

tance Is Modulated by Mutational Interactions // J. Virology. – Vol. 81, No. 6. – 2007. – P. 3037-3041.

4. Dykes C., Demeter L. M. Clinical Significance of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication Fitness // Clinical microbiology reviews. – Oct. 2007. – P. 550-578.

5. Gao Y., Paxinos E., Galovich J., et al. Characterization of a Subtype D Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolate That Was Obtained from an Untreated Individual and That Is Highly Resistant to Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors // J. of Virology. – May 2004. – P. 5390-5401.

6. <http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de>.

7. <http://hivdb6.stanford.edu>.

8. <http://indra.mullins.microbiol.washington.edu/webpssm>.

9. Human Retrovirus Protocols Virology and Molecular Biology / Edited by Tuofu Zhu, MD. – Humana Press. – Totowa, New Jersey, 2005. – 495 p.

10. Martinez-Picado J., Savara A.V., Sutton L., D'Aquila R. T. Replicative Fitness of Protease Inhibitor-Resistant Mutants of Human Immunodeficiency Virus Type 1 // J Virol. – 1999 May. – 73 (5). – P. 3744-3752.

11. Tamura K., Dudley J., Nei M and Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol Biol Evol. – 2007. – Vol. 24. – P. 1596-1599.

12. Zennou V., Mammano F., Paulous S. Loss of Viral Fitness Associated with Multiple Gag and Gag-Pol Processing Defects in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants Selected for Resistance to Protease Inhibitors In Vivo // J. Virology. – 1998. – Vol. 72, No. 4. – P. 3300-3306.

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНДОКРИННОЙ СОСТАВЛЯЮЩЕЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ АКУЛЫ (*CHILLOSYLUM PUNCTATUM*)

© Савельева Е.С.^{*}, Прощина А.Е.[♦]

Научно-исследовательский институт Морфологии человека РАН, г. Москва

Исследована поджелудочная железа акулы *Chilosyllium punctatum* (Müller and Henle, 1838). Проведены: макроанатомическое, гистологическое и иммуногистохимическое исследования. Для гистологического исследования применялись методы окраски Гематоксилин-эозином, по Гроссо, по Ван Гизону, по Маллори. Для иммуногистохимического исследования использовались реактивы: мышинные моноклональные антитела к глюкагону, инсулину и нейрон специфической эналазе (NSE) фирмы Lab Vision, а также кроличьи поликлональные антитела к сомато-

^{*} Научный сотрудник лаборатории Развития нервной системы.

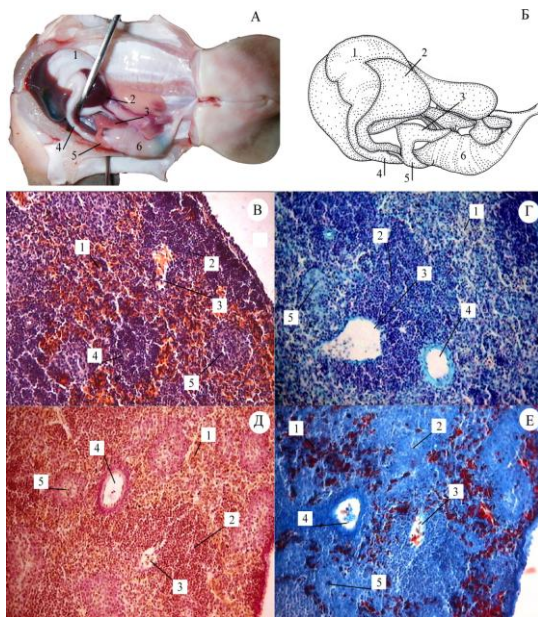
[♦] Научный сотрудник лаборатории Развития нервной системы.

статину, панкреатическому полипептиду (PP) фирмы Абкам. Полученные результаты говорят о паренхиматозном строении экзокринной и эндокринной составляющих поджелудочной железы акулы данного вида.

В систематическом ряду акула относится к классу хрящевых рыб *Chondrichthyes*, подклассу *Elasmobranchii*. Акула вида *Chiloscyllium punctatum* принадлежит отряду воббегонгообразные *Orectolobiformes*, семейству *Ginglymostomidae* – ковровые акулы. Относится к биологической группе морских, бентических, хищных, яйцекладущих акул. Ареал обитания: шельфовые воды тропических и субтропических районов Атлантического, Тихого и Индийского океанов. Акула *Chiloscyllium punctatum* распространена у берегов Индонезии, Китая, Северной и Северо-восточной Австралии на глубинах менее 30 метров. По типу питания придонный хищник. В естественных условиях питается донными беспозвоночными и мелкими рыбами регионов обитания [15], в условиях аквариумного содержания кормом служат мороженные черноморские креветки (*Palaemon adspersus*, *Crangon crangon*) – 20 %, мантия кальмара – 40 % и черноморская килька (*Sprattus sprattus phalericus*) – 40 % [2].

Нами была исследована неполовозрелая особь кошачьей коричневопалосой акулы (*Chiloscyllium punctatum*), самец, вес 107 гр, длина 394 мм, наибольшая толщина 38 мм. Было проведено как макроанатомическое, так и микроанатомическое – гистологическое, и иммуногистохимическое исследование поджелудочной железы акулы.

Макроанатомическое исследование. Поджелудочная железа акулы (*Chiloscyllium punctatum*) не образует единого комплекса с печенью (гепатопанкреас) как у некоторых других видов [3]. Расположена каудальнее печени, соединяясь с ней узким перешейком. Состоит из двух частей: дорзальной, вентральной аналогично строению поджелудочной железы катрана [1]. Дорзальная доля имеет форму уплощенного вытянутого тела (рис. 1 а, б). Простирается от каудального края желудка вдоль спинной аорты до первой трети толстой кишки, частично прилежит к толстой кишке. Вентральная доля более тонкая и вытянутая, нежели дорзальная. Соединяется с дорзальной долей плавным переходом. В каудальной части вентральная доля прилежит к двенадцатиперстной кишке, охватывая ее дугообразно в месте соединения с толстой кишкой и простираясь в краниальном направлении вдоль двенадцатиперстной кишки. Проток поджелудочной железы идет по внутренней стороне вентральной лопасти и открывается на вентральной стороне двенадцатиперстной кишки в последней трети ее длины. Перед впадением в кишку он, на значительном расстоянии, проходит внутри ее стенки. Кровоснабжение поджелудочной железы осуществляется различными артериями, в зависимости от доли. Вентральная доля поджелудочной железы снабжается кровью через кишечную артерию (a. intestinalis), двенадцатиперстную артерию (a. duodenalis), дорзальная доля – через желудочную артерию (a. gastrica), селезеночно-желудочную артерию (a. lieno-gastrica). Отток крови производится через воротную вену печени (v. porta hepatis) и желудочную вену (v. gastrica) [1].



а – топография органов, б – схема расположения поджелудочной железы; цифрами обозначены: 1 – желудок, 2 – печень, 3 – дорзальная доля поджелудочной железы, 4 – двенадцатиперстная кишка, 5 – вентральная доля поджелудочной железы; в – окраска гематоксилин (по Эрлиху) – эозин-оранж (по Доминичи), г – метиловый зеленый-пиронин-оранжевый Ж (по Гроссо) – Альциановый голубой, д – гематоксилин – пикрофуксин (по Ван Гизону), е – фуксин – оранж г – анилиновый синий (по Маллори). Цифрами обозначены: 1 – эндокринная паренхима, 2 – экзокринная паренхима, 3 – венула, 4 – артериола, 5 – экзокринный проток

*Рис. 1. Макроанатомическое и гистологическое исследование поджелудочной железы акулы *Chilosyllium punctatum**

Поджелудочная железа акулы (*Chilosyllium punctatum*) не образует единого комплекса с печенью (гепатопанкреас) как у некоторых других видов [3, 7]. Расположена каудальнее печени, соединяясь с ней узким перешейком. Состоит из двух частей: дорзальной, вентральной аналогично строению поджелудочной железы катрана [1]. Дорзальная доля имеет форму уплотненного вытянутого тела (а, 3 на рис. 1). Простирается от каудального края желудка вдоль спинной аорты до первой трети толстой кишки, частично прилежит к толстой кишке. Вентральная доля более тонкая и вытянутая, нежели дорзальная. Соединяется с дорзальной долей плавным переходом. В каудальной части вентральная доля прилежит к двенадцатиперстной кишке, охватывая ее дугообразно в месте соединения с толстой кишкой и простираясь в краниальном направлении вдоль двенадцатиперстной кишки. Проток поджелудочной железы идет по внутренней стороне вентральной лопасти и открывается на вентральной стороне двенадцатиперстной кишки в послед-

ней трети ее длины. Перед впадением в кишку он на значительном расстоянии проходит внутри ее стенки. Кровоснабжение поджелудочной железы осуществляется различными артериями, в зависимости от доли. Вентральная доля поджелудочной железы снабжается кровью через кишечную артерию (a. intestinalis), двенадцатиперстную артерию (a. duodenalis), дорзальная доля – через желудочную артерию (a. gastrica), селезеночно-желудочную артерию (a. lieno-gastrica). Отток крови производится через воротную вену печени (v. porta hepatis) и желудочную вену (v. gastrica).

Поджелудочная железа акулы была окрашена четырьмя гистологическими способами: гематоксилин (по Эрлиху) – эозин-оранж (по Доминичи), гематоксилин-пикрофуксин (по Ван Гизону), метиловый зеленый-пиронин-оранжевый Ж (по Гроссо) – Альциановый голубой, фуксин-оранж G-анилиновый синий (по Маллори), это позволило установить, что в поджелудочной железе не выявляются ни трабекулярный аппарат, характерный для костистых рыб [14], ни тельца Брокмана [13, 18], ни островки [5, 6, 8, 9, 11, 16, 17], характерные для млекопитающих и человека. Сама железа имеет паренхиматозное строение, в котором нет ясных границ и четко выраженной базальной мембраны вокруг скоплений экзокринных клеток (рис. 1 в-е). Экзокринные протоки окружены клетками, секретирующими пищеварительные ферменты, но при этом не образующими базальной мембраны.

Поджелудочная железа акулы окружена наружной оболочкой, через которую проникают сосуды (рис. 1 в, д, е). Оболочка выстлана плотным коллагеном, образующим практически не проницаемую преграду и специфическим наружным эпителием характерным для синусов различного происхождения [10, 12]. Сосуды не образуют сложных систем, сплетений, извитых каналов или клубочков, а только проходят сквозь толщу. Гистологические окраски и в частности, окраска по Ван Гизону, позволили идентифицировать крупную вену, проходящую в центральной части поджелудочной железы со стороны двенадцатиперстной кишки и примыкающую к ней артерию. В теле поджелудочной железы сосуды легко различимы по строению: приносящие артериолы имеют ярко выраженную оболочку, выводящие венулы, наоборот, оболочки почти не имеют (рис. 1 в-е). Капиллярная сеть отсутствует. Кровь, попадая в поджелудочную железу, изливается из артериол в паренхиму. Клетки крови свободно мигрируют в теле поджелудочной железы. Отток крови происходит путем миграции клеток в венулы. Из чего следует, что у данной акулы кровеносная система поджелудочной железы открытого типа. Такая система кровоснабжения дает основания предполагать синусообразное строение поджелудочной железы.

Крупных нервов и их отростков на гистологически-окрашенных препаратах также не обнаружено.

Экзокринные клетки более плотные, окрашиваются в более насыщенные темные цвета Гематоксилин – эозином-оранжевым G, по Гроссо, по Ван-Гизону и более светлыми голубыми тонами по Маллори (рис. 1 в-е).

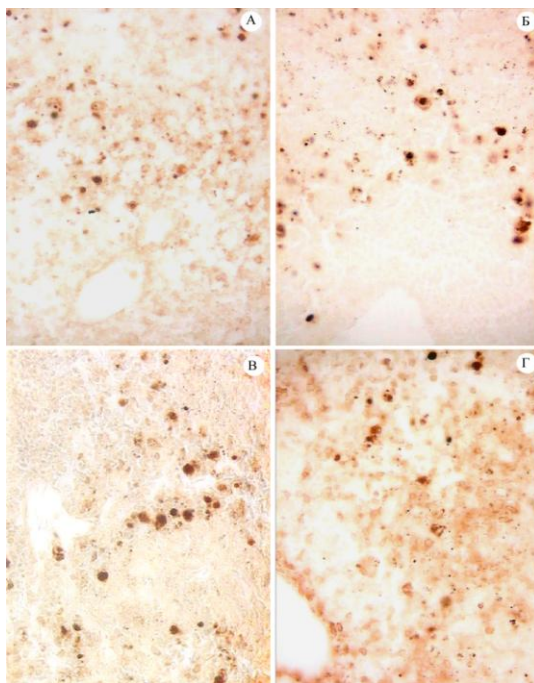
Клетки образуют скопления вокруг протоков. Протоки поджелудочной железы имеют оболочку, окруженную плотными слоями упорядоченных экзокринных клеток. Экзокринные клетки, прилежащие к протокам, более крупные, нежели клетки экзокринной паренхимы, имеют яркоокрашенные ядра и окрашенную в более светлые тона цитоплазму. На окрасках Гематоксилин – эозином-оранжевым G и по Гроссо такие клетки имеют темно-фиолетовые ядра со светло-фиолетовой цитоплазмой, по Ван Гизону – темно-красные ядра со светло-розовой цитоплазмой, по Маллори – голубые с неочевидно видимыми ядрами. Однако, экзокринные протоки не разветвляются на более мелкие. Вокруг протоков образуется экзокринная паренхима низкоорганизованная не имеющая специализации клеток, которые вероятно мигрируют или, образуя отростки, выбрасывают пищеварительные ферменты в проток.

Между экзокринными участками, сконцентрированными вокруг протоков и венул, располагаются эндокринные зоны. Эндокринная часть состоит из скоплений эндокринных клеток, не образующих островков. Эндокринная паренхима образуется рассеянными клетками не образующими оформленные конгломераты, не формирующие конгломераты трубчатого или альвеолярного типа как у костистых рыб [7] Они не формируют островковых или островково-подобных структур характерных для млекопитающих [8, 9, 16]. На гистологических препаратах окрашены в более светлые цвета Гематоксилин – эозином-оранжевым G, по Гроссо, по Ван-Гизону и более темные голубые тона по Маллори (рис. 1 в-е). На окраске Гематоксилин – эозином-оранжевым G на большом увеличении видно, что между клетками эндокринной паренхимы располагаются клетки крови (ярко-оранжевые с видимыми ядрами), которые также хорошо заметны на окраске по Маллори (красные с более насыщенными красными ядрами). Они свободно передвигаются между эндокринными клетками, изливаясь из сосудов. Аналогичная картина наблюдается и в зоне экзокринных скоплений клеток.

Анализ препаратов, окрашенных Гематоксилин – эозином-оранжевым G, по Гроссо, по Ван-Гизону и по Маллори позволил сделать следующие выводы: кровеносная система акулы (*Chilosyllum punctatum*) не замкнутого типа. Клетки крови выходят из артериол в ткань поджелудочной железы и проходят между клетками эндокринной паренхимы. Эндокринные клетки контактируют с эритроцитами непосредственно, что обеспечивает как их питание, так и перенос вырабатываемых гормонов. Выделение эндокринными клетками гормонов происходит как при непосредственном контакте с клетками крови, так и в их отсутствии.

Для изучения эндокринной функции поджелудочной железы было применено иммуногистохимическое исследование, посредством иммуногистохимических реакций на соседних, с гистологически-окрашенными, срезах. Для исследования поджелудочной железы акулы использовались мышинные моноклональные антитела к глюкагону, инсулину, и нейрон специфической энolahze (NSE) фирмы Lab Vision, а также кроличьи поликлональные антитела к сома-

тостатину и панкреатическому полипептиду (РР) фирмы Абкам. Проведенные иммуногистохимические реакции с антителами к глюкагону, инсулину, соматостатину и нейрон специфической эналазе выявили иммуно-позитивную реакцию в зонах распределения эндокринных клеток (рис. 2 а-г). Иммунопозитивные к глюкагону клетки распределяются рассеянными полями между, и по периферии экзокринных каналов и венул. Кроме того слабое окрашивание наблюдается в оболочке венул и по периферии экзокринных протоков. Но, несмотря на наличие множества секреторных эндокринных клеток не все из них положительны к глюкагону. У акулы наряду с отдельными клетками существуют скопления, состоящие из нескольких клеток расположенных в непосредственной близости друг к другу. Они располагаются на периферии экзокринных каналов. Имеются клетки различных типов: 1 – в начале секреции, 2 – активно секретирующие, 3 – погибающие, 4 – погибшие. Таким образом, можно заключить следующее – глюкагон в поджелудочной железе акулы вырабатывается интенсивно, и часть клеток погибает в процессе выработки (рис. 2 а).



а – иммунопозитивная реакция с антителами к глюкагону; б – иммунопозитивная реакция с антителами к инсулину; в – иммунопозитивная реакция с антителами к соматостатину; г – иммунопозитивная реакция с антителами к NSE

*Рис. 2. Иммуногистохимическое исследование поджелудочной железы акулы *Chilosyllium punctatum**

Инсулин продуцирующие клетки плотных скоплений напоминающих островковые или островковоподобные структуры не образуют. Распределение инсулин позитивных клеток в поджелудочной железе акулы также как и глюкагон позитивных клеток зональное, рассеянными полями, ограниченными экзокринной паренхимой (рис. 2 б). Иммуно-позитивная реакция с антителами к инсулину наблюдалась исключительно в эндокринной паренхиме. Клетки обнаружены в непосредственном контакте с клетками крови. Инсулин продуцирующие клетки одиночные, образуют скопления из нескольких близко расположенных клеток. На большом увеличении видно, что инсулин позитивные клетки в паренхиме поджелудочной железы акулы имеют различное состояние и размер. Имеются инсулин продуцирующие клетки также разных типов.

Позитивная реакция на соматостатин методом иммуногистохимической реакции с антителами к соматостатину показала распределение иммунопозитивных клеток только в эндокринной паренхиме (рис. 2 в). Иммуногистохимическая реакция с антителами к панкреатическому полипептиду (PP) не выявила PP-позитивных клеток в поджелудочной железе акулы данного вида.

Для изучения иннервации поджелудочной железы акулы было проведено иммуногистохимическое исследование с антителами к нейрон-специфической энolahе (NSE), так как на гистологических препаратах выявить крупные нервы не удалось. Нейрон-специфическая энolahа (NSE) экспрессируется в различных клетках. Позитивная реакция на NSE выявляется в зонах локализации секретирующих эндокринных клеток (рис. 2 г). Так наблюдается слабая реакция в зоне эндокринных протоков, отчетливая реакция в стенках артериол, венул и наиболее яркое окрашивание некоторых клеток эндокринной паренхимы. Нейрон-специфическая энolahа не выявляется в экзокринной паренхиме. В эндокринной паренхиме поджелудочной железы акулы нейрон-специфическая энolahа встречается в клетках всех типов: 1 – незрелая NSE содержащая клетка, 2 – NSE секретирующая клетка, 3 – погибающая клетка, 4 – погибшая клетка. В связи с полученными результатами можно заключить, что иммуно-позитивные к нейрон-специфической энolahе клетки распределены по всей эндокринной паренхиме, но активно секретируют лишь некоторые, а остальные содержат секрет или являются не активными до определенного момента. Следует отметить, что позитивная реакция с нейрон-специфической энolahой распространялась не только на отдельные клетки соседние с инсулином, глюкагоном или соматостатином, а перекрывала поля, экспрессирующих глюкагон, инсулин и соматостатин клеток, целиком, как бы объединяя их в эндокринную группу (рис. 2 г).

По результатам исследований можно заключить следующие:

1. поджелудочная железа акулы *Chilosyllum punctatum* имеет паренхиматозное строение как эндокринной так и экзокринной составляющих. Эндокринная паренхима организована в поля;
2. эндокринные клетки не образуют островков лангерганса или островково-подобных структур;

3. в эндокринной составляющей поджелудочной железы акулы обнаружены три типа эндокринных клеток: инсулин-, глюкагон- и соматостатин-позитивные клетки;
4. кровоснабжение поджелудочной железы акулы не замкнутого типа. Клетки крови выходят из артериол в ткань поджелудочной железы и проходят между клетками эндокринной паренхимы. Эндокринные клетки контактируют с эритроцитами непосредственно, что обеспечивает как их питание, так и перенос вырабатываемых гормонов. Выделение эндокринными клетками гормонов происходит как при непосредственном контакте с клетками крови, так и в их отсутствии;
5. поджелудочная железа акулы окружена наружной оболочкой, через которую проникают сосуды. Оболочка выстлана плотным коллагеном, образующим практически непроницаемую преграду и специфическим наружным эпителием характерным для синусов различного происхождения.

Список литературы:

1. Гуртовой Н.Н., Матвеев Б.С., Дзержинский Ф.Я. Практическая зоотомия позвоночных. Низшие хордовые, бесчелостные, рыбы. – М., 1976. – 351 с.
2. Кирич М.П., Пономарев Б.Б. Опыт содержания и разведения ковровой акулы *Chiloscyllium punctatum* (Muller et Henke, 1841) в Севастопольском морском аквариуме-музее // Евроазиатская региональная ассоциация зоопарков и аквариумов, правительство Москвы Московский зоологический парк. Научные исследования в зоологических парках. – 2008. – Вып. 24. – С. 5-8.
3. Осипов В.Г., Урманов М.И., Щитова Л.Г. Некоторые данные об анатомии пищеварительной системы и питании акул // Известия ТИНРО. – 1972. – Т. 81. – С. 186-200.
4. Парин Н.В. Рыбы открытого океана. – М.: Наука, 1988. – 272 с.
5. Савельев С.В., Барабанов В.М., Савельева Е.С., Кривова Ю.С. Иммуногистохимическое выявление SNAP-25, NCAM и инсулина в поджелудочной железе нутрии (*Myocastor coypus*) // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – № 11. – С. 582-585
6. Савельев С.В., Барабанов В.М., Савельева Е.С., Кривова Ю.С. Нейроэндокринные комплексы в поджелудочной железе нутрии (*Myocastor coypus*) (иммуногистохимическое исследование) // Морфология. – 2009. – № 3. – С. 59-62.
7. Яглов В.В. Морфология эндокринной части поджелудочной железы костистых рыб // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1978. – № 1. – С. 111-115.
8. Case R.M., Harper A.A., Scratherd T. The secretion of electrolytes and enzymes by the pancreas of the anaesthetized cat // J. Physiol. – 1969. – Vol. 201. – P. 335-348.
9. Coupland R. The innervations of pancreas of the rat, cat and rabbit as revealed by the cholinesterase technique // J. of Anatomy. – 1953. – V. 92. – № 1. – P. 143-149.

10. Dukor P., Bianco C., Nussenzweig V. Tissue localization of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody-complement complexes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1970. – V. 67. – № 2. – P. 991-997.

11. Furuoka H., Ito H., Hamada M., Suva T., Saton H., Itacura Ch. Immunocytochemical Component of Endocrine Cells in Pancreas Islets of Horses // *Jpn. J. Vet. Sci.* – 1989. – № 51 (1). – P. 35-43.

12. Jaffe E.S., Shevach E.M., Sussman E.H., Frank M., Green I., Berard C.W. Membrane receptor sites for the identification of lymphoreticular cells in benign and malignant conditions // *Br. J. Cancer*. – 1975. – № 31. – Suppl. II. – P. 107.

13. Joñsson A.-C. Regulatory peptides in the pancreas of two species of elasmobranchs and in the Brockmann bodies of four teleost species // *Cell Tissue Res.* – 1991. – № 266. – P. 163-172.

14. John H. Youson, Azza A. Al-Mahrouki. Ontogenetic and Phylogenetic Development of the Endocrine Pancreas (Islet Organ) // *Fishes Department of Zoology and Division of Life Sciences. University of Toronto at Scarborough, Scarborough. Ontario M1C 1A4 Canada Accepted. General and Comparative Endocrinology*. – 1999. – № 116. – P. 303-335.

15. Leonard J.V. Sharks of the world an annotated and illustrated catalogue of shark species known to date FAO // *Species Catalogue for Fishery Purposes*. – 2001. – № 1. – Vol. 200100. – Rome, Italy. FAO. – P. 175-176.

16. Shields D., Blobel G. Cell-free synthesis of fish preproinsulin, and processing by heterologous mammalian microsomal membranes // *Department of Cell Biology, Rockefeller University. New York. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1977. – Vol. 74. – № 5. – P. 2059-2063.

17. White T.T., Magee D.F. Perfusion of the Dog Pancreas with Bile Without Production of Pancreatitis // *Annals of Surgery*. – 1960. – P. 245-250.

18. Yang H., Wright, J.R., Jr. A method for mass harvesting islets (Brockmann bodies) from teleost fish // *Cell Transpl.* – 1995. – № 4. – P. 621-628.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ИННЕРВАЦИИ СОСУДИСТЫХ СПЛЕТЕНИЙ БОКОВЫХ ЖЕЛУДОЧКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

© Юнеман О.А.*

Научно-исследовательский институт Морфологии человека РАМН, г. Москва

В работе представлены данные по изучению иннервации сосудистых сплетений боковых желудочков головного мозга человека. Были использованы антитела к нейрон-специфическому β-III тубулину, нейрон-специфической энolahе, основному белку миелина, синапсину, синаптофизину, рецептору фактора роста нервов, NCAM и S-100. С по-

* Аспирант лаборатории Развития нервной системы.