

На правах рукописи

Прощина Александра Евгеньевна

**МОРФОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ
ЭНДОКРИННОЙ ЧАСТИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
ЧЕЛОВЕКА**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук**

Москва 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека»

Научный консультант:

Савельев Сергей Вячеславович, доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Гуревич Лариса Евсеевна, доктор биологических наук, профессор, в.н.с. патологоанатомического отделения ГБУЗ МО "Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского"

Голиченков Владимир Александрович, доктор биологических наук, профессор, профессор каф. эмбриологии биологического факультета ФГБОУ ВО "Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова"

Худоерков Рудольф Михайлович, доктор медицинских наук, зав. лаб. функциональной морфохимии ФГБНУ "Научный центр неврологии"

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ»)

Защита диссертации состоится «___» _____ 2017 года в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 001.004.01 при ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека». С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» (117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3) или на сайте www.morfolhum.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2017 года

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук

Лилия Петровна Михайлова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Проблема пластичности эндокринной части поджелудочной железы (ПЖ) является одной из актуальнейших в современной морфологии. Под пластичностью понимают способность тканей изменять структурно-функциональную организацию под влиянием экзогенных и эндогенных факторов. Эти изменения могут быть как приспособительными, компенсаторными, так и патологическими (Крыжановский Г.Н., 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 С., Ktorza А., 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 (Karam 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 изучены недостаточно (Аметов А.С., 2008; Bernard-Kargar С., Ktorza А., 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. Эффективный контроль СД может свести до минимума или предотвратить многие его осложнения. Однако, колоссальные экономические затраты и социальный ущерб, связанные с высокой распространенностью СД, ранней инвалидизацией и смертностью (Дедов И.И., Шестакова М.В., Викулова О.К., 2015; Дедов И.И. и др., 2016), обуславливают необходимость разработки методов возобновления естественного пула В-клеток для восстановления нормальной функции эндокринной части ПЖ. В настоящее время ведется разработка методов лечения СД при помощи пересадки ПЖ, островков или В-клеток островков ПЖ и конструкций, функционирующих на принципах гормональной регуляции углеводного обмена (Дедов И.И., Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., 2004). Для выделения подходящих для трансплантации островков 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 человека обуславливает 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.

Цель исследования: изучить морфогенетическую пластичность эндокринной части поджелудочной железы человека в пре- и постнатальном онтогенезе и при нарушениях углеводного обмена.

Задачи исследования:

1. Исследовать проявления пластичности в формировании и распределении разных типов структурной организации эндокринной части 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, страдавших сахарным диабетом 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 сахарным диабетом.

Теоретическая и практическая значимость. Выявленные 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 нецелесообразно 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 этого заболевания.

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 панкреатических 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 сравнением результатов их работ с данными, полученными в ходе диссертационного исследования. В работе использованы следующие методы: гистологическое и иммуногистохимическое окрашивание, световая, флуоресцентная и конфокальная микроскопия, конкурентный 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.

Результаты и основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на Всероссийской конференции с международным участием «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-практической конференции «Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли» (2010), на X, XI и XIII конгрессах Международной Ассоциации Морфологов (2010, 2012, 2016), на Научно-практической конференции с международным участием "Терапевтическая школа С. П. Боткина и ее вклад в развитие отечественной клинической медицины" (2012), на IV 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», посвященной 115-летию со дня рождения академика Д.М. Голуба (2016), межлабораторной конференции ФБГНУ "НИИ морфологии человека" (июнь, 2016). Часть исследования поддержана грантом РФФИ № 15-04-03155а "Строение нейроинсулярных комплексов и их роль в формировании островков Лангерганса поджелудочной железы человека"

Личное участие автора заключалось в планировании и проведении исследования, статистической обработке, обобщении и анализе полученных результатов, подготовке публикаций.

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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Характеристика материала. Исследование эндокринной части поджелудочной железы человека проведено на аутопсийном материале 112 ПЖ из коллекции лаборатории развития нервной системы ФГБНУ "Научно-исследовательский институт морфологии человека".

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. Для морфометрического и статистического анализа использована классификация внутриутробного развития (Милованов А.П., Савельев С.В., 2006), по которой плодный период развития человека разделен на четыре подпериода: предплодный (10-12 недель гестационного развития (нед.), раннефетальный (13-20), среднефетальный (21-28) и позднефетальный (29-40) (таблица 1). Для морфометрического исследования были объединены данные по ПЖ плодов позднефетального периода развития и новорожденных. Из исследованных образцов выделена группа, представленная материалом 5 ПЖ плодов и новорожденных от матерей с сахарным диабетом различного генеза.

Таблица 1

Распределение аутопсийного материала по периодам пренатального развития

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

Для исследования ПЖ взрослых людей, не страдавших нарушениями углеводного обмена, использованы аутопсийные образцы ПЖ 47 взрослых людей (возраст от 22 до 90 лет). Также

исследованы образцы ПЖ 5 лиц, страдавших при жизни, по клиническим данным, СД1 (возраст от 27 до 66 лет) и 18 – СД2 (возраст от 42 до 82 лет) (таблица 2).

Таблица 2

Распределение аутопсийного материала взрослых людей по наличию нарушений углеводного обмена и возрастным периодам

Группы исследования взрослых людей	Лица зрелого возраста	Лица пожилого и старческого возраста
Не страдавшие заболеваниями поджелудочной железы и нарушениями углеводного обмена	22	25
СД1	4	1
СД2	3	15

Клиническое исследование остаточной секреции инсулина проведено у 300 пациентов с длительным течением СД1, в возрасте от 18 до 55 лет, 132 мужчин и 168 женщин, с длительностью заболевания от 20 лет до 40 лет. Клиническое обследование проводилось в 1 клинике терапии (усовершенствования врачей) им. Н.С. Молчанова Военно-медицинской академии (Санкт-Петербург) в 2012-2013 гг.

Методы исследования

Гистологическое исследование. Материал фиксировали в 10%-м кислом или нейтральном формалине. Часть образцов ПЖ взрослых людей зафиксирована в жидкостях Карнуа или Буэна. Для приготовления гистологических препаратов использовали: желудочно-кишечный тракт плодов 10-11-ти-недельного возраста; целую ПЖ плодов с 12-й по 23-ю нед.; кусочки из хвостовой части ПЖ размером до 1x1x0,5 см после 24-й нед. и взрослых людей. Для всех исследованных образцов приготовлены обзорные гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином. Для выявления морфологических изменений эндокринной части ПЖ у людей, страдавших СД, были приготовлены препараты, окрашенные конго красным (выявление амилоида) и по Маллори (выявление соединительной ткани).

Иммуногистохимическое исследование.

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование проводили на сериях срезов (от 10 до 20 срезов на образец, всего ИГХ методами

изучено 1200 срезов). Характеристики использованных антител и условия проведения реакций приведены в таблице 3.

Таблица 3

Характеристика использованных антител и условия проведения иммуногистохимических реакций

Антитела	Фирма производитель	Демаскирование антигена	Рабочие разведения	Инкубация
Мышиные моноклональные антитела (ММА) к инсулину,	“Sigma”	нет	1:16000	45 мин. при комнатной температуре (КТ)
ММА к инсулину	«ThermoScientific»	нет	1:400,	45 мин. при КТ
Кроличьи поликлональные антитела (КПА) к инсулину	«Santa Cruz»	нет	1: 1000	45 мин. при КТ
ММА к глюкагону,	“Sigma”	нет	1:16000	45 мин. при КТ
КПА к глюкагону	«ThermoScientific»	нет	1:100	45 мин. при КТ
КПА к соматостатину	«ThermoScientific»	нет	1:100	45 мин. при КТ
ММА к нейронспецифической енолазе (NSE), клон E27	«ThermoScientific»	нет	1:200	45 мин. при КТ
КПА к белку S-100	"Neomarkers. ThermoScientific"	нет	1:100,	45 мин. при КТ
ММА к рецептору фактора роста нервов p-75 (NGF-r)	"Neomarkers. ThermoScientific"	нет	Готовые к использованию	60 мин. при КТ
ММА к кислому глиальному фибриллярному белку (GFAP)	"Neomarkers. ThermoScientific"	нет	Готовые к использованию	60 мин. при КТ
КПА к основному белку миелина (MBP)	"Neomarkers. ThermoScientific"	нет	Готовые к использованию	60 мин. при КТ
КПА к периферическому белку миелина (PMP-22)	"Neomarkers. ThermoScientific"	нет	Готовые к использованию	60 мин. при КТ

кроличьи, эпитопспецифичные антитела к кластеру дифференцировки CD8	Lab Vision Corp, NeoMarkers	Кипячение срезов в 0,01М цитратном буфере в течение 10 мин	Готовые к использованию	20 мин при КТ
ММА к CD16	Lab Vision Corp, NeoMarkers	Кипячение срезов в 0,01М цитратном буфере в течение 10 мин	Готовые к использованию	120 мин при КТ
ММА к CD20	Lab Vision Corp, NeoMarkers	нет	Готовые к использованию	60 мин при КТ
ММА к CD25	Lab Vision Corp, NeoMarkers	Кипячение срезов в 0,01М цитратном буфере в течение 10 мин	Готовые к использованию	60 мин при КТ
ММА к CD71	Lab Vision Corp, NeoMarkers	Кипячение срезов в 0,01М цитратном буфере в течение 10 мин	Готовые к использованию	120 мин при КТ

В качестве вторых антител использовали систему визуализации UltraVision Detection System Anti-polyvalent, HRP/DAB (Lab Vision) согласно протоколу производителя. На заключительном этапе срезы обрабатывали раствором хромогена (DAB, Lab Vision).

Для более детального изучения распределения в ПЖ человека основных гормонов эндокринной части и пан-нейрональных маркеров были проведены реакции множественного (multiple) ИГХ окрашивания. В работе использованы антитела и системы детекции фирмы «ThermoScientific» (если не указано другое).

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

- инсулин (ММА) + глюкагон (КПА)
- NSE (ММА) + глюкагон (КПА)
- NSE (ММА) + инсулин (КПА, «Santa Cruz»)
- инсулин (ММА) + соматостатин (КПА)
- инсулин (ММА) + S-100 (КПА)
- NSE (ММА) + S-100 (КПА)

Для выявления указанных антигенов использована система детекции MultiVision Polymer Detection System: MultiVision anti-rabbit/HRP + anti-mouse/AP polymers.

Для выявления трехмерной структуры нейроинсулярных комплексов и распределения нервов на серийных срезах плодов разного срока развития было проведено тройное ИГХ окрашивание в реакциях на инсулин (КПА, («Santa Cruz»), глюкагон (ММА, «Sigma») и S100 (КПА). Для выявления указанных антигенов были одновременно использованы системы детекции MultiVision Polymer Detection System: MultiVision anti-rabbit/HRP + anti-mouse/AP polymers и UltraVision Detection System Anti-rabbit, HRP/DAB. С той же целью проведено иммунофлуоресцентное окрашивание с применением ММА к инсулину и глюкагону («Sigma») и белку S100 (КПА). Вторые антитела в этом случае были козы антитела против мыши (FITC) и против кролика (TRITC) («Santa Cruz»). Окраску ядер проводили при помощи DAPI («Santa Cruz»).

Для исследования колокализации инсулина и глюкагона в эндокринных клетках было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание на срезах ПЖ людей (как без нарушений углеводного обмена, так и с СД1) с применением первичных антител к инсулину (ММА или КПА «Santa Cruz») и глюкагону (ММА «Sigma» или КПА). Вторыми антителами были Goat anti-mouse IgG-F(ab')₂-TRITC («Santa Cruz») и Goat anti-rabbit IgG-F(ab')₂-FITC («Santa Cruz»). Окраска ядер проводилась при помощи DAPI («Santa Cruz»).

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

Основное внимание было направлено на изучение островков Лангерганса: их количество в поле зрения, форма островка, особенности расположения гормон-содержащих клеток внутри островка, форма эндокринных клеток, колокализация гормонов и нейральных маркеров в клетках островков, особенности иннервации и васкуляризации. Для более полного исследования структуры нейроинсулярных комплексов для части образцов были сделаны трехмерные реконструкции при помощи программ (в зависимости от способа окраски и видеозахвата) Photoshop CS6 Extended (Adob Systems Incorporated, США), Image J 1.48v (НИН, США) и приложения к Image - Fiji.

Морфометрическое исследование. Полученные препараты фотографировали с применением видеозахвата. Увеличение объектива подбирали в зависимости от цели исследования. Морфометрический анализ проведен на микрофотографиях как непосредственно оператором, так и полуавтоматическим способом при помощи программ Scion Image (Scion corporation, США) или ImageJ 1.43u и 1.48v (NIH, США). Определяли следующие морфометрические параметры ПЖ человека: плотность распределения островков разного размера, соотношение количества островков разного размера, зависимость васкуляризации островков от их размера, плотность распределения крупных островков (диаметром более 200 мкм), распределение различных видов гормон-содержащих клеток, соотношение содержания разных видов эндокринных клеток в островках разного размера, динамика количества инсулин-, глюкагон- и соматостатин-содержащих клеток в развитии, плотность распределения структур нервной системы, подсчет нейроинсулярных комплексов (как первого, так и второго типов).

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

Определение концентрация в периферической крови глюкагона, С-пептида и антител к инсулину. 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). Концентрацию С-пептида, антител к инсулину определяли методом иммунорадиометрического анализа с использованием наборов фирмы "IMMUNOTECH" (Франция)*.

Статистический анализ. Статистические расчеты и построение графиков проводились при помощи программ Statistica 6.0, NCSS 2004 (Statsoft Inc., Tulsa, США) и, позднее, Trial Version Statistica 13.2 (Dell Inc., США). Для оценки статистической значимости различий сравниваемых выборок применяли непараметрические методы.

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

Обработку для качественных показателей проводили по точному методу Фишера. Для сопоставления одновременно больше чем 2 выборок был использован тест Краскела-Уоллиса, а для попарного сравнения использован тест Манна–Уитни. При необходимости сравнения нескольких групп одновременно вносили поправку Бонферрони, согласно А.М. Гржибовскому (2008), или применяли метод множественного сравнения по среднему рангу для всех групп (Trial Version Statistica 13.2, Dell Inc., США). Для описания материала использованы понятия медианы (Me) и перцентилей: 25П (q1 – нижний квартиль) и 75П (q3 – верхний квартиль). Исследование взаимосвязи между количественными признаками осуществляли при помощи парного коэффициента линейной корреляции Спирмена (r). Во всех процедурах статистического анализа рассчитывали достигнутый уровень значимости (p), при этом критический уровень значимости в данном исследовании принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Морфогенез эндокринной части поджелудочной железы человека. В префетальном периоде в ПЖ человека выявлены только одиночные эндокринные клетки и их небольшие скопления (кластеры). Уже на 10 нед., обнаружены инсулин-, глюкагон- и соматостатин-содержащие клетки. С 12-й нед. в ПЖ присутствуют морфологически оформленные панкреатические островки плащевого типа, содержащие А- и D-клетки на периферии островка. С 14 нед. гр были обнаружены биполярные островки (А- и D-клетки формируют один полюс островка, а В-клетки другой) и крупные гомогенные кластеры В- и А- или D-клеток, тесно контактирующие друг с другом, что соответствует данным литературы (Фалин Л.И., 1966; Кривова Ю.С., 2010; Jeon J. et al., 2009). Однако, анализ серийных срезов показал, что эти кластеры представляют собой биполярные островки. Типичные для взрослых крупные островки, в которых А- и D- клетки расположены не только на периферии, но и внутри островков появляются в конце среднефетального периода (после 25-й недели), их количество к рождению нарастает.

Таким образом, при развитии ПЖ человека последовательно появляются различные морфологические формы организации эндокринной части. Обнаруженные нами формы организации эндокринной части описаны в филогенезе ПЖ (Елецкий Ю.К., Яглов В.В., 1978). Однако наши данные позволили установить, что эти

формы не сменяют друг друга, а существуют одновременно, появляясь по мере развития ПЖ человека.

По нашим данным первые эндокринные клетки появляются в протоках в центральной части развивающейся ПЖ человека. Наиболее крупные панкреатические островки в пре- и раннефетальном периодах развития также располагаются в центральной области (вокруг главного протока - *ductus pancreaticus*), одиночные эндокринные клетки и небольшие кластеры локализованы преимущественно на периферии ПЖ, что соответствует данным литературы (Polak M. et al., 2000; Jeon J. et al., 2009). Таким образом, в развитии эндокринной части ПЖ человека наблюдается гетерохронность созревания, которая может быть физиологическим резервом для адаптации к повышению метаболической нагрузки.

На срезах ПЖ взрослых людей, не страдавших нарушениями углеводного обмена, было обнаружено несколько основных вариантов распределения гормон-синтезирующих клеток: одиночные эндокринные клетки и их небольшие кластеры. Кроме этого были выявлены островки с плащевым распределением клеток. Более крупные островки содержат глюкагон- и соматостатин-позитивные клетки внутри островка и, таким образом, могут быть причислены к смешанному типу. Биполярные островки у взрослых людей не выявлены.

Диаметр (таблица 4) 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 уменьшается. Как было отмечено выше, у взрослых людей биполярные островки не выявлены. Диаметр смешанных островков превышает 100 мкм.

Доля, занимаемая эндокринной частью ПЖ, в пренатальном развитии постепенно нарастает и, в целом, у плодов она выше, чем у взрослых людей, что, по-видимому, связано с более медленным развитием экзокринной части ПЖ по сравнению с эндокринной в плодном периоде. Плотность распределения островков в ПЖ человека в пожилом и старческом возрасте увеличивается по сравнению с людьми зрелого возраста. Если у людей в возрасте до 60 лет, не страдающих нарушениями углеводного обмена, площадь, заполненная инсулин-позитивными клетками у составляет примерно

1%, что соответствует литературным данным (Assmann A., Hinault Ch., Kulkarni R. N., 2009, Reers Chr. et al., 2009), то после 60 этот показатель увеличивается и может достигать 4%.

Таблица 4

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

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

Во всех исследованных периодах развития (в том числе и у взрослых людей, не страдавших нарушениями углеводного обмена), основной вклад в эндокринную часть ПЖ (и по числу островков и по площади, занимаемой на срезе) вносят островки диаметром до 100 мкм, т.е преимущественно островки плащевого типа (таблица 5, 6).

У людей пожилого и старческого возраста по сравнению с людьми зрелого возрастает не только общая плотность распределения островков, но и относительное количество крупных островков (таблица 8). В отдельных случаях число островков диаметром больше 200 мкм превышало 17% от общего количества островков.

В доступной литературе было найдено единственное упоминание об этом феномене в работе Б.А. Кронрода (1962). В этом исследовании 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.

Таким образом, пластичность эндокринной части ПЖ в нормальном развитии человека проявляется в изменении как количества, так и размеров разных форм ее организации, что, соответственно, приводит к изменениям их относительного количества и плотности распределения.

Таблица 5

Относительное количество островков разного размера в онтогенезе человека, Me (q1-q3)

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

Уровень значимости (P) в тесте Манна-Уитни при попарном сравнении соотношения числа островков разного размера

Периоды развития Диаметр островков	40-55	55-100	>100
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

Таблица 6

Относительная площадь островков разного размера в онтогенезе человека, Me (q1-q3)

Периоды развития Диаметр островков	ПрФп	РФп	СрФп	ПФп	Взрослые	Тест Краскела – Уоллиса
40-55 мкм	64,70 (27,12-71,00)	45,71 (43,00-50,81)	36,935 (31,07-42,30)	14,64 (11,51-18,38)	16,795 (12,30-22,92)	p=0,00
55-100	35,30 (29,00-72,88)	46,13000 (34,21-47,81)	51,81 (46,16-59,21)	35,03 (31,40-38,94)	46,85 (39,01-53,29)	p=0,12
свыше 100 мкм	0,00	8,00 (2,93-10,94)	6,68 (1,81-17,17)	46,59 (46,42-57,09)	37,79 (19,71-45,38)	p=0,00

Уровень значимости (P) в тесте Манна-Уитни при попарном сравнении площади, занимаемой островками разного размера

Периоды развития Диаметр островков	40-55	55-100	>100
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

Особенности организации эндокринной части поджелудочной железы взрослых людей с нарушениями углеводного обмена и плодов от матерей с сахарным диабетом. Во всех исследованных образцах ПЖ у людей, страдавших СД1 и СД2, кроме 2 случаев тяжелого СД1, при которых практически отсутствовала реакция на инсулин, обнаружены все формы организации эндокринной части (одиночные клетки, их скопления, островки плащевого типа и смешанные островки). Плотность распределения островков при СД1 уменьшается по сравнению с людьми, не страдавшими нарушениями углеводного обмена (Таблица 7, 8) и с СД 2 (Таблица 8). Данные об этом уменьшении островков

при СД1 представляют определенный интерес, так как считается, что при СД 1 уменьшается в первую очередь количество В-клеток при сохранении числа клеток, синтезирующих глюкагон. Следовательно, плотность островков не должна снижаться. Тем не менее сходные с нашими данные были получены и другими исследователями (Waguri M. et al., 1997). Это 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 их популяция не восстанавливается, и не происходит возобновления островков. Решение этого вопроса может открыть новые перспективы в лечении данного заболевания.

Таблица 7

Относительное количество(%) и суммарная площадь (%) островков разного диаметра у лиц, не страдавших нарушениями углеводного обмена, и с сахарным диабетом 1 типа, Me (q1-q3)

Группы наблюдений Показатели	Люди, не страдавшие нарушениями углеводного обмена	Люди, страдавшие СД1	Уровень значимости (P) в тесте Манна-Уитни
Количество островков диаметром свыше 100 мкм	8,60 (7,30-12,20)	15,80 (12,20-16,30)	p=0.04
Количество островков диаметром меньше 100 мкм	91,40 (87,80-92,70)	84,20 (83,70-87,80)	
Суммарная площадь, занимаемая на срезе островкам диаметром свыше 100 мкм	32,80 (31,20-40,70)	54,55 (50,00-59,30)	p=0.02
Суммарная площадь, занимаемая на срезе островкам диаметром меньше 100 мкм	67, 20 (59,30-68,80)	45,45 (40,70-50,00)	

Разница в возрасте у лиц с сахарным диабетом неизбежна, поскольку СД 2 чаще выявляется в пожилом и старческом возрасте, то время как СД 1 типа часто называют «болезнью молодых» (Балаболкин М. И., Клебанова Е. М., Креминская В. М., 2005). При СД2 выявлена тенденция к увеличению плотности распределения островков. 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 о возможном компенсаторном увеличении количества В-клеток в ответ на повышенный уровень глюкозы (Assmann A., Hinault Ch., Kulkarni R. N., 2009; Back S.H. et al., 2012), при этом механизм этой адаптации до сих пор остается неизученным.

При сахарном диабете обоих типов, как и при старении возрастает относительное количество островков с диаметром больше 200 мкм (Таблица 8). Их число может достигать до 20% от общего количества островков.

Таблица 8

Количество крупных островков (диаметром более 200 мкм) при старении и сахарном диабете 1 и 2 типа (в кадре 2,4x3.2 мм), Me (q1-q3)

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

Уровень значимости (P) в тесте Манна-Уитни при попарном сравнении распределения крупных островков при старении и сахарном диабете 1и 2 типов		
Показатели / Группы наблюдений	Общее количество островков	Островки диаметром свыше 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 - старше 50	0,38	0,97
СД1 - СД2	0,003	0,20

В нашей работе также выявлена выраженная гипертрофия островков у трех плодов от матерей с СД, у двух из которых была диагностирована диабетическая фетопатия. Это согласуется с данными литературы (Баринова И.В. и др., 2010).

Подводя итог этому разделу, нужно подчеркнуть, что у людей как при старении, так и при нарушениях углеводного обмена (СД1, СД2, диабетическая фетопатия) была выявлена гипертрофия островков. Хорошо известно, что количество В-клеток, секретирующих инсулин, у человека может изменяться в ответ на изменение целого ряда физиологических параметров, например оно увеличивается при беременности и ожирении, а также при нормальном физиологическом росте (Bernard-Kargar С., Ktorza А., 2001). Эти данные объясняют механизм образования гипертрофированных островков лишь частично. Поэтому ответ на вопрос о причинах увеличения количества крупных островков при старении и нарушениях углеводного обмена следует искать в их клеточной архитектуре и составе.

Пластичность цитоархитектоники и клеточного состава эндокринной части поджелудочной железы

Клеточный состав в разных типах организации эндокринной части поджелудочной железы человека. Для более детального изучения пластичности эндокринной части ПЖ был изучен клеточный состав в различных формах ее организации в развитии человека. В целом ряде работ уже исследовано соотношение инсулин- и глюкагон-содержащих клеток в пренатальном развитии ПЖ человека (Кривова Ю.С., 2010; Ульяновская С.А., 2015; Schultze-Jena В. S., 1953; Gregg В.Е. et al., 2012). В большинстве этих работ показано, что во время практически всего пренатального периода развития количество А-клеток примерно равно числу В-клеток, а иногда даже превышает его. В гораздо меньшем числе работ внимание уделялось количественному изучению D-клеток, содержащих соматостатин (Ульяновская С.А., 2015; Clark А. and Grant А.М., 1983; Stefan Y. et al., 1983; Gregg В.Е. et al., 2012), хотя D-клетки составляют 5-10% от популяции эндокринных клеток островков у взрослых людей (Veld In't P., Marichal M., 2010).

Принципиальное отличие настоящей работы от предшествующих заключается в том, что мы изучали размер и число эндокринных клеток в различных по своему морфологическому

строению типах распределения эндокринных клеток в ПЖ (таблица 9). Этот подход позволил выявить ранее неизученные аспекты пластичности эндокринной части ПЖ в развитии. Содержание в плащевых островках В-клеток практически не изменяется на протяжении всего онтогенеза человека, за исключением предплодного периода, в котором можно выявить крупные островки, состоящие из нескольких сливающихся островков плащевого типа. Количество В-клеток в биполярных островках примерно в 2 раза больше по сравнению с островками плащевого типа. Это количество максимально в среднефетальном периоде и снижается в позднефетальном. У взрослых людей, как уже было отмечено, биполярные островки не выявлены. Смешанные островки у взрослых содержат больше В-клеток, чем в позднефетальном периоде и у новорожденных.

Сходные закономерности были выявлены и при анализе распределения глюкагон-содержащих клеток в разных формах структурной организации за исключением того, что в биполярных островках обнаружено в 3-4 раза больше А-клеток, чем в островках плащевого типа. 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 V. S., 1953; Gregg V.E. et al., 2012).

В тоже время, по нашим данным, отношение числа D-клеток к В-клеткам 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 оно постепенно снижается (до 27% в позднефетальном периоде), 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 V.E. et al., 2012) Однако нами впервые показано, что это снижение происходит во всех типах организации эндокринных клеток, т.е. в раннефетальном периоде процент D-клеток значимо выше, чем у взрослых людей даже в небольших скоплениях эндокринных клеток и в плащевых островках. Так как соматостатин ингибирует выработку и инсулина и глюкагона (Nauge-Evans A. et al., 2009), а в развивающихся островках D-клетки локализованы преимущественно в зоне расположения А-клеток,

Клеточный состав разных форм организации эндокринной части поджелудочной железы

Периоды развития Формы организации эндокринной части поджелудочной железы	ПрФп	РФп	СрФп	ПФп	Взрослые	Тест Краскела – Уоллиса
А) Количество В-клеток в разных формах организации эндокринной части ПЖ в онтогенезе человека, Ме (q1-q3)						
Одиночные	6,00 (5,00-11,00) б, в	3,00 (2,00-6,00) а,в,г	4,00 (3,00-5,00) а,б,г	8,00 (6,00-11,50) б,г	нд	p=0.00
Кластеры	4,00 (2,00-7,00) б,в,г	2,00 (1,00-4,00) а,д	2,00 (2,00-4,00) а,д	2,00 (1,50-3,50) а,д	10,00 (7,00-10,00) б,в,г	p=0.00
Плащевые	22,00 (20,00-24,00) б,в	9,00 (7,00-15,00) а	12,50 (11,00-18,00) а	11,00 (9,00-21,00)	17,00 (9,00-19,00)	p=0.02
Биполярные	нет	16,00 (8,00-26,00)	24,00 (18,50-32,50)	10,00 (8,00-12,00)	нет	p=0.08
Смешанные	нет	нет	нет	33,00 (30,00-43,50) д	68,00 (50,00-83,00) г	
Б) Количество А-клеток в разных формах организации эндокринной части ПЖ в онтогенезе человека, Ме (q1-q3)						
Одиночные	1,50 (0,00-4,00)	3,00 (3,00-4,00)	5,00 (1,00-5,00)	5,00 (1,00-5,00)	нд	p=0.39
Кластеры	1,00 (0,00-3,00)	1,00 (1,00-2,00)	1,00 (1,00-2,00)	1,00 (0,00-1,00)	нд	p=0,46
Плащевые	16,00 (4,00-16,00)	6,00 (4,00-9,00)	5,00 (3,00-8,00)	6,00 (4,00-11,00)	3,00 (0,00-14,00)	p=0,28
Биполярные	нет	22,00 (15,00-34,00)	18,00 (9,00-28,00)	31,00 (19,00-43,00)	нет	p=0.30
Смешанные	нет	нет	нет	10,00	47,00	

				(8,00-18,00) д	(29,00-70,00)г	
В) Количество D-клеток в разных формах организации эндокринной части ПЖ в онтогенезе человека, Me (q1-q3)						
Одиночные	6,00 (4,00-9,00) в	3,00 (2,00-7,00) в	1,00 (0,00-1,00) а,б	2,00 (1,00-3,00)	нд	p=0.00
Кластеры	2,00 (1,00-4,00) б,в,г,д	2,00 (1,00-3,00) а	1,00 (1,00-2,00) а	1,00 (1,00-2,00) а	1,00 (0,00-1,00) а	p=0.004
	5,00 (3,00-8,00)	7,00 (5,00-11,00) д	7,00 (5,00-10,00) д	5,00 (5,00-8,00)	0,00 (0,00-2,00) б,в	p=0.008
Биполярные	нет	17,00 (11,00-25,00) г	14,00 (9,00-22,00)	7,00 (6,00-8,00) б	нет	p=0.0579
Смешанные	нет	нет	нет	10,00 (9,00-17,50)	8,00 (5,00-13,00)	
Г) Соотношение В- клеток к общему числу инсулин- и глюкагон-содержащих клеток (в %), Me (q1-q3)						
Одиночные	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	67,00 (64,00-69,00)	61,00 (50,00-75,00) д	57,50 (50,00-71,50) г,д	67,00 (59,00-76,00) в,д	94,00 (70,00-100,0) б,в,г	p= 0,007
Биполярные	нет	56,00 (46,00-62,00)	42,00 (18,00-63,00)	58,00 (56,00-60,00)	нет	p=0,24
Смешанные	нет	нет	нет	59,00 (56,00-59,00)	56,00 (50,00-68,00)	

Д) Соотношение В- клеток к общему числу инсулин- и соматостатин-содержащих клеток (в %), Ме (q1-q3)						
Одиночные	55,00 (45,00-61,00) в,г	50,00 (30,00-68,00) в,г	81,50 (67,00-100,0) а,б	82,00 (70,00-90,00) а,б	нд	p=0.00
Кластеры	62,00 (50,00-80,00) д	50,00 (50,00-75,00) в,д	67,00 (50,00-88,00) б	70,50 (50,00-80,00)	90,00 (90,00-100,00) а,б	p=0.05
Плащевые	85,00 (79,00-87,50) б,в,г	54,00 (45,00-70,00) а,в,г,д	63,50 (55,50-74,00) а,б,д	72,00 (64,00-81,00) а,б,д	100,00 (85,00-100,00) б,в,г	p=0.0000
Биполярные	нет	48,00 (35,00-59,00) в	61,00 (60,00-71,00) б	58,50 (57,00-60,00)	нет	p=0.01
смешанные	нет	нет	нет	74,98500 (66,35-81,14) д	87,74 (84,75-93,26) г	

Условные обозначения. Различия статистически значимы в тесте Манна-Уитни при $p < 0.05$ по сравнению с: а - ПрФп, б - РФп, в - СрФп, г - ПФп, д- Взр

можно предположить, что в пренатальном развитии увеличение количества D-клеток связано с необходимостью ингибировать избыточную выработку глюкагона.

Цитоархитектоника островков поджелудочной железы человека. В исследовании обнаружена упорядоченность клеточной организации всех типов островков (плащевых, биполярных и смешанных) и показано, что распределение и количество A-, B- и D-клеток в ПЖ человека связано с размером островка и его васкуляризацией. Островки плащевого типа у человека имеют достаточно скудную васкуляризацию, в то время как островки Лангерганса, диаметр которых превышает 100 мкм, гораздо более васкуляризованы ($r=0,75$, $p=0,00$). В составе такого островка можно выявить дольки, ограниченные капиллярами. Внутреннюю часть долек составляет массив B-клеток, на периферии и в непосредственной близости с кровеносными сосудами находятся A- и D-клетки. В наиболее крупных островках поджелудочной железы у взрослых людей выявлено повышение относительного содержания глюкагон- (корреляция между размером островков и количеством в них A-клеток $r=0,78$, $p=0,001$) и соматостатин-содержащих клеток ($r=0,81$, $p=0,03$), в то время как для B-клеток обнаружено, соответственно, снижение. Следовательно, у людей пластичность эндокринной части ПЖ проявляется не только в изменении плотности распределения и размеров островков, но и в сопутствующем изменении их васкуляризации и клеточного состава.

В различных работах были сделаны попытки представить схему морфогенеза островков: по мнению авторов, наблюдаемые в раннем онтогенезе различные формы организации эндокринной части можно представить как последовательные стадии развития от одиночных эндокринных клеток до смешанных островков (Jeon J. et al., 2009). Однако так как биполярные островки не были обнаружены ни в одном из исследованных образцов ПЖ взрослых людей применить схему морфогенетического развития островков в пренатальном онтогенезе к взрослым невозможно. В нашей работе предложена следующая схема морфогенеза островков в ПЖ взрослых людей (Рис. 1): из одиночных эндокринных клеток (Рис. 1а) формируются небольшие кластеры (Рис. 1б) и затем островки плащевого типа (Рис. 1в). В таких скоплениях клеток и небольших островках (диаметром 40-100 мкм) A- и D-клетки находятся на периферии, что связано с

тем, что кровеносные капилляры не проникают внутрь, а только подходят к поверхности, или в них можно выявить только один капилляр. В более крупных островках глюкагон- и соматостатин-содержащие клетки обнаруживаются, как в периферической, так и во внутренней зонах вдоль кровеносных сосудов, которые пронизывают островок (Рис. 1 г). В-клетки образуют в центральной зоне скопления, окруженные А- и D-клетками и отграниченные кровеносными сосудами. В ходе ангиогенеза число глюкагон- и соматостатин-содержащих клеток в островке возрастает, а инсулин-содержащих снижается. В дальнейшем крупный островок предположительно разрушается.

Таким образом, разные формы организации эндокринной части ПЖ отличаются не только по размерам, но, и по клеточной архитектуре и по соотношению разных видов гормон-содержащих клеток. Крупные "смешанные" островки тоже имеют четкую и упорядоченную цитоархитектонику. Однако в настоящее время, большинство авторов считает, что в смешанных 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.

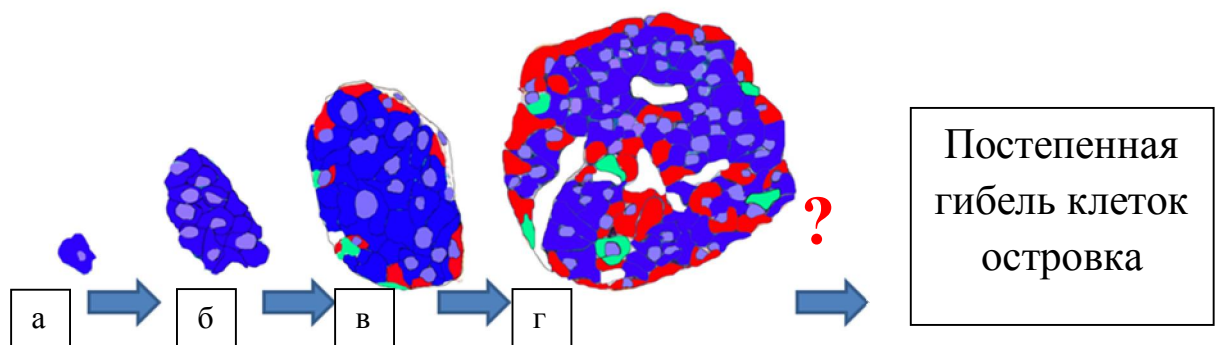


Рис. 1: Схема морфогенеза островков поджелудочной железы у взрослого человека. Условные обозначения: В-клетки - синий, А-клетки - красный, D-клетки - зеленый, капилляры изображены в виде трубок внутри островка. Пояснения в тексте.

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). Обнаруженные закономерности необходимо учитывать при проведении трансплантации островков лицам, страдающим от нарушений углеводного обмена. При выделении островков ПЖ человека для проведения трансплантаций лицам, страдающим сахарным диабетом, в первую очередь, нужно выделять островки диаметром меньше 200 мкм. Более крупные островки ПЖ не подходят для трансплантации из-за высокого содержания в них глюкагон- и соматостатин-содержащих клеток, высокой степени васкуляризации и, в ряде случаев, ограниченной функциональности эндокринных клеток. Такое повышение требований к донорским тканям может привести с одной стороны к существенному увеличению срока жизни трансплантата, а с другой - повышает трудоемкость данной операции, так как для единовременной пересадки требуется не менее 1 000 000 островков, которые должны быть получены в течение ограниченного периода времени и трансплантированы больному (Дедов И.И. и др., 2004).

Колокализация гормонов в клетках как проявление пластичности эндокринной части поджелудочной железы человека. Возникает закономерный вопрос о факторах, вовлеченных в изменение соотношения эндокринных клеток в ПЖ, в том числе у взрослых людей. 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, клеточной смерти (некроз и апоптоз), неогенеза и изменения объема клеток (Аметов А.С., 2008; Bernard-Kargar C., Ktorza A., 2001; Bonner-Weir S., 2001; Chhabra P. et al., 2011). Наибольшее внимание уделяется В-клеткам, при этом остальные клетки изучены недостаточно.

В нашей работе выявлены клетки с колокализацией инсулина и глюкагона (АВ-клетки) 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. Данные литературы о распространенности коэкспрессии различных гормонов в эндокринных клетках у целого ряда животных от земноводных до млекопитающих (Putti R. et al., 1997; Della Rosa

A. and Putti R., 1995; Etayo J.C. et al., 2000; Jensen J. et al, 2010; Katsuta H. et al., 2010) свидетельствуют о том, что колокализация одновременно инсулина и глюкагона в одной клетке ПЖ человека является анцестральным признаком.

У взрослых людей число АВ-клеток относительно невелико. Эти клетки выявлены в основном в тесном соседстве с капиллярами. 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 у пациентов с длительно текущим СД1. Из данных как нашего 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 спустя 20 лет после манифестации СД.

Исследовав концентрацию в периферической крови глюкагона, С-пептида и антител к инсулину у 300 пациентов, страдающих СД1 не менее 20 лет, мы обнаружили у 30% пациентов синтез собственного инсулина (Рисунок 2). Для большинства 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). Ожидаемые по данным литературы результаты были выявлены только у 21% пациентов. В этой группе 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. 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. Это согласуется с нашими данными ИГХ исследования аутопсий ПЖ лиц, страдавших СД1: более чем в

половине случаев обнаружены инсулин-содержащие клетки, но при этом не выявлен инсулит.

Следовательно, присутствие в крови С-пептида у 30% пациентов с длительным СД1 свидетельствует о том, что у них сохраняются или восстанавливаются В-клетки. Уровня продукции эндогенного инсулина у пациентов в этой группе должно быть достаточно для прекращения инсулиновой терапии. Возможно, что именно для таких пациентов характерно крайне нестабильное течение СД 1 и постоянные значительные колебания уровня глюкозы в крови.

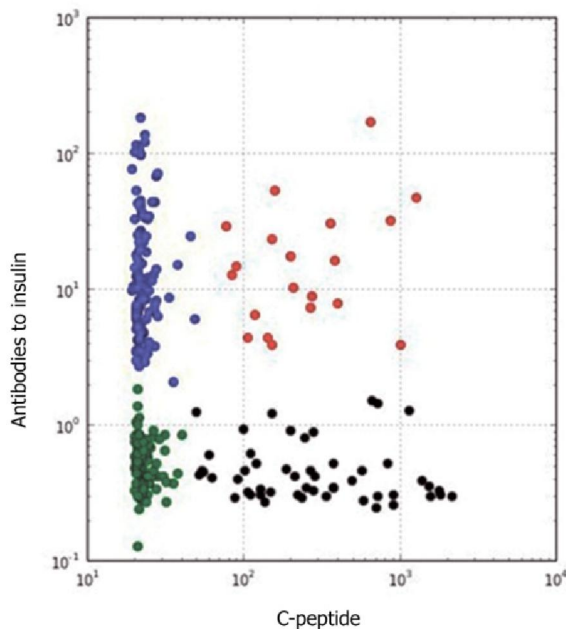


Рис. 2 Распределение индивидуальных показателей количественной оценки синтеза С-пептида и антител к инсулину в периферической крови у больных страдающих сахарным диабетом первого типа более 20 лет. Цветом выделены четыре группы пациентов: зеленый – пациенты с низким уровнем С-пептида и антител к инсулину; 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.

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 трансдифференцировке эндокринных клеток также не объясняет отсутствие антител к инсулину в некоторых случаях СД1. В нашей работе мы предлагаем альтернативную гипотезу, которая, однако, требует дальнейшей проверки:

В ПЖ человека может существовать 2 субпопуляции инсулин-содержащих клеток: вызывающие (ВВ) и невызывающие (АВ) аутоиммунную агрессию. Эти две группы клеток могут обладать разными свойствами. Субпопуляция ВВ-клеток в норме доминирует в эндокринной части ПЖ человека и составляет до 90% от всех инсулин-продуцирующих клеток. В начале развития сахарного диабета первого типа повышение уровня антител к инсулину, а затем и их гиперпродукция отражает только снижение количества ВВ-клеток. Когда процессы аутоиммунного разрушения популяции ВВ-клеток завершаются, наступает так называемая абсолютная инсулиновая недостаточность, характерная для СД1. По всей видимости, остающиеся инсулин-продуцирующие клетки являются суб-популяцией АВ-клеток, которые не вызывают аутоиммунную агрессию. В течение болезни популяция АВ-клеток постепенно увеличивается. Эта теория подтверждается экспериментами, выявившими АВ-клетки в ПЖ NOD-мышей, у которых не развивался СД, несмотря на полную потерю В-клеток (Chhabra P. et al., 2011). Таким образом, АВ-клетки могут играть роль в сохранении и восстановлении секреции инсулина у части людей, страдающих СД1.

Другие проявления пластичности эндокринной части ПЖ.

Вклад в пластичность эндокринной части поджелудочной железы человека NSE- и S100-содержащих клеток. Эндокринные клетки содержат не только гормоны, но и целый ряд других веществ, которые тоже могут вносить свой вклад в пластичность ПЖ. Примером влияния фенотипа эндокринных клеток на их пластичность является наличие в эндокринных клетках ПЖ веществ, характерных для нервной системы

В нашей работе было проведено исследование распределения NSE в поджелудочной железе человека на разных сроках развития. Показано, что в развитии поджелудочной железы человека иммунопозитивная реакция на NSE в эндокринных клетках обнаруживается только на 11-12-й неделе. NSE, как по нашим данным, так и по данным литературы (Von Dorsche H.H. et al., 1989),

является одним из первых белков, общих для эндокринных клеток ПЖ и нервной системы, который появляется в пренатальном развитии. Полученные нами данные свидетельствуют о важности NSE в развитии ПЖ, так как этот фермент является маркером функциональной активности клеток (Kaiser E. et al, 1989). Начиная с 12-й нед. и на всех последующих сроках развития иммунопозитивная реакция на NSE наблюдается в эндокринных клетках панкреатических островков, одиночных эндокринных клетках и их небольших кластерах, а также в части клеток в протоках железы. NSE обнаруживала колокализацию в клетках со всеми тремя видами исследованных гормонов. Однако в части клеток была выявлена ослабленная или иммунонегативная реакция на NSE, что может свидетельствовать о разной степени функциональной активности клеток в островках. В ряде крупных островков реакция на NSE была снижена.

При исследовании распределения NSE в эндокринных клетках ПЖ людей, страдавших СД1, при отсутствии реакции на инсулин реакция на NSE тоже была негативной. В трех исследованных нами случаях реакция на инсулин и NSE в клетках островков поджелудочной железы пациентов, страдавших по данным катамнеза СД 1-го типа, в той или иной степени сохранялась (однако была меньше, чем у людей, не страдавших нарушениями углеводного обмена). Возможно, что патологические процессы при СД1 ускоряются из-за нарушения гликолиза в В-клетках при отсутствии NSE или снижения ее концентрации, и, соответственно, снижения продукции инсулина. Гликолиз является главным путем утилизации глюкозы в организме животных и человека (Ашмарин И. П., Стукалов П. В. и Ещенко Н. Д., 1999). В-клетка является сенсором глюкозы: когда в крови повышается концентрация глюкозы, секретируется инсулин, чтобы восстановить ее исходную физиологическую 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 высвобождению заранее синтезированного инсулина (MacDonald P. E., Joseph J. W., Rorsman P., 2005). Однако, гликолиз в эндокринных клетках ПЖ отличается от

гликолиза в клетках экзокринной части 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 (Novsepyan M.R. et al., 2004), о значимом повышении уровня аутоантител к NSE у пациентов с СД.

Другим исследованным в работе белком, характерным для нервной системы, был белок S100. В островках Лангерганса человека было обнаружено два вида S100-позитивных клеток: клетки, расположенные по периферии островка и клетки, расположенные внутри него.

Клетки, расположенные на периферии (Рисунок 3а), по своей морфологии напоминают клетки, обнаруженные ранее на периферии панкреатических островков у грызунов (Donev S., 1984; Uchida T. and Endo T., 1989; Sunami E. et al., 2001; Fujita T., Iwanaga T., Nakajima T., 1983). Это клетки с небольшим телом и длинными отростками. На настоящий момент большинство авторов считают эти S100-позитивные клетки глиальными. Отросчатые клетки, обнаруженные нами на периферии островков были также сходны с сателлитными клетками внутрипанкреатических ганглиев и шванновскими клетками. В отличие от других млекопитающих, в ПЖ человека такие S100+ клетки присутствуют лишь в некоторых панкреатических островках. Причем отростки этих клеток покрывают небольшую часть поверхности островка, не образуя замкнутой капсулы.

S100-позитивные клетки 2-го вида, расположенные внутри островка (Рисунок 3б), по своей морфологии не отличаются от эндокринных клеток островка. Они были описаны 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). Их количество сопоставимо с числом соматостатин-содержащих клеток. Однако S100-содержащие клетки второго 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 второго вида и нейронспецифической енолазы, при этом общее количество S100+клеток было гораздо меньше, чем NSE-содержащих.

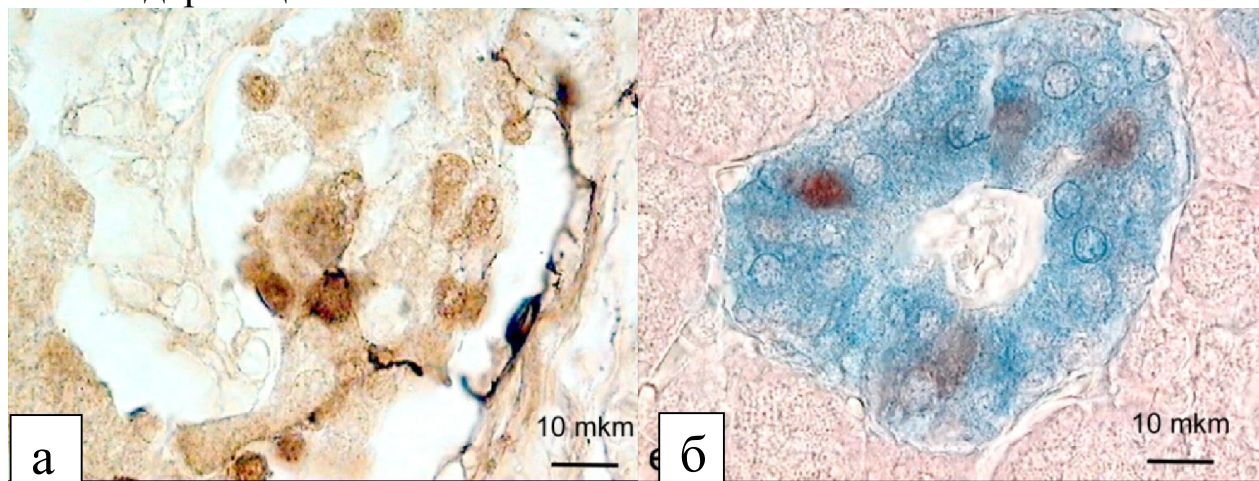


Рис.3 Распределение S100+клеток в эндокринной части ПЖ человека. ИГХ на S100: а) плод 40 нед., фрагмент крупного островка, б) мужчина, 77лет, двойная реакция на NSE + S100

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

Вклад нервной системы в пластичность эндокринной части ПЖ человека. На состояние эндокринной части ПЖ также могут влиять экзокринная часть ПЖ и кровеносная, лимфатическая и нервная системы. Более подробно возможность влияния других систем организма на пластичность эндокринной части ПЖ рассмотрим на примере нервной системы. О динамике иннервации в развитии человека и при различных заболеваниях известно относительно мало. Малоизученной остается и тонкая иннервация островков (Amella C. et al., 2008).

В целом наши данные о динамике развития иннервации ПЖ человека совпадают с данными литературы (Кривова Ю.С., 2010; Amella C. et al., 2008). Иннервация островков Лангерганса начинает

формироваться с 14 нед. Наибольшая плотность распределения структур нервной системы выявлена в среднефетальном периоде. У взрослых людей по сравнению с плодами эта плотность существенно ниже. Надо отметить, что оба использованных нами белка (NSE и S-100) являются функциональными маркерами клеток. Таким образом в структурах нервной системы ПЖ человека, начиная уже с префетального периода, происходят интенсивные процессы. Наблюдаемые различия в плотности распределения структур нервной системы ПЖ плодов и взрослых людей могут иметь функциональное значение для морфогенеза ПЖ.

В рамках работы проведено также изучение иннервации эндокринной части ПЖ у людей, страдавших СД1. Как известно, СД сопровождается поражениями периферической нервной системы. В настоящем исследовании было показано, что у взрослых людей с СД1 сокращается количество нервных волокон, выявляемых с помощью ИГХ реакций на пан-нейральные маркеры. Это свидетельствует том, что два патогенетических процесса – гибель В-клеток и истощение нервной системы – идут одновременно. В поддержку этой гипотезы свидетельствует то, что в сыворотке крови у детей с СД1 по литературным данным был выявлен повышенный уровень аутоантител к пан-нейральным белками S100, GFAP, MBP и NGF как при манифестации, так и при продолжительном СД1 (Лотош Н.Ю., 2015).

Роль нейроинсулярных комплексов в морфогенезе эндокринной части ПЖ человека. У многих млекопитающих и у человека эндокринные клетки панкреатических островков и структуры нервной системы могут быть объединены в сложноорганизованные нейроинсулярные комплексы (НИК) (Кривова Ю.С., 2007, 2010; Böck P., 1986; Persson-Sjögren S., Zashihin A., Forsgren S., 2001; Sunami E. et al., 2001; Burris R. and Hebrok M., 2007). Нейроинсулярные комплексы I типа (НИК I) представляют собой панкреатические островки, интегрированные с нервными ганглиями. Нейроинсулярные комплексы II типа (НИК II) представляют собой панкреатические островки, связанные только с нервными волокнами. НИК I и II типов в ПЖ людей выявлены в пре- (начиная с 14 нед.) и в постнатальном развитии. На разных сроках развития были выявлены как различные типы этих комплексов, так и их смешанные и переходные формы. При этом существующая классификация НИК

(Vöck P., 1986) оказалась неполной. Она не включает в себя целый ряд вариантов, выявленных нами в пренатальном развитии ПЖ человека. Уже в раннефетальном периоде нам удалось выявить НИК I (единичные инсулин- или глюкагонсодержащие клетки в ганглии, ганглий ассоциированный с островком) и II типа: (единичные эндокринные клетки в пучке нервных волокон, нервные окончания, подходящие как к одиночным эндокринным клеткам, так и островкам) и создать их 3D-реконструкции. Анализ трехмерных реконструкций позволил впервые обнаружить ганглии ассоциированные сразу с двумя островками, островки, ассоциированные одновременно с 2 ганглиями и НИК смешанного типа (до 2 НИК I и 3 НИК II в одном островке) (рисунок 4). 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 разным островкам. Такие комплексы были выявлены ранее Кривовой Ю.С. (2010) в ПЖ нутрии. У человека они ранее не были описаны.

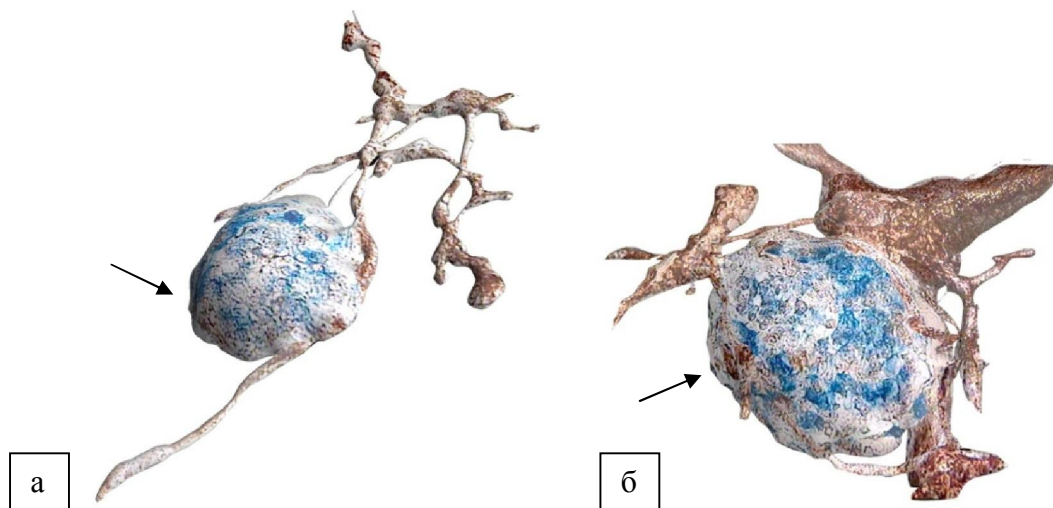


Рис. 4 Трехмерные реконструкции НИК по серийным срезам поджелудочной железы плода 20 нед., ИГХ глюкагон (синий) + белок S100 (коричневый): а) комплекс II типа, б) сложный комплекс. Стрелками отмечены островки.

Наибольшая плотность распределения нейроинсулярных комплексов выявлена в плодном периоде, во время активного морфогенеза островков, у взрослых людей плотность их распределения статистически значимо снижается.

В развивающейся ПЖ человека образуется разветвленная сеть НИК. В данном исследовании подтверждено, что количество и разнообразие форм нейроэндокринных комплексов у плодов человека значительно больше, чем у взрослых людей (Кривова Ю.С., 2010) и выделены новые формы НИК.

Роль нейроэндокринных комплексов до конца не ясна (Persson-Sjögren S., Zashihin A., Forsgren S., 2001). Существует ряд данных в поддержку гипотезы о функциональной взаимосвязи нервной и эндокринной систем в ПЖ. В настоящее время повсеместно принимается идея о регуляторной роли нервной системы в эндокринной секреции (Ahrén B., 2000). 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 вносить вклад в морфогенез островков, предположительно за счет участия в миграции эндокринных клеток из протоков к островкам.

Понимание роли НИК в становлении клеточной архитектуры островков, их развитии и достижении функциональной зрелости 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 организации: одиночные эндокринные клетки (были выявлены с 10 нед.), расположенные в ацинусах или среди клеток протоков; 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 (мозаичные) островки Лангерганса размером больше 100 мкм (с 25 нед.). Эти формы не сменяют друг друга, а существуют одновременно, появляясь по мере развития ПЖ. В пренатальном развитии человека выявлено изменение 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). Относительное количество крупных островков возрастает как при старении, так и при СД обоих типов и диабетической фетопатии.

Островки Лангерганса являются структурами со своими особенностями развития, роста, цитоархитектоники, кровоснабжения и иннервации. Распределение и количество А-, В- и D-клеток в ПЖ человека зависит от размера островка и его васкуляризации.

Источники происхождения новых клеток для роста островков и возобновления их популяции неизвестны. В последнее время наряду с гипотезами о пролиферации 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 источником для разработки новых подходов к терапии СД. В ПЖ человека мы выявили колокализацию инсулина и глюкагона, что является анцестральным признаком. Число таких клеток у взрослого человека невелико. Однако, они были обнаружены при СД1. Получены также клинические и морфологические данные о сохранении или восстановлении продукции инсулина у людей, длительное время страдавших СД1. Возможно, именно клетки, содержащие одновременно инсулин и глюкагон, играют роль в этом сохранении у части людей, страдающих СД1.

В то же время, эндокринные клетки могут различаться не только по секретлируемым гормонам, но и по другим, содержащимся в них, веществам. Например, полученные данные позволяют предположить, что NSE играет важную роль в патогенезе СД и может быть полезна для оценки функциональной активности нервной и эндокринной систем в поджелудочной железе человека. Кроме того, 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, сходны с клетками глии. Клетки, расположенные внутри островка, не отличаются по

своему строению от эндокринных клеток, но их число невелико. Возможно, два вида S100+клеток играют роль как в морфогенезе островков, так и в регуляции секреции гормонов эндокринными клетками.

В исследовании была показана тесная интеграция структур нервной и эндокринной систем в ПЖ человека. Нервы и ганглии в ПЖ человека обнаружены, начиная с 10 нед. Иннервация островков выявлена начиная с 14 нед. Наибольшая плотность НИК обнаружена в плодном периоде, во время активного морфогенеза островков. Выявлено несколько разных типов НИК, образующих в плодном периоде разветвленную сеть в ПЖ человека. Тесная связь островков с структурами нервной системы предполагает участие НИК в морфогенезе эндокринной части ПЖ.

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 А-, В- 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. Наибольшее 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 панкреатических островков.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Взр	взрослые люди
КПА	кроличьи поликлональные антитела
КТ	комнатная температура
ИГХ реакции нед.	иммуногистохимические реакции неделя(и) гестационного развития
ММА	мышинные моноклональные антитела
НИК	нейроинсулярный 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
NSE	нейронспецифическая енолаза
S100	белок S100

Список работ в научных изданиях, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук

1. Изучение иммунореактивности нейронспецифической енолазы (NSE) в поджелудочной железе человека в норме и при сахарном диабете 1 типа. / А.Е. Прощина, С.В. Савельев В.М. Барабанов, Ю.С. Кривова. // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2010 . – Том 148, № 6. – С.704-709.
2. Структурные и иммуногистохимические изменения поджелудочной железы человека, возникающие при старении и в результате сахарного диабета. / А.Е. Прощина, В.М. Барабанов, Ю.С. Кривова, С.В. Савельев // Морфологические ведомости. – 2011. – №2. – С. 56-62.
3. Development of the Islets of Langerhans in the Human Fetal Pancreas. / Y.S. Krivova, A.E. Proshchina, V.M. Barabanov, S.V. Saveliev // In "Pancreas: Anatomy, Diseases and Health Implications", Ed. Akiko Satou and Hana Nakamura. – Nova Science Publishers, 2012. – P. 53-88.
4. Иммуногистохимическое исследование распределения нейронспецифической енолазы в поджелудочной железе в пренатальном онтогенезе и у взрослых людей. / А. Е. Прощина, Ю.С. Кривова, В.М. Барабанов, С.В. Савельев // Морфологические ведомости. – 2012. – №2. – С. 63-68
5. Иммуногистохимическое исследование распределения А- и В- клеток в разных типах островков Лангерганса поджелудочной железы человека». / А.Е. Прощина, С.В. Савельев // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2013. – Т. 155, № 6. – С. 763-767.
6. Иммуногистохимическое исследование наиболее крупных островков поджелудочной железы человека при старении и при сахарном диабете 1 и 2 типов, перспективы для трансплантации. / А.Е. Прощина, Ю.С. Кривова, В.М. Барабанов, С.В. Савельев // Сахарный диабет. – 2013. – №4. – С. 38-43.
7. Ontogeny of neuro-insular complexes and islets innervation in the human pancreas. / A.E. Proshchina, Y.S. Krivova, V.M. Barabanov, S.V. Saveliev // Front. Endocrinol. – 2014. – 5:57. – Режим доступа: doi: 10.3389/fendo.2014.00057.

8. Иммуногистохимическое и электронномикроскопическое исследование глиальных клеток в поджелудочной железе человека у плодов и детей. / Ю.С. Кривова, А.Е. Прощина, В.П. Черников, В.М. Барабанов, С.В. Савельев // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2015. – Т. 159, №5. – С. 626-630.

9. S100-позитивные клетки островков Лангерганса в развитии человека и при сахарном диабете 2 типа. / А.Е. Прощина, Ю.С. Кривова, В.М. Барабанов, С.В. Савельев // Современные технологии в медицине. – 2015 г. – Т.7, №3. – С. 61-66.

10. Клинико-морфологическая оценка синтеза инсулина β -клетками поджелудочной железы при длительном развитии сахарного диабета 1-го типа. /С.В. Савельев, С.Б. Шустов, Б.В. Ромашевский, А.Е. Прощина, В.В. Чекавская, С.А. Апполонова, Е.С. Савельева, Е.В. Балясникова // Вестник Российской Военно-Медицинской Академии. – 2015. – Т. 51, №3. – С. 78-82.

11. Закономерности распределения В-клеток эндокринной части поджелудочной железы человека в онтогенезе. / А.Е. Прощина, Ю.С. Кривова, В.М. Барабанов, С.В. Савельев // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2015. – №3. – С. 30-36.

12. Возможный механизм образования островков Лангерганса в раннем пренатальном развитии человека. / А.Е. Прощина, Ю.С. Кривова, В.М. Барабанов, С.В. Савельев // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2016. – №1. – С. 70-75.

Список работ по теме диссертации в других научных изданиях.

13. Иммуногистохимический анализ организации нервного аппарата поджелудочной железы человека в норме и при сахарном диабете 1-го типа. / Ю.С. Кривова, А.Е. Прощина, Е.И. Фокин, В.М. Барабанов, С.В. Савельев// Вестник хирургической гастроэнтерологии. – 2007. – №3. – С. 54.

14. Иммуногистохимическое исследование периинсулярного нервного сплетения в норме и при сахарном диабете 1 типа. / А.Е. Прощина, В.М. Барабанов, Ю.С. Кривова, Е.И. Фокин, С.В. Савельев // Вестник хирургической гастроэнтерологии. – 2007. – №3. – С. 56.

15. Гетерогенность этиологии сахарного диабета 1-го типа у взрослых и детей. / А.А. Селищева, Н.Ю. Лотош, А.Е. Прощина, С.В.

Савельев // Материалы Международной научно-практической конференции «Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли». – Казань, 2010. – С. 90-91.

16. Изучение иммунореактивности нейронспецифической енолазы (NSE) в поджелудочной железе человека в норме и при сахарном диабете 1 типа. / А.Е. Прошина, В.М. Барабанов, Ю.С. Кривова // Морфология. – 2010. – Т. 137, № 4. – С. 159.

17. Иммуногистохимическое выявление нейронспецифической енолазы в клетках островков Лангерганса поджелудочной железы человека в норме и при сахарном диабете 1 и 2 типов. / А.Е. Прошина, С.В. Савельев, В.М. Барабанов, Ю.С. Кривова // VIII Всероссийская конференция по патологии клетки: Сборник научных трудов. – М., 2010. – С. 200-202.

18. Иммуногистохимическое исследование распределения А- и В- клеток в ткани поджелудочной железы человека. / А.Е. Прошина, Ю.С. Кривова, С.В. Савельев // Всеросс. науч. конф. «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии»: Сборник научных трудов. – М., 2012. – С. 119-122.

19. Колокализация инсулина и глюкагона в клетках островков Лангерганса поджелудочной железы человека. / А.Е. Прошина, Ю.С. Кривова // Морфология. – 2012. – Т. 141, №3. – С. 129.

20. Типы островков Лангерганса в поджелудочной железе человека. / А.Е. Прошина, Ю.С. Кривова // Морфология. – 2012. – Т. 141, №3. – С. 129.

21. Количественное и иммуногистохимическое изучение эндокринной ткани поджелудочной железы взрослых людей при длительно текущем сахарном диабете 1 типа. / А.Е. Прошина, В.М. Барабанов, Ю.С. Кривова, С.В. Савельев // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2012. – №3. – С. 17-22.

22. Неврологические причины и механизм развития сахарного диабета 1 типа. / С.В. Савельев, В.В. Чекавская, А.А. Селищева, А.Е. Прошина, Ю.С. Кривова // Всероссийский конгресс к 180-летию выдающегося русского врача терапевта С. П. Боткина "Терапевтическая школа С. П. Боткина и ее вклад в развитие отечественной клинической медицины": Материалы конгресса. – СПб, 2012. – С. 102.

23. Неврологические причины и механизмы развития сахарного диабета 1 типа. / С.В. Савельев, В.В. Чекавская, А.А. Селищева, А.Е. Прощина, Ю.С. Кривова // Клиническая больница. – 2013. – № 1 . – С. 128-129.

24. В–клетки островков поджелудочной железы человека, не вызывающие аутоиммунную агрессию при длительно текущем СД1. / С.В. Савельев, А.Е. Прощина // IV Всероссийский съезд патологоанатомов: Материалы съезда. – Белгород, 2013. – С.

25. Immunohistochemical study of the pancreas of patients with long termed diabetes mellitus type 1. / A. Proshchina, Y. Krivova, V. Barabanov, S. Saveliev // Front. Immunol. Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI). - 2013. - Режим доступа: doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00978

26. Immunohistochemical study of the pancreas of patients with long termed diabetes mellitus type 1. / A.E. Proshchina, Y.S. Krivova, V.M. Barabanov, S.V. Saveliev // 15th International Congress of Immunology (ICI), Book of Abstracts. - Milan, Italy, 2013. - P. 829.

27. S100-Positive Cells in the Human Islets of Langerhans. / A.E. Proshchina, Y.S. Krivova, V.P. Chernikov, V.M. Barabanov, Saveliev S.V. // Diabetes. – 2015. – Vol. 64:Supplement 1. – P. A735.

28. Возможная роль нейро-инсулярных комплексов в регуляции функций эндокринной части поджелудочной железы человека. / А.Е. Прощина, Ю.С. Кривова, О.Г. Леонова, С.В. Савельев //IV международная междисциплинарная конференция "Современные проблемы системной регуляции физиологических функций": Материалы конференции. – Москва, 2015. – С. 561-564.

29. Трехмерное строение нейро-инсулярных комплексов поджелудочной железы человека в пренатальном периоде. / А.Е. Прощина, Ю.С. Кривова, О.Г. Леонова, В.М. Барабанов, С.В. Савельев // Всеросс. науч. конф. "Актуальны е вопросы морфогенеза в норме и патологии": Сборник научных трудов. – М., 2016. – С. 148.

30. Роль нервной системы в морфогенезе эндокринной части поджелудочной железы человека. / Ю.С. Кривова, А.Е. Прощина, О.Г. Леонова, С.В. Савельев // 13 конгресс международной ассоциации морфологов: Материалы конгресса. –Морфология, 2016. – Т. 149, № 3. – С. 113.

31. Снижение процента популяции соматостатин-содержащих клеток эндокринной части поджелудочной железы в онтогенезе человека. / Прощина А.Е., Барабанов В.М., Кривова Ю.С. // 13 конгресс международной ассоциации морфологов: Материалы конгресса. – Морфология, 2016. – Т. 149, № 3. – С. 167.

32. Островки поджелудочной железы разного типа в пренатальном развитии человека. / Прощина А.Е., Барабанов В.М., Кривова Ю.С. // 13 конгресс международной ассоциации морфологов: Материалы конгресса. – Морфология, 2016. – Т. 149, № 3. – С. 166.

33. Confocal Microscopic Study of Neuro-Insular Complexes in the Human Fetal Pancreas / Y.S. Krivova, A.E. Proshchina, O.E. Leonova, V.M. Barabanov, S.V. Saveliev // Diabetes, 2016. – 65 (Supplement 1). – A628-A630. <http://dx.doi.org/10.2337/db16-2541-2549>

34. Нейро-эндокринные комплексы поджелудочной железы в пренатальном развитии человека. / Прощина А.Е., Кривова Ю.С., Барабанов В.М., Савельев С.В. // Научно-практическая конференция с международным участием «Достижения и инновации в современной морфологии», посвященная 115-летию со дня рождения академика Д.М. Голуба: Материалы конференции. – Минск, 2016. – Т. 2. – С. 107.