepatic innervation. / D.G. Tiniakos, J. Mathew, C. Kittas, A.D. Burt // Virchows Arch. 2008. Vol.452, № 4. P. 435-442.
- 349. Tiscornia O.M. The neural control of exocrine and endocrine pancreas. / O.M.Tiscornia // Am J Gastroenterol. 1977. Vol. 67. P. 541-560.
- 350. Tokuyama Y. Evolution of beta-cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat./ Y. Tokuyama, J. Sturis, A.M. DePaoli, J. Takeda, M. Stoffel, J. Tang, X. Sun, K.S. Polonsky, G.I. Bell // Diabetes. 1995. Vol. 44. P.1447–1457.

- 351. Tomita T. New markers for pancreatic islets and islet cell tumors. / T. Tomita // Pathol Int. 2002. Vol. 52, №7. P. 425-432.
- 352. Tschen S.-I. Agedependent decline in beta-cell proliferation restricts the capacity of beta-cell regeneration in mice. / S.-I. Tschen, S. Dhawan, T. Gurlo, A. Bhushan // Diabetes. 2009. Vol. 58. P. 1312-1320.
- 353. Tsui H. Neuronal elements in the pathogenesis of type 1 diabetes. / H. Tsui, S. Winer, G. Jakowsky, H-M. Dosch // Rev. Endoc. Metab. Disord. 2003. Vol. 4– P. 301-310.
- 354. Uchida T. Identification of cell types containing S-100b protein-like immunoreactivity in the islets of Langerhans of the guinea pig pancreas with light and electron microscopy. / T. Uchida, T. Endo // Cell Tissue Res. 1989. Vol. 255, №2. P. 379-384.
- 355. Upchurch B.H. Expression of peptide YY in all four islet cell types in the developing mouse pancreas suggests a common peptide YY-producing progenitor. / B.H. Upchurch, G.W. Aponte, A.B. Leiter // Development. 1994. Vol. 120, №2. P. 245-252.
- 356. Ushiki T. Distribution and ultrastructure of the autonomic nerves in the mouse pancreas. / T. Ushiki, S. Watanabe // Microsc Res Tech. 1997. Vol. 37, № 5-6. P. 399-406.
- 357. Veld In't P. Microscopic Anatomy of the Human Islet of Langerhans. / In't P. Veld, M. Marichal // The Islets of Langerhans. In: Islam MS, ed.: Springer Netherlands, 2010:1-19
- 358. Veld In't P. Screening for Insulitis in Adult Autoantibody-Positive Organ Donors. / P. Veld In't, D. Lievens, J.D. Grijse, Z. Ling, B. Van der Auwera, M. Pipeleers-Marichal, F. Gorus, D. Pipeleers // Diabetes. − 2007. − Vol. 56, № 9. − P. 2400-2404.
- 359. Veld In't P. Insulitis in human type 1 diabetes The quest for an elusive lesion. / P. Veld In't // Islets. 2011. –Vol. 3:4 P. 131-138.

- Villasenor A. Epithelial dynamics of pancreatic branching morphogenesis.
 / A. Villasenor, D.C. Chong, M. Henkemeyer, O. Cleaver // Development. –
 2010. Vol. 137. P. 4295-4305.
- 361. Vinik A.I. Antibodies to neuronal structures: innocent bystanders or neurotoxins? / A.I. Vinik, D. Anandacoomaraswamy, J. Ullal // Diabetes Care. 2005, Vol. 28, № 8 P. 2067-72.
- 362. Von Dorsche H.H. Phases in the early development of the human islet organ. / H.H. von Dorsche, H. Reiher, F.U. Hahn // Anat Anz. 1988. Vol. 166. P. 69–76.
- 363. Von Dorsche H.H. Neuron-specific enolase (NSE) as a neuroendocrine cell marker in the human fetal pancreas. / H.H. Von Dorsche, K. Fält, H.J. Hahn, H. Reiher // Acta Histochem. 1989. Vol. 85, №2. P. 227-228.
- 364. Von Dorsche H. H. Detection of proinsulin, C-peptide, insulin-A-chain, and Glicentin in pancreatic islet cells of early human fetogenesis / H.H. von Dorsche, K. Fält, O. Madsen, H. Reiher, H.J.Hahn // Acta histochem. 1991. Vol. 91, N 1. P. 39–42.
- 365. Von Dorsche H. H. Ontogeny of human Langergans islets. A review of some light- and electron-microscopical, immunogistochemikal and functional data on fetal development of the endocrine pancreas / H. H. von Dorsche, S. Falkmer // J. Biochem. Physiol. 2000. Vol. 36, N 6. P. 701–718.
- 366. Voss K.M. Fine structural studies of the islets of Langerhans in the Djungarian humster (Phodopus sungorus) / K.M.Voss, H. Lieselotte, H.F. Kern // Cell Tissue Res. 1978. Vol.191, №2. P. 333-342.
- 367. Vrachnis N. Impact of maternal diabetes on epigenetic modifications leading to diseases in the offspring. /N.Vrachnis, N. Antonakopoulos, Z. Iliodromiti, K. Dafopoulos, C. Siristatidis, K.I. Pappa, E. Deligeoroglou, N. Vitoratos// Exp Diabetes Res. 2012. 2012:538474. doi: 10.1155/2012/538474
- 368. Waguri M. Histopathologic Study of the Pancreas Shows a Characteristic Lymphocytic Infiltration in Japanese Patients with IDDM. / M. Waguri, T.

- Hanafusa, N. Itoh, J.I. Miyagawa, A. Imagawa, M. Kuwajima, N. Kono, Y. Matsuzawa // Endocrine Journal. 1997. Vol. 44, №1. P. 23-33.
- 369. Wahren J. C-peptide is a bioactive peptide. / J. Wahren, K. Ekberg, H. Jörnvall // Diabetologia. 2007. Vol. 50, P. 503-509.
- 370. Wang P. Moore Molecular Imaging: A Promising Tool to Monitor Islet Transplantation. / P. Wang, Z.A. Medarova // Journal of Transplantation. 2011. 2011:202915.
- 371. Wang L. Persistence of prolonged C-peptide production in type 1 diabetes as measured with an ultrasensitive C-peptide assay. / L. Wang, N.F. Lovejoy, D.L. Faustman // Diabetes Care. 2012. Vol. 35. P. 465-470.
- 372. Watanabe S. Changes in the mouse exocrine pancreas after pancreatic duct ligation a qualitative and quantitative histological study. / S. Watanabe, K. Abe, Y. Anbo, H. Katoh // Arch Histol Cytol. 1995. Vol. 58. P. 365-374.
- 373. Watanabe T. The lobular architecture of the normal human pancreas: a computer-assisted three-dimensional reconstruction study. / T. Watanabe, H. Yaegashi, M. Koizumi, T. Toyota, T. Takahashi // Pancreas. 1997. Vol. 15. P. 48-52.
- 374. Watanabe T. Chanding distribution of islets in the developing human pancreas: a computer–assisted three–dimensional reconstruction study / T. Watanabe, H. Yaegashi, M. Koizumi, T. Toyota, T. Takahashi // Pancreas. 1999. Vol. 18, N 4. P. 349–354.
- 375. Wayland H. Microcirculation in pancreatic function. / H. Wayland // Microsc Res Tech. 1997. Vol. 37. P. 418-433.
- 376. Weir G.C. β-cell dedifferentiation in diabetes is important, but what is it? / G.C. Weir, C. Aguayo-Mazzucato, S. Bonner-Weir // *Islets.* 2013. Vol. 5. P. 233-237.
- 377. Wharton GK. The blood supply of the pancreas, with special reference to that of the islands of Langerhans. / G.K.Wharton // Anatomical Record. 1932. Vol. 53. P. 55-81.

- 378. Wharton J. Neuron-specific enolase as an immunocytochemical marker for the diffuse neuroendocrine system in human fetal lung. / J. Wharton, J. M. Polak, G. A. Cole, P. J. Marangos, A. G. Pearse // J Histochem Cytochem. 1981. Vol. 29. P. 1359-1364.
- 379. Wieczorek G. A comparative immunohistochemical study of pancreatic islets in laboratory animals (rats, dogs, minipigs, nonhuman primates). / G. Wieczorek, A. Pospischil, E. Perentes // Experimental and toxicologic pathology: official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie. 1998. Vol. 50. P. 151–172.
- 380. Wierup N.The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. / N. Wierup, H. Svensson, H. Mulder, F. Sundler // Regul Pept. 2002. Vol. 107, № 1-3. P. 63-69.
- 381. Wierup N. The islet ghrelin cell. / N. Wierup, F. Sundler, R.S. Heller // J Mol Endocrinol. 2013. Vol. 52, № 1. P. R35-49.
- 382. Willcox A. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. / A. Willcox, S.J. Richardson, A.J. Bone, A.K. Foulis, N.G. Morgan // Clin Exp Immunol. 2009. Vol. 155, P. 173-181.
- 383. Winer S. Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not β-cell exclusive. / S. Winer, H. Tsui, A. Lau, A. Song, X. Li, R.K. Cheung, A. Sampson, F. Afifiyan, A. Elford, G. Jackowski, D.J. Becker, P. Santamaria, P. Ohashi, H.-M. Dosch // Nat. Med. 2003. Vol. 9. P. 198-205.
- 384. Woodburne R.T. The arteries of the pancreas. / R.T. Woodburne, L.L. Olsen // Anat Rec. 1951. Vol. 111. P. 255-270
- 385. Woods S.C. Neural control of the endocrine pancreas. / S.C. Woods, D. Jr. Porte // Physiol Rev. 1974. Vol. 54, №3. P. 596-619.
- 386. Won M.H. /Afferent innervations of the rat pancreas: retrograde tracing and immunohistochemistry in the dorsal root ganglia / M.H. Won, H.S. Park, Y.G. Jeong, H.J. Park // Pancreas. 1998. Vol.16, №1. P. 80–87.

- 387. Yaginuma N. The microvasculature of the human pancreas and its relation to Langerhans islets and lobules. / N. Yaginuma, T. Takahashi, K. Saito, M. Kyoguku // Pathol Res Pract. 1986. Vol. 181. P. 77-84.
- 388. Yi S.Q. Innervation of the pancreas from the perspective of perineural invasion of pancreatic cancer. / S.Q. Yi, K. Miwa, T. Ohta, M. Kayahara, H. Kitagawa, A. Tanaka, T. Shimokawa, K. Akita, S. Tanaka // Pancreas. 2003. Vol. 27. P. 225-229.
- 389. Yoon K.H. Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. / K.H. Yoon, S.H. Ko, J.H. Cho, J.M. Lee, Y.B. Ahn, K.H. Song, S.J. Yoo, M.I. Kang, B.Y. Cha, K.W. Lee, H.Y. Son, S.K. Kang, H.S. Kim, I.K. Lee, S. Bonner-Weir // J Clin Endocrinol Metab. 2003. Vol. 88. P. 2300–2308.
- 390. Youson J.H. Ontogenetic and phylogenetic development of the endocrine pancreas (islet organ) in fish. / J.H. Youson, A.A. Al-Mahrouki // Gen Comp Endocrinol. 1999. Vol. 116, №3. P. 303-335.
- 391. Youson J.H. The fish endocrine pancreas: review, new data and future research directions in ontogeny and phylogeny . / J.H. Youson, A.A. Al-Mahrouki, Y. Amemiya, L.C. Graham, C.J. Montpetit, D.M. Irwin // Gen Comp Endocrinol. 2006. Vol. 148, №2. P. 105-115.
- 392. Zeyda M. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance A Mini–Review. / M. Zeyda, T. M. Stulnig // Gerontology. 2009. Vol. 55. P. 379–386.
- 393. Ziv, O. The plastic pancreas / O. Ziv, B. Glaser, Y. Dor // Dev. Cell July. 2013. №26 (1). P. 3 -7.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1

Характеристика аутопсийного материала поджелудочной железы в пре- и неонатальном периоде развития человека

№	Пол	Гестационный	Диагноз	Фиксатор
		возраст		
Преф	 þетальн	ый период		
10		30-32 мм ткд, 10 нед	из коллекции лаборатории развития нервной системы (л.н.с.) Причина прерывания беременности неизвестна	Кислый формалин
18		30-32 мм ткд , 10 нед	из коллекции л.н.с. Причина прерывания беременности неизвестна	Кислый формалин
41		33 мм ткд , 10 нед	из коллекции л.н.с. Причина прерывания беременности неизвестна	Кислый формалин
42		30 мм ткд , 10 нед	из коллекции л.н.с. Причина прерывания беременности неизвестна	Кислый формалин
43		36-37 мм ткд , 10 нед	из коллекции л.н.с. Причина прерывания беременности неизвестна	Кислый формалин
17		40 мм ткд , 11 нед	из коллекции л.н.с. Причина прерывания беременности неизвестна	Кислый формалин
40		45 мм ткд , 11 нед	из коллекции л.н.с. Причина прерывания беременности неизвестна	Кислый формалин
15		60 мм ткд , 11 нед	из коллекции л.н.с. Причина прерывания беременности неизвестна	Кислый формалин
16		75 мм ткд , 12 нед	из коллекции л.н.с. Причина прерывания беременности неизвестна	Кислый формалин
44	Д	75-78 ткд , 12	из коллекции л.н.с. Причина прерывания беременности	Кислый

		нед	неизвестна	формалин
Ранн	нефетал	тыный перио д		
5	M	115 ткд , 14-15 нед	из коллекции л.н.с. Причина прерывания беременности неизвестна	Кислый формалин
12	М	110 ткд , 14-15 нед	из коллекции л.н.с. Причина прерывания беременности неизвестна	Кислый формалин
13	Д	106 ткд, 14 нед	из коллекции л.н.с. Причина прерывания беременности неизвестна	Кислый формалин
23	M	15-16 нед	Прерывание беременности по мед. показаниям (внематочная (шеечная) беременность)	Нейтральный формалин
30	Д	рост 170 мм, 16 нед	Прерывание беременности по медицинским показаниям со стороны матери: СД1 тяжелого течения	Нейтральный формалин
6	М	130 мм ткд , 17 нед	из коллекции л.н.с. Причина прерывания беременности неизвестна	Кислый формалин
7	M	рост 207 мм, 17,4 нед	из коллекции л.н.с. Причина прерывания беременности неизвестна	Кислый формалин
8	Д	17 нед	из коллекции л.н.с. Причина прерывания беременности неизвестна	Кислый формалин
4	M	150 мм ткд , 17- 18 нед	из коллекции л.н.с. Причина прерывания беременности неизвестна	Кислый формалин
9	Д	18 нед	из коллекции л.н.с. Причина прерывания беременности неизвестна	Кислый формалин
31	М	160 мм ткд, 20 нед.	Дихориальная диамниотическая двойня от ЭКО. Поздний самопроизвольный выкидыш. Плод 1	Нейтральный формалин
32	M	160 мм ткд, 20 нед.	Дихориальная диамниотическая двойня от ЭКО. Поздний самопроизвольный выкидыш. Плод 2	Нейтральный формалин
45	M	163 мм ткд, 234	Прерывание беременности по медицинским	Нейтральный

		г., 20 нед	показателям со стороны матери: СД 1. Плод:	формалин
			хроническая планцентарная недостаточность	
46	M	180 мм ткд, 480	из коллекции л.н.с. Причина прерывания	Нейтральный
		г, 20 нед	беременности неизвестна	формалин
47	M	270 мм, 331 г.,	из коллекции л.н.с. Причина прерывания беременности	Нейтральный
		19-20 нед.	неизвестна	формалин
78		20 нед	Врожденные пороки развития плода,	
			гидроцефалия	
Сред	цнефета	альный период		
27	M	300мм, 390г, 22-	Трихориадьная триамниотическая тройня от	Нейтральный
		23нед.	ЭКО. Самопроизвольный выкидыш от	формалин
			преждевременного излития околоплодных	
			вод. Плод1.	
28	M	320 мм, 640г,	то же. Плод 2	Нейтральный
		22-23 нед		формалин
29	Д	320 мм, 570 г,	то же. плод 3	Нейтральный
		22-253нед.		формалин
48	М	23 нед	Асфиксия плода в результате обострения	Нейтральный
			декомпенсированной хронической	формалин
			плацентарной недостаточности, вызванной	
			частичной отслойкой базальной пластинки	
			плаценты и плодных оболочек в результате	
			вирусно-бактериальной инфекции	
33	M	300 мм, 900 г,	Прерывание беременности по медицинским	Нейтральный
		25 нед.	показаниям со стороны плода:	формалин
			левосторонняя диафрагмальная грыжа	
35	M	320 мм, 560 г, 25	Самопроизвольный выкидыш смерть плода	Нейтральный
		нед.	от асфиксии, вызванной острой частичной	формалин
			краевой отслойкой базальной пластинки	
			плаценты и плодных оболочек на фоне	
			хронической плацентарной недостаточности.	
36	Д	230 мм, 600 г, 25	Самопроизвольный выкидыш. Смерть плода	Нейтральный
		нед.	от асфиксии, вызванной острой частичной	формалин

			краевой отслойкой базальной пластинки плаценты и плодных оболочек на фоне	
			хронической плацентарной недостаточности.	
25	Д	320 мм, 700 г, 27	Прерывание беременности по медицинским	Нейтральный
		нед.	показаниям: тазовое предлежание. У плода	формалин
			внутриутробная пневмония, кровоизлияния в	
			ЦНС, сердечно-сосудистая, печеночная	
			недостаточность.	
Поздн	іефета.	пьный и неонатал	ьный периоды	
22	Д	370 мм, 1020 г,	Жила 4 дня Прерывание беременности со	Жидкость
		28-29 нед.	стороны матери: СД 1 типа тяжелого	Буэна
			течения, артериальная гипертензия, гестоз. У	
			плода при вскрытии внутрижелудочковые	
			кровоизлияния, кровоизлияния в легкие.	
34	Д	390 мм, 1400 г,	Жила 5 дней. Внутриутробный сепсис в	Нейтральный
		30 нед.	сочетании с синдромом дыхательных	формалин
			расстройств, осложнившихся ДВС-	
			синдромом	
19	Д	32 нед.	Жила 13 дней. Обильное кровоизлияние в	Жидкость
			головной мозг.	Буэна
62		32 нед	ДВС-синдром в результате внутриутробного	
			сепсиса	
21	M	510 мм, 3670 г,	Прерывание беременности по медицинским	Жидкость
		34-35 нед	показаниям. У матери стероидный СД. У	Буэна
			плода аутоиммунная гемолитическая	
			анемия, гидроторакс, гидроперикард, асцит,	
			отек мозга, гепатомегалия	
38	M	490 мм, 3080 г,	Жил 7 дней. Внутриутробный сепсис в	Нейтральный
		36-37 нед	сочетании с врожденным пороком сердца,	формалин
			осложнившихся интоксикацией и	
			декомпенсацией сердечной деятельности	
177	M	550мм, 4510г	Новорожденный. Интранатальная асфиксия.	Нейтральный
		40 нед (38)	Диабетическая фетопатия, тяжелая форма. У	формалин
			матери СД1	
L				

39	Д	520 мм, 2900 г,	Множественные	врожденные	пороки	Нейтральный
		40 нед.	несовместимые с	жизнью в соч	етании с	формалин
			асфиксией новорох	кденного		

Таблица 2

а) Характеристика использованных в работе образцов поджелудочной железы взрослых людей, не страдавших нарушениями углеводного обмена

$N_{\underline{0}}$	Пол	Возраст	Диагноз	Фиксатор
C370	Ж	22	Муковисцидоз	Нейтральный формалин
1627	M	24	Тупая травма груди, разрыв грудной аорты, острая кровопотеря	Жидкость Буэна
1485	М	27	Сочетанная тупая травма костей скелета и внутренних органов	Жидкость Буэна
46	ж	31	из коллекции л.н.с. Причина смерти неизвестна	Нейтральный формалин
123	Ж	33	Аутоиммунный гепатит с исходом в смешанный цирроз печени Врожденная атрофия и недостаточность надпочечников, паращитовидных желез, кальциноз подкорковых узлов головного мозга Полиорганная недостаточность	Нейтральный формалин
4п	М	30-35	Отравление угарным газом, перикардит	Нейтральный формалин
1п	ж	35	Отравление угарным газом	Нейтральный формалин
10п	M	36	Падение	Нейтральный формалин
nx	ж	40	из коллекции л.н.с. Причина смерти неизвестна	Жидкость Карнуа
5 п	M	42	Острая коронарная недостаточность	Нейтральный формалин

15 п	М	43	Гангрена верхней доли правого легкого	Нейтральный формалин
6п	ж	45-50	Отравление угарным газом	Нейтральный формалин
21п	М	46	Острое алкогольное отравление Гепатоз, киста почки	Нейтральный формалин
82	Ж	50	Злокачественное новообразование молочной железы с метастазами в мягкие костные ткани поясничного отдела позвоночника и диффузный мелкоочаговый кардиосклероз	Нейтральный формалин
49	М	51	из коллекции л.н.с. Причина смерти неизвестна	Нейтральный формалин
2π	M	55	Диффузный кардиосклероз, острая сердечная недостаточность	Нейтральный формалин
7π	М	58	Отравление угарным газом	Нейтральный формалин
8п	М	58	Общее переохлаждение	Нейтральный формалин
190	М	58	Кровоизлияние в левой теменной доле на фоне артериальной гипертонии	Нейтральный формалин
9п	М	59	Острая сердечная недостаточность	Нейтральный формалин
3п	М	59	Ущемление стволовых структур головного мозга	Нейтральный формалин
786	М	60	Падение	Нейтральный формалин
124	M	61	Смешанный цирроз печени, рак правой доли печени, кровотечение из варикозного расширения вен пищевода, Острая кровопотеря (геморрагический шок)	Нейтральный формалин
44	M	62	из коллекции л.н.с. Причина смерти неизвестна	Нейтральный формалин
261	M	70	ГБ с преимущественным поражением	Нейтральный

			сердца и почек, с ХСН и уремией	формалин
			Почечная недостаточность	
c235	M	70	Повторный инфаркт миокарда в задней стенке в задней стенке левого желудочка и межжелудочковой перегородки на фоне артериальной гипертонии Кардиогенный шок	Нейтральный формалин
509	M	71	Острый повторный инфаркт миокарда	Нейтральный формалин
80	Ж	72	Острая коронарная недостаточность на фоне артериальной гипертонии Бронхиальная астма, хронический бронхит Острая коронарная недостаточность	Нейтральный формалин
346	Ж	74	Ишемический инфаркт головного мозга Повторный инфаркт миокарда на фоне артериальной гипертонии Отек легкого и головного мозга	Нейтральный формалин
538	M	74	из коллекции л.н.с. Причина смерти неизвестна	Нейтральный формалин
57	Ж	75	Хроническая язва желудка с перфорацией стенки, перитонит, уремия	Нейтральный формалин
334	M	75	Постинфарктный кардиосклероз задней боковой стенки ЛЖ, бурые кисты подкорковых ядер головного мозга, фон артериальная гипертония Острая левожелудочковая недостаточность, отек головного мозга	Нейтральный формалин
156	М	77	Постинфарктный кардиосклероз на фоне артериальной гипертонии Рак легкого Острая левожелудочковая недостаточность	Нейтральный формалин
105	M	77	Анемия неясного генеза Анемическая кома	Нейтральный формалин
18п	Ж	79	Острая сердечная недостаточностьб, ишемическая болезнь сердца, жировой гепатоз, пневмония	Нейтральный формалин
61	Ж	80	из коллекции л.н.с. Причина смерти неизвестна	Нейтральный формалин

70	M	80	Повторный трансмуральный инфаркт	Нейтральный
			миокарда на фоне артериальной	формалин
			гипертонии	
			Острая левожелудочковая	
			недостаточность	
66	M	80	Инсульт инфаркт рак печени	Нейтральный формалин
				фортин
103	Ж	83	Деменция	Нейтральный
				формалин
Ж841	ж	84	из коллекции л.н.с. Причина смерти	Жидкость
			неизвестна	Карнуа
Ж842	ж	84	из коллекции л.н.с. Причина смерти	Жидкость
			неизвестна	Карнуа
50	ж	81	из коллекции л.н.с. Причина смерти	Нейтральный
			неизвестна	формалин
173	ж	85	Лимфогрануломатоз	Нейтральный
			Отек легкого	формалин
22π	ж	87	Острая сердечная недостаточность	Нейтральный
			Атеросклероз вен головного мозга,	формалин
			желчно- каменная болезнь	
230	M	88	Постинфарктный кардиосклероз на фоне	Нейтральный
			артериальной гипертонии	формалин
м88	M	88	из коллекции л.н.с. Причина смерти	Жидкость
			неизвестна	Карнуа
157	ж	90	Ишемический инфаркт головного мозга	Нейтральный
				формалин

б) Характеристика использованных в работе образцов поджелудочной железы взрослых людей, страдавших СД1

No	Пол	Возраст	Диагноз	Фиксатор
221	M	27	СД1 тяжелый, алкоголизм	Нейтральный формалин
496	M	41	СД1	Нейтральный

				формалин
428	M	41	СД1, тяж. гангрена стопы	Нейтральный формалин
c210	M	41	СД1, гипокликемическая кома	Нейтральный формалин
562	M	66	СД1 декомпенсированный, атрофия + склероз ткани ПЖ	Нейтральный формалин

в) Сводное описание использованных в работе образцов поджелудочной железы взрослых людей, страдавших СД2

№	Пол	Возраст	диагноз	Фиксатор
128	M	42	Кровоизлияние в головном мозге по типу гематомы на фоне артериальной гипертензии и диабета 2 типа Отек головного мозга с вклинением в затылочное отверстие	Нейтральный формалин
517	Ж	52	Сахарный диабет 2 типа, тяжелый,	Нейтральный формалин
182	ж	55	Кровоизлияние в левую темено-затылочную область на фоне артериальной гипертензии и СД2 Отек головного мозга	Нейтральный формалин
93	ж	60	Очагово-сливная правосторонняя бронхопневмония на фоне СД2 Острый респираторный дистресс синдром (ОРДСВ) шоковое легкое	Нейтральный формалин
c222(1)	Ж	62	Острый инфаркт миокарда на фоне артериальной гипертензии и СД2 Острая левожелудочковая недостаточность	Нейтральный формалин
117	Ж	63	Смешанный инфаркт головного мозга на фоне артериальной гипертензии СД2	Нейтральный формалин
286	ж	65	СД2, тяжелый, диабетическая гангрена стопы	Нейтральный формалин
522	ж	67	Повторный рецидивирующий инфаркт миокарда на фоне артериальной гипертонии и СД Кардиогенный шок	Нейтральный формалин
516	ж	69	Постинфарктный кардиосклероз задней стенки	Нейтральный

			ЛЖ на фоне на фоне ГБ и СД2	формалин
580	М	71	Острый повторный инфаркт миокарда на фоне артериальной гипертонии и СД2 Острая левожелудочковая недостаточность	Нейтральный формалин
97	Ж	75	Острый повторный инфаркт миокарда на фоне артериальной гипертонии и СД2 Кардиогенный шок	Нейтральный формалин
588	М	76	Острый инфаркт миокарда на фоне артериальной гипертонии и СД2 острая левожелудочковая недостаточность	Нейтральный формалин
19 тело	M	76	Острый холецистит, тотальный мезентральный тромбоз, гангрена кишечника, перитонит, Фоновый распространенный атеросклероз, СД2 тяжелого течения, инсулинопотребный, диабетическая ретинопатия ангиопатия, ампутация левого бедра	Нейтральный формалин
129	М	77	Смешанный инфаркт левого полушария головного мозга, Субдуральная организованная гематома левой теменной области на фоне артериальной гипертонии и СД 2 Отек головного мозга с вклинением в большое затылочное отверстие	Нейтральный формалин
402	Ж	78	Декомпенсированный СД2	Нейтральный формалин
228	Ж	78	Повторный инфаркт миокарда, повторный инфаркт головного мозга на фоне артериальной гипертонии и СД2 Отек легкого и головного мозга	Нейтральный формалин
c336	Ж	80	Ишемический инфаркт левой теменной доли на фоне артериальной гипертонии, хронический кистозный панкреатит, СД2 Тромбоэмболия правой и левой легочных артерий	Нейтральный формалин
570	ж	82	Повторный рецидивирующий инфаркт миокарда левой межжелудочковой перегородки и передней стенки ЛЖ на фоне СД 2(диабетический нефросклероз с хроническим пиелонефритом и склерозом пирамид левой почки) и симптоматической артериальной гипертензии Острая л\ж недостаточность и хроническая почечная недостаточность	Нейтральный формалин

Осложнения у пациентов с длительным течением СД1 в клиническом исследовании остаточной секреции инсулина

Диагноз	Всего	Проценты
СД1	300	100%
Диабетическая ретинопатия	155	51%
Нейропатия	103	34.3%
Диабетическая нефропатия	51	17%
Алиментарно- конституциональная форма ожирения (индекс Кетле больше 30)	43	14,3%
Хроническая ишемическая болезнь сердца	67	22 %
Артериальная гипертензия	101	33.6%
Хронические заболевания органов дыхания	14	4,6%
Хронические заболевания органов пищеварения	7	2,3%

Таблица 4

Характеристика проведенных гистологических и иммуногистохимических реакций

Методы окрашивания	Количество исследованных образцов ПЖ человека
1) Гистологические	
Гематоксилин-эозин	В пренатальном и неонатальном периодах:
	Префетальный период - 10
	Раннефетальный период -16
	Среднефетальный период -8
	Позднефетальный и неонатальный периоды - 8
	Взрослые люди, не страдавшие нарушениями
	углеводного обмена:
	Зрелого возраста - 24
	Пожилого и старческого возраста - 25
	страдавшие СД1 - 5
	страдавшие СД2 -18
Окраска по Маллори	Взрослые люди, не страдавшие нарушениями
	углеводного обмена:
	Зрелого возраста - 5
	Пожилого и старческого возраста - 6
	страдавшие СД1 - 5
	страдавшие СД2 -13
Конго красный	Взрослые люди, не страдавшие нарушениями
	углеводного обмена:
	Зрелого возраста - 5
	Пожилого и старческого возраста - 6
	страдавшие СД1 - 5
	страдавшие СД2 -13
2) Иммуногистохимические	
А) Пероксидазная реакция с	
антителами к:	
Инсулину	В пренатальном и неонатальном периодах:

Ранисфетальный период -11 Среднефетальный период -5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 Елюкагону В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 10 Раннефетальный период - 5 Позднефетальный период - 5 Позднефетальный период - 5 Позднефетальный период - 5 Пожилого обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 NSE В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 11 Среднефетальный период - 11 Среднефетальный период - 5 Позднефетальный период - 15 Пожилого обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД1 - 5 Страдавшие СД2 - 18		Префетальный период - 10
Поздвефетальный и пеонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 Глюкагопу В пренатальном и пеонатальном нериодах: Префетальный период - 10 Раписфетальный период - 11 Среднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 В пренатальный период - 5 Позднефетальный период - 11 Среднефетальный период - 11 Среднефетальный период - 11 Среднефетальный период - 5 Позднефетальный период - 5 Позднефетальный период - 5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18		Раннефетальный период -11
Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 Глюкагону В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 10 Раннефетальный период - 11 Среднефетальный период - 5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 NSE В пренатальным и неонатальном периодах: Префетальный период - 10 Раннефстальный период - 11 Среднефетальный период - 5 Позднефетальный период - 5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах:		Среднефетальный период -5
уллеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СДІ - 5 страдавшие СД2 - 18 Глюкагону В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 10 Раннефетальный период - 5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 NSE В пренатальный период - 10 Раннефетальный период - 11 Среднефетальный период - 11 Среднефетальный период - 5 Позднефетальный период - 5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах:		Позднефетальный и неонатальный периоды - 8
Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 Глюкагону В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 10 Раннефетальный период - 11 Среднефетальный период - 5 Поздпефетальный и неопатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями утлеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 NSE В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 10 Раннефетальный период - 11 Средпефетальный период - 5 Поздпефетальный период - 1 Средпефетальный период - 1 Сред		Взрослые люди, не страдавшие нарушениями
Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 Глюкагону В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 10 Рашефстальный период - 11 Среднефетальный период - 5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 NSE В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 10 Раннефетальный период - 11 Среднефетальный период - 5 Поздпефетальный период - 5 Поздпефетальный период - 5 Поздпефетальный период - 5 Поздпефетальный период - 15 Пожилого обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18		углеводного обмена:
страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 Глюкагопу В пренатальном и неонатальном пернодах: Префетальный период - 10 Раннефетальный период -5 Позднефетальный период -5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 NSE В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 10 Раннефетальный период - 11 Средпефетальный период - 5 Позднефетальный период - 5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД1 - 5		Зрелого возраста - 15
традавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 10 Раннефетальный период -5 Позднефетальный период -5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 10 Раннефетальный период - 11 Среднефетальный период - 5 Позднефетальный период - 5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД1 - 5		Пожилого и старческого возраста - 19
В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 10 Раннефетальный период -5 Позднефетальный период -5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 10 Раннефетальный период - 11 Среднефетальный период -5 Позднефетальный период -5 Позднефетальный период -5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18		страдавшие СД1 - 5
Префетальный период - 10 Раннефетальный период - 5 Позднефетальный период - 5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 NSE В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 10 Раннефетальный период - 5 Позднефетальный период - 5 Позднефетальный период - 5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18		страдавшие СД2 - 18
Раннефетальный период -11 Среднефетальный период -5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 В пренатальный период - 10 Раннефетальный период - 11 Среднефетальный период -5 Позднефетальный период -5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18	Глюкагону	В пренатальном и неонатальном периодах:
Среднефетальный период -5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 NSE В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 10 Раннефетальный период - 11 Среднефетальный период - 5 Позднефетальный и ериод - 5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18		Префетальный период - 10
Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 10 Раннефетальный период - 11 Среднефетальный период - 5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18		Раннефетальный период -11
Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 10 Раннефетальный период - 5 Позднефетальный период - 5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах:		Среднефетальный период -5
углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 NSE В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 10 Раннефетальный период -11 Среднефетальный период -5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах:		Позднефетальный и неонатальный периоды - 8
Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 10 Раннефетальный период -11 Среднефетальный период -5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах:		Взрослые люди, не страдавшие нарушениями
Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 10 Раннефетальный период - 11 Среднефетальный период - 5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах:		углеводного обмена:
отрадавшие СД1 - 5 отрадавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 10 Раннефетальный период -11 Среднефетальный период -5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 отрадавшие СД1 - 5 отрадавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах:		Зрелого возраста - 15
Префетальный период - 10 Раннефетальный период - 11 Среднефетальный период -5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах:		Пожилого и старческого возраста - 19
В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 10 Раннефетальный период -11 Среднефетальный период -5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах:		страдавшие СД1 - 5
Префетальный период - 10 Раннефетальный период -11 Среднефетальный период -5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах:		страдавшие СД2 - 18
Раннефетальный период -11 Среднефетальный период -5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах:	NSE	В пренатальном и неонатальном периодах:
Среднефетальный период -5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах:		Префетальный период - 10
Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах:		Раннефетальный период -11
Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах:		Среднефетальный период -5
углеводного обмена: Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах:		Позднефетальный и неонатальный периоды - 8
Зрелого возраста - 15 Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 В пренатальном и неонатальном периодах:		Взрослые люди, не страдавшие нарушениями
Пожилого и старческого возраста - 19 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 S100 В пренатальном и неонатальном периодах:		углеводного обмена:
страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 18 S100 В пренатальном и неонатальном периодах:		Зрелого возраста - 15
страдавшие СД 2 - 18 S100 В пренатальном и неонатальном периодах:		Пожилого и старческого возраста - 19
S100 В пренатальном и неонатальном периодах:		страдавшие СД1 - 5
		страдавшие СД2 - 18
Позднефетальный и неонатальный периоды - 8	S100	В пренатальном и неонатальном периодах:
\mathbf{I}		Позднефетальный и неонатальный периоды - 8

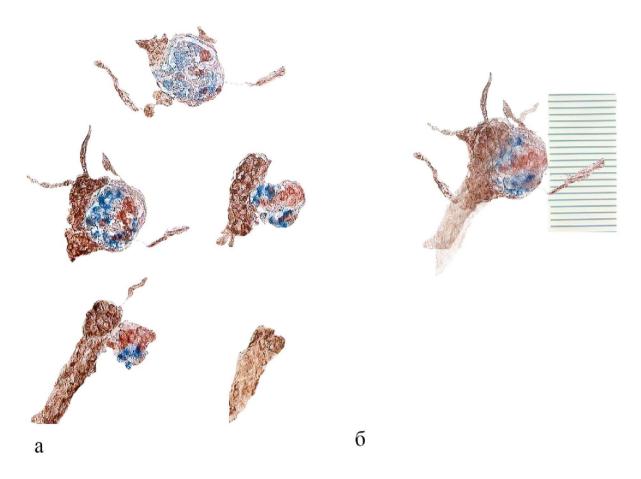
углеводного обмена -11 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 - 7 В пренатальном и неонатальном периодах: Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена -4	
Страдавшие СД2 - 7 GFAP В пренатальном и неонатальном периодах: Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями	
GFAP В пренатальном и неонатальном периодах: Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями	
Позднефетальный и неонатальный периоды - 8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями	
Взрослые люди, не страдавшие нарушениями	
углеводного обмена -4	И
страдавшие СД1 - 4	
NGF-r В пренатальном и неонатальном периодах:	
Позднефетальный и неонатальный периоды - 4	
Взрослые люди, не страдавшие нарушениям	И
углеводного обмена -4	
страдавшие СД1 - 4	
МВР В пренатальном и неонатальном периодах:	
Раннефетальный -2	
Среднефетальный период -2	
Позднефетальный и неонатальный периоды - 2	
Взрослые люди, не страдавшие нарушениям	И
углеводного обмена - 4	
страдавшие СД1 - 4	
РМР-22 В пренатальном и неонатальном периодах:	
Раннефетальный -2	
Среднефетальный период -2	
Позднефетальный и неонатальный периоды - 2	
Взрослые люди, не страдавшие нарушениям	И
углеводного обмена -4	
страдавшие СД1 - 4	
СD8 Взрослые люди, не страдавшие нарушениям	И
углеводного обмена -5	
страдавшие СД1 - 5	
CD16 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями	И
углеводного обмена -5	
страдавшие СД1 - 5	

CD20	Взрослые люди, не страдавшие нарушениями
	углеводного обмена -5
	страдавшие СД1 - 5
CD25	Взрослые люди, не страдавшие нарушениями
	углеводного обмена -5
	страдавшие СД1 - 5
CD71	Взрослые люди, не страдавшие нарушениями
	углеводного обмена -5
	страдавшие СД1 - 5
Б) Двойное	
неиммунофлуоресцентное ИГХ	
окрашивание	
Инсулин + глюкагон	В пренатальном и неонатальном периодах:
	Префетальный период - 10
	Раннефетальный период -15
	Среднефетальный период -8
	Позднефетальный и неонатальный периоды - 7
	Взрослые люди, не страдавшие нарушениями
	углеводного обмена:
	Зрелого возраста - 13
	Пожилого и старческого возраста - 21
	страдавшие СД1 - 5
	страдавшие СД2 -18
NSE + глюкагон	В пренатальном и неонатальном периодах:
	Префетальный период - 10
	Раннефетальный период -15
	Среднефетальный период -8
	Позднефетальный и неонатальный периоды - 7
	Взрослые люди, не страдавшие нарушениями
	углеводного обмена:
	Зрелого возраста - 13
	Пожилого и старческого возраста - 21
	страдавшие СД1 - 5

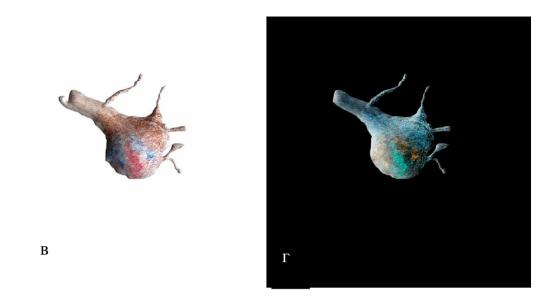
	страдавшие СД2 -18
NSE + инсулин	В пренатальном и неонатальном периодах:
·	Префетальный период - 10
	Раннефетальный период -15
	Среднефетальный период -8
	Позднефетальный и неонатальный периоды - 7
	Взрослые люди, не страдавшие нарушениями
	углеводного обмена:
	Зрелого возраста - 13
	Пожилого и старческого возраста - 21
	страдавшие СД1 - 5
	страдавшие СД2 -18
Инсулин + соматостатин	В пренатальном и неонатальном периодах:
•	Префетальный период - 10
	Раннефетальный период -15
	Среднефетальный период -8
	Позднефетальный и неонатальный периоды - 7
	Взрослые люди, не страдавшие нарушениями
	углеводного обмена:
	Зрелого возраста - 13
	Пожилого и старческого возраста - 21
	страдавшие СД1 - 5
	страдавшие СД2 -18
Инсулин + S100	В пренатальном и неонатальном периодах:
2000	Префетальный период - 10
	Раннефетальный период -15
	Среднефетальный период -8
	Позднефетальный и неонатальный периоды - 7
	Взрослые люди, не страдавшие нарушениями
	углеводного обмена:
	Зрелого возраста - 13

	Пожилого и старческого возраста - 21
	страдавшие СД1 - 5
	страдавшие СД2 -18
NSE + S100	В пренатальном и неонатальном периодах:
	Префетальный период - 10
	Раннефетальный период -15
	Среднефетальный период -8
	Позднефетальный и неонатальный периоды - 7
	Взрослые люди, не страдавшие нарушениями
	углеводного обмена:
	Зрелого возраста - 13
	Пожилого и старческого возраста - 21
	страдавшие СД1 - 5
	страдавшие СД2 -18
В) Тройное ИГХ окрашивание	
Неиммунофлуоресцентное	
Инсулин + глюкагон + S100	В пренатальном и неонатальном периодах:
	Префетальный период - 2
	Раннефетальный период -2
	Среднефетальный период -2
	Позднефетальный и неонатальный периоды - 2
Иммунофлуоресцентное	
Инсулин + глюкагон +DAPI	Взрослые люди, не страдавшие нарушениями
	углеводного обмена -5
	страдавшие СД1 - 3
Инсулин + S100+DAPI	В пренатальном и неонатальном периодах:
	Среднефетальный период -2
	Позднефетальный и неонатальный периоды - 2
Глюкагон + S100+DAPI	В пренатальном и неонатальном периодах:
	Среднефетальный период -2
	Позднефетальный и неонатальный периоды - 2

Схема 1. Пример построения дву- и трехмерных моделей нейроинсулярных комплексов ПЖ человека.



Окрашенные в тройной ИГХ реакции инсулин+глюкагон+ S100 серийные срезы ПЖ плодов человека фотографировали при увеличении объектива x40, используя систему видеозахвата. На каждой микрофотографии нейро-инсулярный комплекс вырезали при помощи программы Photoshop CS6 Extended (Adob Systems Incorporated, USA) (а). Затем изображения накладывали друг на друга по слоям, получая дву-мерную реконструкцию (б).



В той же программе делали трех-мерную модель (в,г) при помощи 3D инструментов.

Для построения точных реконструкций при разных увеличениях объектива используются те же принципы, что и при построении моделей, но по слоям накладываются выровненные кадры целиком. После чего в программах Image J 1.48v (NIH, USA) или приложения к Image - Fiji делали трехмерные реконструкции, которые потом записывали в формате видеофайлов.

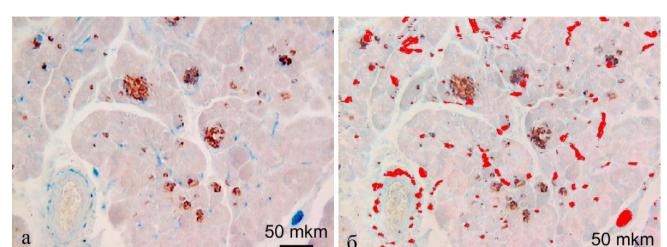


Схема 2. Пример измерения плотности распределения структур в образцах ПЖ.

Плотность иннервации определяли при помощи определения коэффициента заполненности площади кадра (КЗ) структурами нервной системы. Этот параметр вычисляется автоматически (программа ImageJ: версии 1.43u и 1.48v(NIH, USA)) и представляет собой отношение суммарной площади окрашенного в результате иммуногистохимической реакции материала в кадре к общей площади кадра.

а - Двойная ИГХ реакция на NSE + инсулин на срезе б - автоматическое выделение областей кадра, окрашенных синим (т.е. прореагировавшими с антителами к NSE)

Таблица 5 Общая характеристика методов морфометрических исследований

Задачи морфометрическо го исследования	Объектив	N образцов	Количество полей зрения	Объем выборки
Определение соотношения островков разного размера	х1.6 Размер кадра: 6х8 мм	30 плодов человека (10–40 недель гестационного развития): Префетальный период - 9 Раннефетальный период -10 Среднефетальный период -5 Позднефетальный и неонатальный и неонатальный периоды - 6 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена -9	Все доступные непересекающиеся поля зрения для каждого из образцов. На срезах, окрашенных антителами к инсулину, автоматически высчитывалась общая площадь и коэффициент заполненности (КЗ) кадра структурами определенного размера: меньше 40 мкм в диаметре, от 40 до 100 мкм в диаметре и свыше 100 мкм в диаметре	Проанализировано более 10 000 окрашенных дискретных единиц разного размера на срезах
Изучение динамики количества инсулин-, глюкагон- и соматостатин- содержащих клеток в пре- и постнатальном онтогенезе	х40 Размер кадра: 0,24х0,32 мм	В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 9 Раннефетальный период -11 Среднефетальный период -5 Позднефетальный и неонатальный периоды - 5 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена -6	По 7 непересекающихся полей зрения на образец. В каждом поле вручную подсчитывалось количество клеток в разных формах распределения эндокринной части ПЖ (одиночные клетки, кластеры, островки плащевого, биполярного и смешанного типов). У островков измеряли длинный	биполярных островках 6464 клетки в смешанных
Исследование зависимости васкуляризации островков от их размера	х40 Размер кадра: 0,24х0,32 мм	Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена - 10	диаметр. На 4 последовательных срезах, окрашенных антителами в реакциях:	120 островков

Определение зависимости клеточного состава островков от их размера	х40 Размер кадра: 0,24х0,32 мм	Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена - 10	инсулин+глюкагон NSE+глюкагон NSE+инсулин инсулин+стоматоста тин в 10 полях зрения для каждого образца измеряли площадь островков и синусов капилляров, Высчитывали среднее для обоих показателей для каждого островка, окрашенного разными способами. На срезах, окрашенных в двойных ИГХ реакциях: инсулин+глюкагон инсулин+стоматоста тин в 10 полях зрения на образец измеряли длинный диаметр островка и количество клеток разных типов и подсчитывали процентное соотношение В- клеток и А-клеток и В-клеток и D-клеток.	120 островков
Определение плотности распеределения структур нервной системы	х20 Размер кадра: 0.5х0.6 мм	В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 5 Раннефетальный период -5 Среднефетальный период -8 Позднефетальный и неонатальный и неонатальный периоды - 4 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена - 15	В префетальном периоде - все непересекающиеся поля зрения, в раннефетальном - по 5, далее - по 7 полей зрения. Для каждого образца высчитывалось среднее и данные заносились в таблицы.	Для каждого из образцов вычислен средний КЗ

Подсчет нейро-инсулярных комплексов	х10 Размер кадра: 1х1,25 мм	В пренатальном и неонатальном периодах: Префетальный период - 7 Раннефетальный период -16 Среднефетальный период -6 Позднефетальный и неонатальный периоды - 4 Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена - 15	Для пренатального периода развития все возможные непересекающиеся поля зрения Для взрослых людей по 7 полей зрения	В каждом поле зрения было вычислено число НИК1 и НИК2
Оценка общего количества островков и площади, занимаемой инсулин- и глюкагон- содержащими клетками в образцах ПЖ взрослых людей	х4 Размер кадра: 2,4х3.2 мм	Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена: Зрелого возраста - 5 Пожилого и старческого возраста - 6 страдавшие СД1 - 5 страдавшие СД2 -13	По 5 полей зрения для каждого образца: На срезах с реакцией на инсулин или глюкагон определяли общее число островков и площадь, занимаемую А- и В-клетками.	Среднее для каждого образца.
Изучение распределения крупных островков (диаметром более 100 мкм) при СД1	х1.6 Размер кадра: 6х8 мм	Взрослые люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена -9 Сд1 -5	Все доступные непересекающиеся поля зрения для каждого из образцов. На срезах, окрашенных антителами к инсулину автоматически высчитывалась общая площадь и КЗ кадра структурами определенного размера: меньше 40 мкм в диаметре, от 40 до 100 мкм в диаметре и свыше 100 мкм в диаметре	Проанализировано более 4 000 окрашенных структур разного размера на срезах. Вычислялось процентное соотношение количества островков свыше 100 мкм в диаметре и от 40 до 100 мкм в диаметре, а также процентное соотношение занимаемой ими площади
Исследование распределения	х4 Размер	Взрослые люди, не страдавшие	Количество островков (больше	Проанализировано более 1000

крупных островков (диаметром более 200 мкм) при старении и сахарном диабете 1 и 2 типа	кадра: 2,4x3.2 мм	нарушениями углеводного обмена: До 50 лет - 7 Старше 50 лет - 14 страдавшие СД1 - 4 страдавшие СД2 -17	зрения, затем высчитывалось среднее. Кроме этого вычислялся соотношение числа	окрашенных структур разного
1 и 2 типа		страдавшие СД2	среднее. Кроме этого	
			вычислялся соотношение числа	
			крупных островков к общему	
	10		количеству островков в кадре.	
Определение степени васкуляризации	x40 Размер кадра:	В позднефетальном и неонатальном	На срезах, окрашенных антителами в	По 20 островков на образец
островков у	0,24х0,32	периодах:	реакции на инсулин	
плодов от матерй с СД	MM	плоды от матерй с СД - 3 плоды - 4	измеряли площадь островков и синусов капилляров	

Таблица 6 Уровень значимости (р) в тесте Манна-Уитни при попарном сравнении размера островков разного типа в онтогенезе человека

Тип		Биполярные	Смешанные
островка			
	Плащевые		
Периоды			
ПрФп - РФп	0,772918	отсутствуют	отсутствуют
ПрФп - СрФп	0,747262	отсутствуют	отсутствуют
ПрФп - ПФп	0,715001	отсутствуют	отсутствуют
ПрФп - Взр	0,601509	отсутствуют	отсутствуют
РФп - СрФп	0,945118	0,142593	отсутствуют
РФп - ПФп	0,910573	0,240378	отсутствуют
РФп - Взр	0,760328	отсутствуют	отсутствуют
СрФп - ПФп	0,961493	0,574149	отсутствуют
СрФп - Взр	0,788282	отсутствуют	отсутствуют
ПФп - Взр	1,000000	отсутствуют	0,00

Таблица 7 Уровень значимости (р) в тесте Манна-Уитни при попарном сравнении соотношения числа островков разного размера в разных периодах онтогенеза человека

Диаметр	40-55 мкм	55-100 мкм	>100 мкм
	Тест Краскела – Уоллиса	Тест Краскела – Уоллиса	Тест Краскела – Уоллиса
Периоды	p=0,00	p=0,005	p=0,00
ПрФп - РФп	0,008	1,00	0,04
ПрФп - СрФп	0,01	0,4	0,04
ПрФп - ПФп	0,049	0,51	0,049
ПрФп - Взр	0,04	0,21	0,01
РФп - СрФп	0,02	0,02	0,27
РФп - ПФп	0,008	0,02	0,008
РФп - Взр	0,00	0,00	0,00
СрФп - ПФп	0,03	0,24	0,01
СрФп - Взр	0,00	0,02	0,00
ПФп - Взр	0,77	0,44	0,68

	Множественное сравнение по среднему рангу % соотношения числа					
	островков диа	аметром 40-55 м	км для всех пер	иодов развития	p = 0.0000	
	ПрФп РФп СрФп ПФп Взр					
ПрФп		0,001103	0,050043	1,000000	1,000000	
РФп	0,001103		1,000000	0,080501	0,000020	
СрФп	0,050043	1,000000		1,000000	0,047668	
ПФп	1,000000	0,080501	1,000000		1,000000	
Взр	1,000000	0,000020	0,047668	1,000000		

Множ	Множественное сравнение по среднему рангу % соотношения числа островков					
диаме	етром 55-10	0 мкм для всех п	ериодов развити	p = 0.0005		
	ПрФп РФп СрФп ПФп Взр					
ПрФп		1,000000	1,000000	1,000000	0,561175	
РФп	1,000000		0,610579	0,332943	0,000171	
СрФп	1,000000	0,610579		1,000000	0,439874	
ПФп	1,000000	0,332943	1,000000		1,000000	
Взр	0,561175	0,000171	0,439874	1,000000		

	Множественное сравнение по среднему рангу % соотношения числа островков диаметром свыше 100 мкм для всех периодов развития p =0,0 0000						
дпаме	ПрФп РФп СрФп ПФп Взр						
ПрФп		1,000000	1,000000	0,023177	0,003951		
РФп	1,000000		1,000000	0,060961	0,000551		
СрФп	1,000000	1,000000		0,258512	0,027877		
ПФп	0,023177	0,060961	0,258512		1,000000		
Взр	0,003951	0,000551	0,027877	1,000000			

Таблица 8 Уровень значимости (Р) в тесте Манна-Уитни при попарном сравнении площади, занимаемой островками разного размера в онтогенезе человека

Диаметр	40-55 мкм	55-100 мкм	>100 мкм
	Тест Краскела – Уоллиса	Тест Краскела – Уоллиса	Тест Краскела – Уоллиса
Периоды	p=0,00	p=0,12	p=0,00
ПрФп - РФп	0,71	1,00	0,04
ПрФп - СрФп	0,31	0,5	0,04
ПрФп - ПФп	0,049	0,83	0,049
ПрФп - Взр	0,53	0,45	0,01
РФп - СрФп	0,009	0,04	0,73
РФп - ПФп	0,008	0,21	0,008
РФп - Взр	0,00	0,36	0,00
СрФп - ПФп	0,01	0,03	0,01
СрФп - Взр	0,00	0,28	0,00
ПФп - Взр	0,53	0,06	0,06

	Множественное сравнение по среднему рангу суммарной площади (%) островков диаметром 40-55 мкм для всех периодов развития p =0,0000					
	ПрФп РФп СрФп ПФп Взр					
ПрФп		1,000000	1,000000	0,120463	0,037798	
РФп	1,000000		1,000000	0,011721	0,000009	
СрФп	1,000000	1,000000		0,336048	0,040175	
ПФп	0,120463	0,011721	0,336048		1,000000	
Взр	0,037798	0,000009	0,040175	1,000000		

Множественное сравнение по среднему рангу суммарной площади (%) островков диаметром 55-100 мкм для всех периодов развития p =0,1216

П	1	7 1	1 '' 1	1 /	
	ПрФп	РФπ	СрФп	ПФп	Взр
ПрФп		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
РФп	1,000000		0,536135	1,000000	1,000000
СрФп	1,000000	0,536135		0,187003	1,000000
ПФп	1,000000	1,000000	0,187003		0,772261
Взр	1,000000	1,000000	1,000000	0,772261	

Множественное сравнение по среднему рангу суммарной площади (%) островков диаметром свыше 100 мкм для всех периодов развития p = 0,0001

			<u> </u>	* '	
	ПрФп	РФп	СрФп	ПΦп	Взр
ПрФп		1,000000	1,000000	0,005981	0,009243
РФп	1,000000		1,000000	0,022198	0,009321
СрФп	1,000000	1,000000		0,062977	0,077083
ПФп	0,005981	0,022198	0,062977		1,000000
Взр	0,009243	0,009321	0,077083	1,000000	

Таблица 9 Уровень значимости (р) в тесте Манна-Уитни при попарном сравнении количества В-клеток в разных формах организации эндокринной части ПЖ в онтогенезе человека

Форма	одиночные		плащевые	биполярные	смешанные
организации	Тест	кластеры	Тест	Тест Краскела	
	Краскела –	Тест Краскела	Краскела –	–Уоллиса	
	Уоллиса	-Уоллиса	Уоллиса	p=0.08	
Периоды	p=0.00	p=0.00	p=0.02		
ПрФп - РФп	0.00	0.00	0.006	отсутствуют	отсутствуют
ПрФп - СрФп	0.00	0.00	0.006	отсутствуют	отсутствуют
ПрФп - ПФп	0.16	0.00	0.055	отсутствуют	отсутствуют
ПрФп - Взр	нд	0.098	0.06	отсутствуют	отсутствуют
РФп - СрФп	0.17	0.89	0.13	0.057	отсутствуют
РФп - ПФп	0.01	0.91	0.22	0.33	отсутствуют
РФп - Взр	нд	0.00	0.2	отсутствуют	отсутствуют
СрФп - ПФп	0.008	0.99	0.71	0.09	отсутствуют
СрФп - Взр	нд	0.00	0.41	отсутствуют	отсутствуют
ПФп - Взр	нд	0.00	0.78	отсутствуют	0,02

	Множественное сравнение по среднему рангу количества одиночных						
	инсулин-содержащих клеток для всех периодов развития $p = 0,0001$						
	ПрФп	РФп	СрФп	ПΦп	Взр		
ПрФп		0,000353	0,073690	1,000000			
РФп	0,000353		1,000000	0,032985	0,000353		
СрФп	0,073690	1,000000		0,164327	0,073690		
ПФп	1,000000	0,032985	0,164327		1,000000		
Взр		0,000353	0,073690	1,000000			

Мноя	Множественное сравнение по среднему рангу количества инсулин-содержащих							
клето	клеток в кластерах для всех периодов развития р =0,0509							
	ПрФп РФп СрФп ПФп Взр							
ПрФп		0,796652	0,603841	0,861533	1,973606			
РФп	0,796652		1,976730	1,673796	2,392258			
СрФп	0,603841	1,976730		0,507772	1,815861			
ПФп	0,861533	1,673796	0,507772		1,454224			
Взр	1,973606	2,392258	1,815861	1,454224				

Множественное сравнение по среднему рангу количества инсулин-содержащих клеток в плащевых островках для всех периодов развития p = 0,0072

	ПрФп	РФп	СрФп	ПФп	Взр
ПрФп		0,030311	0,788804	1,000000	1,000000
РФп	0,030311		0,232277	1,000000	1,000000
СрФп	0,788804	0,232277		1,000000	1,000000
ПФп	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
Взр	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

Множественное сравнение по среднему рангу							
КС	оличества и	нсулин-содержаг	цих клеток в				
бі	иполярных	островках для вс	ех периодов				
	1	развития р=0.08					
	РФп	СРФп	ПФп				
РФп		0,170704	0,992796				
СрФп	СрФп 0,170704 0,260202						
ПΦп							

Таблица 10 Уровень значимости (р) в тесте Манна-Уитни при попарном сравнении количества А-клеток в разных формах организации эндокринной части ПЖ в онтогенезе человека

Форма			плащевые	биполярные	смешанные
организации	одиночные	кластеры	Тест	Тест Краскела	
	Тест Краскела	Краскела –	Краскела –	-Уоллиса	
	-Уоллиса	Уоллиса	Уоллиса	p=0.30	
Периоды	p=0,3891	p=0.4555	p=0.2759		
ПрФп - РФп	0,166121	0,493843	0,144421	отсутствуют	отсутствуют
ПрФп - СрФп	0,509652	0,432859	0,145939	отсутствуют	отсутствуют
ПрФп - ПФп	0,427279	0,203880	0,416092	отсутствуют	отсутствуют
ПрФп - Взр	нд	нд	0,254451	отсутствуют	отсутствуют
РФп - СрФ	0,378739	0,870109	0,739502	0,187454	отсутствуют
РФп - ПФ	0,640429	0,227875	0,246386	0,688665	отсутствуют
РФп - Взр	нд	нд	0,444094	отсутствуют	отсутствуют
СрФп - ПФп	0,271900	0,279909	0,129326	0,316503	отсутствуют
СрФп - Взр	нд	нд	0,473290	отсутствуют	отсутствуют
ПФп - Взр	нд	нд	0,224766	отсутствуют	0,004938

	Множественное сравнение по среднему рангу количества						
	одиночных глюкагон-содержащих клеток для всех периодов						
	развития p=0,3891						
	ПрФп	РФп	СрФп	ПФп			
ПрФп		0,933132	1,000000	1,000000			
РФп	0,933132		1,000000	1,000000			
СрФп	1,000000	1,000000		1,000000			
ПФп	1,000000 1,000000 1,000000						

Мнои	Множественное сравнение по среднему рангу количества							
глюка	глюкагон-содержащих клеток в кластерах для всех периодов							
разви	тия р=0.45	55						
	ПрФп РФп СрФп ПФп							
ПрФп		1,000000	1,000000	0,800386				
РФп	1,000000		1,000000	1,000000				
СрФп	1,000000	1,000000		1,000000				
ПФп	0,800386	1,000000	1,000000					

Множественное сравнение по среднему рангу количества глюкагон-содержащих клеток в плащевых островках для всех периодов развития p=0.2759

	ПрФп	РΦп	СрФп	ПΦп	Взр
ПрФп		1,000000	1,000000	1,000000	0,926653
РФп	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
СрФп	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
ПФп	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
Взр	0,926653	1,000000	1,000000	1,000000	

Множественное сравнение по среднему рангу						
ко	личества гл	юкагон-содержа	щих клеток в			
бі	иполярных	островках для вс	ех периодов			
]	развития р=0.30				
	РФп	СРФп	ПФп			
РФп		0,543169	1,000000			
СрФп	СрФп 0,543169 0,914993					
ПФп	ПФп 1,000000 0,914993					

Таблица 11 Уровень значимости в тесте Манна-Уитни при попарном сравнении количества D-клеток в разных формах организации эндокринной части ПЖ в онтогенезе человека

Форма организации Периоды	одиночные Тест Краскела –Уоллиса p=0.00	кластеры Тест Краскела – Уоллиса p=0.004	плащевые Тест Краскела –Уоллиса p=0.008	биполярные Тест Краскела –Уоллиса p=0.0579	смешанные
ПрФп - РФп	0.08	0.049	0.2	отсутствуют	отсутствуют
ПрФп - СрФп	0.00	0.002	0.48	отсутствуют	отсутствуют
ПрФп - ПФп	0.06	0.007	0.86	отсутствуют	отсутствуют
ПрФп - Взр	нд	0.004	0.06	отсутствуют	отсутствуют
РФп - СрФп	0.00	0.09	0.06	0.21	отсутствуют
РФп - ПФп	0.27	0.12	0.2	0.03	отсутствуют
РФп - Взр	нд	0.11	0.004	отсутствуют	отсутствуют
СрФп - ПФп	0.11	0.68	0.65	0.12	отсутствуют
СрФп - Взр	нд	0.28	0.008	отсутствуют	отсутствуют
ПФп - Взр	нд	0.37	0.055	отсутствуют	0,23

	Множественное сравнение по среднему рангу количества одиночных соматостатин-содержащих клеток для всех периодов развития р =0,0000					
	соматостатин	 содержащих кл	іеток для всех п	ериодов развити	p = 0,0000	
	ПрФп	РФп	СрФп	ПΦп	Взр	
ПрФп		0,246596	0,000001	0,432620		
РФп	0,246596		0,000072	1,000000	0,246596	
СрФп	0,000001	0,000072		1,000000	0,000001	
ПФп	0,432620	1,000000	1,000000		0,432620	
Взр		0,246596	0,000001	0,432620		

Мноя	Множественное сравнение по среднему рангу количества соматостатин -						
содер	содержащих клеток в кластерах для всех периодов развития $p = 0.0043$						
	ПрФп РФп СрФп ПФп Взр						
ПрФп		0,609713	0,015219	0,074165	0,214608		
РФп	0,609713		0,887451	1,000000	1,000000		
СрФп	0,015219	0,887451		1,000000	1,000000		
ПФп	0,074165	1,000000	1,000000		1,000000		
Взр	0,214608	1,000000	1,000000	1,000000			

Множественное сравнение по среднему рангу количества соматостатин - содержащих клеток в плащевых островках для всех периодов развития p = 0.0167

	ПрФп	РΦп	СрФп	ПΦп	Взр
ПрФп		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
РФп	1,000000		1,000000	1,000000	0,025173
СрФп	1,000000	1,000000		1,000000	0,038217
ПФп	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
Взрп	1,000000	0,025173	0,038217	1,000000	

Множественное сравнение по среднему рангу						
	количества соматостатин-содержащих клеток в					
	биполярных островках для всех периодов					
	-	азвития р=0.0579	-			
	РФ	СрФ	ПФ			
ΡФ		0,620512	0,089446			
СрФ	0,620512		0,330524			
ПФ	0,089446	0,330524				

Таблица 12

Уровень значимости (р) в тесте Манна-Уитни при попарном сравнении соотношения числа В-клеток к общему количеству В- и А-клеток (в %) в разных формах организации эндокринной части ПЖ в онтогенезе человека

Форма	одиночные	кластеры	плащевые	биполярные	смешанные
организации	Тест	Тест	Тест	Тест	
	Краскела –	Краскела –	Краскела –	Краскела –	
	Уоллиса	Уоллиса	Уоллиса	Уоллиса	
Периоды	p=0.15	p=0.9737	p=0.0074	p = 0.2427	
ПрФп - РФп	0,079422	0,867632	0,774739	отсутствуют	отсутствуют
ПрФп - СрФп	0,921212	0,692238	0,365048	отсутствуют	отсутствуют
ПрФп - ПФп	0,386477	0,829176	1,000000	отсутствуют	отсутствуют
ПрФп - Взр	нд	нд	0,110613	отсутствуют	отсутствуют
РФ п- СрФп	0,057266	0,760409	0,200484	0,121424	отсутствуют
РФ п- ПФп	0,937948	0,858955	0,424801	0,763795	отсутствуют
РФп - Взр	нд	нд	0,005496	отсутствуют	отсутствуют
СрФп - ПФп	0,236724	1,000000	0,041763	0,63	отсутствуют
СрФп - Взр	нд	нд	0,001538	отсутствуют	отсутствуют
ПФп - Взр	нд	нд	0,015187	отсутствуют	0,949060

конМ	Множественное сравнение по среднему рангу соотношения					
числа	числа одиночных В-клеток к общему числу одиночных В- и А-					
клеток (в %) для всех периодов развития р =0,1514						
	ПрФп	РФп	СрФп	ПФп		

	ПрФп	РФп	СрФп	ПФп
ПрФп		1,000000	0,008932	0,455996
РФп	1,000000		0,000006	0,138458
СрФп	0,008932	0,000006		1,000000
ПФп	0,455996	0,138458	1,000000	
Взр		1,000000	0,008932	0,455996

Множественное сравнение по среднему рангу соотношения числа В-клеток к общему числу В- и А-клеток (в %) в кластерах для всех периодов развития p=0,9737

	ПрФп	РФп	СрФп	ПФп
ПрФп		1,000000	1,000000	1,000000
РФп	1,000000		1,000000	1,000000
СрФп	1,000000	1,000000		1,000000
ПФп	1,000000	1,000000	1,000000	
Взр		1,000000	1,000000	1,000000

Множественное сравнение по среднему рангу соотношения числа В-клеток к общему числу В- и А-клеток (в %) в плащевых островках для всех периодов развития p = 0.0074

	ПрФп	РΦп	СрФп	ПФп	Взр
ПрФп		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
РФп	1,000000		1,000000	1,000000	0,059157
СрФп	1,000000	1,000000		0,552198	0,004184
ПФп	1,000000	1,000000	0,552198		0,392794
Взр	1,000000	0,059157	0,004184	0,392794	

Множественное сравнение по среднему рангу соотношения числа В-клеток к общему числу Ви А-клеток (в %) в биполярных островках для всех периодов развития р =0,2427

		<u> </u>	
	РФп	СрФп	ПФп
РФп		0,360978	1,000000
СрФп	0,360978		1,000000
ПФп	1,000000	1,000000	

Уровень значимости (р) в тесте Манна-Уитни при попарном сравнении соотношения числа В-клеток к общему числу В- и D-клеток (в %) в разных формах организации эндокринной части ПЖ в онтогенезе человека

Форма	одиночные	кластеры	плащевые	биполярные	смешанные
организации	Тест	Тест	Тест	Тест	
	Краскела –	Краскела –	Краскела –	Краскела –	
	Уоллиса	Уоллиса	Уоллиса	Уоллиса	
Периоды	p=0.00	p=0.05	p=0.00	p=0.01	
ПрФп - РФп	0,09	0.41	0.00	отсутствуют	отсутствуют
ПрФп - СрФп	0.00	0.53	0.01	отсутствуют	отсутствуют
ПрФп - ПФп	0.03	0.42	0.02	отсутствуют	отсутствуют
ПрФп - Взр	нд	0.03	0.14	отсутствуют	отсутствуют
РФп - СрФп	0.00	0.049	0.00	0.003	отсутствуют
РФп - ПФп	0,03	0.09	0.03	0.21	отсутствуют
РФп - Взр	нд	0.02	0.00	отсутствуют	отсутствуют
СрФп - ПФп	0.97	0.59	0.17	0,63	отсутствуют
СрФп - Взр	нд	0.07	0.00	отсутствуют	отсутствуют
ПФп - Взр	нд	0.09	0.047	отсутствуют	0,02

Множественное сравнение по среднему рангу соотношения числа одиночных В-клеток к общему числу одиночных В- и D-клеток (в %) для всех периодов развития p = 0000

	ПрФп	РФп	СрФп	ПΦп	Взр
ПрФп		1,000000	0,008932	0,455996	
РФп	1,000000		0,000006	0,138458	1,000000
СрФп	0,008932	0,000006		1,000000	0,008932
ПФп	0,455996	0,138458	1,000000		0,455996
Взр		1,000000	0,008932	0,455996	

Множественное сравнение по среднему рангу соотношения числа В-клеток к общему числу В- и D-клеток (в %) в кластерах для всех периодов развития p=0,0509

-					
	ПрФп	РФп	СрФп	ПФп	Взр
ПрФп		1,000000	1,000000	1,000000	0,484266
РФп	1,000000		0,480722	0,941707	0,167451
СрФп	1,000000	0,480722		1,000000	0,693917
ПФп	1,000000	0,941707	1,000000		1,000000
Взр	0,484266	0,167451	0,693917	1,000000	

Множественное сравнение по среднему рангу соотношения числа В-клеток к общему числу В- и D-клеток (в %) в плащевых островках для всех периодов развития p = 0.000

	ПрФп	РФп	СрФп	ПΦп	Взр
ПрФп		0,020433	0,362098	1,000000	1,000000
РФп	0,020433		0,087195	0,270339	0,001827
СрФп	0,362098	0,087195		1,000000	0,087575
ПФп	1,000000	0,270339	1,000000		1,000000
Взр	1,000000	0,001827	0,087575	1,000000	

Множественное сравнение по среднему рангу соотношения числа В-клеток к общему числу Ви D-клеток (в %) в биполярныхх островках для всех периодов развития p = 0,01РФп СрФп ПФп
РФп 0,002914 1,000000

	РФп	СрФп	ПΦп
РФп		0,002914	1,000000
СрФп	0,002914		1,000000
ПФп	1,000000	1,000000	

Таблица 14

Количество крупных островков (диаметром более 200 мкм) при старении и сахарном диабете 1 и 2 типа (в кадре 2,4х3.2 мм), Ме (q1-q3)

Группы	Люди, не	Люди, не	Люди,	Люди,	Тест
наблюдений	страдавшие	страдавшие	страдавшие	страдавшие	Краскела
	нарушениями	нарушениями	СД1, в	Сд2, в	–Уоллиса
	углеводного	углеводного	возрасте до 50	возрасте	
	обмена, в	обмена, в	лет	после 50 лет	
Показатели	возрасте до 50	возрасте			
	лет	старше 50 лет			
Общее	11,30	30,50	9,50	25,45	p=0,00
количество	(9,50-18,44)	(20,20-36,60)	(7,45-11,60)	(17,20-32,60)	
островков					
Островки	0,23	2,33	1,43	1,955	p=0,04
диаметром	(0,065-0,915)	(1,50-3,00)	(0,80-1,93)	(1,32-4,15)	
свыше 200 мкм					

Уровень значимости (P) в тесте Манна-Уитни при попарном сравнении распределения крупных островков при старении и сахарном диабете 1и					
2 типов	2 типов				
		Островки диаметром свыше			
	Общее количество островков	200 мкм			
до 50 - старше 50	0,019	0,03			
СД1 - до 50	0,39	0,05			
СД1 -старше 50	0,004	0,16			
СД2 - до 50	0,03	0,01			
СД2 - старше50	0,38	0,97			
СД1 - СД2	0,003	0,20			

Таблица 15 Площадь, занимаемая структурами нервной системы (в процентах от площади кадра) в онтогенезе человека, Ме (q1-q3)

Периоды	Площадь структур нервной
развития	системы
прфп	0,7555 (0-1,9315)
рфп	1,3565 (0,851-1,935)
срфп	2,382 (1,643-3,665)
пфп	1,647 (1-2,33)
взр	0,39 (0,287-0,467)

Уровень значимости (P) в тесте Манна-Уитни при попарном сравнении площади занимаемой структурами нервной системы в онтогенезе человека. Тест Краскела -Уоллиса р =0,0000

ПрФп - РФп	0,315875
ПрФп - СрФп	0,007733
ПрФп - ПФп	0,087670
ПрФп - Взр	1,000000
РФп - СрФп	0,006371
РФп - ПФп	0,203226
РФ п- Взр	0,000166
СрФп - ПФп	0,042106
СрФп - Взр	0,000017
ПФп - Взр	0,000023