

## Применение антител к везикулярному транспортеру ацетилхолина и ацетилхолинэстеразе в исследованиях пренатального развития парасимпатической иннервации поджелудочной железы человека

Ю.С. Кривова, А.Е. Прощина, Д.А. Отлыга, С.В. Савельев

ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия

*Введение.* Парасимпатические волокна, иннервирующие поджелудочную железу (ПЖ), участвуют в регуляции ее экзокринной и эндокринной функции, контролируют пролиферацию эндокринных клеток, а также вовлечены в патогенез сахарного диабета 1-го типа. Данные о распределении парасимпатических волокон в ПЖ человека в период внутриутробного развития в литературе отсутствуют. Цель исследования – определить возможность использования маркеров холинергических нейронов и нервных волокон – везикулярного транспортера ацетилхолина (VACHT) и ацетилхолинэстеразы (AChE) для исследования пренатального развития парасимпатической иннервации ПЖ человека.

*Материалы и методы.* Работа выполнена на 10 аутопсиях ПЖ плодов (гестационный возраст 14–34 недели) при помощи иммунопероксидазного маркирования антителами к VACHT и AChE.

*Результаты.* Иммунопозитивная реакция с антителами к AChE выявлена в пучках нервных волокон различного диаметра, сети тонких нервных волокон, а также в отдельных нейронах интрамуральных ганглиев. Реакция с антителами к VACHT в структурах нервной системы была иммунонегативной. На исследованных сроках развития тонкие холинергические волокна преобладали в экзокринной части ПЖ: в междольковой соединительной ткани, вблизи протоков и внутри формирующихся долек. В панкреатических островках холинергические волокна выявлялись реже и были локализованы на периферии. Иммунопозитивная реакция с антителами к AChE и мышинными моноклональными антителами к VACHT выявлена также в цитоплазме части эндокринных клеток панкреатических островков.

*Заключение.* Установлено, что антитела к AChE позволяют выявлять в развивающейся ПЖ человека холинергические нейроны и нервные волокна. Показано, что в ПЖ тонкие холинергические волокна преобладают в экзокринном отделе железы и редко выявляются в панкреатических островках, что характерно и для взрослых людей. Данные об экспрессии VACHT и AChE в эндокринных клетках панкреатических островков у плодов согласуются с результатами исследований на образцах ПЖ взрослых людей и свидетельствуют о том, что эндокринные клетки могут служить источником ацетилхолина.

**Ключевые слова:** поджелудочная железа, развитие человека, парасимпатическая иннервация, VACHT, AChE

**Для корреспонденции:** Юлия Сергеевна Кривова. E-mail: homulkina@gmail.com

**Для цитирования:** Кривова Ю.С., Прощина А.Е., Отлыга Д.А., Савельев С.В. Применение антител к везикулярному транспортеру ацетилхолина и ацетилхолинэстеразе в исследованиях пренатального развития парасимпатической иннервации поджелудочной железы человека. Клини. эксп. морфология. 2020;9(3):27–33. DOI:10.31088/CEM2020.9.3.27-33

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-015-00146.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 10.12.2019. Получена после рецензирования 16.01.2020. Принята в печать 11.02.2020.

## Application of antibodies to the vesicular transporter of acetylcholine and acetylcholinesterase in the studies of prenatal development of parasympathetic innervation of the human pancreas

Y.S. Krivova, A.E. Proshchina, D.A. Otylga, S.V. Saveliev

Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

*Introduction.* Parasympathetic fibers innervating the pancreas are involved in the regulation of both exocrine and endocrine function, in the regulation of endocrine cell proliferation, and are also implicated in the pathogenesis of type 1 diabetes. Nonetheless, data concerning the distribution of parasympathetic fibers within the human pancreas in prenatal development are absent in the literature.

Our aim was to evaluate the possibility of using the markers of cholinergic neurons and nerve fibers, namely vesicular acetylcholine transporter (VAChT) and acetylcholinesterase (AChE) in studies of prenatal development of parasympathetic innervation of the human pancreas.

*Materials and methods.* The study was performed on 10 autopsies of the fetal pancreas (gestational age 10–34 weeks) using immunoperoxidase labeling with antibodies to VAChT and AChE.

*Results.* Immunopositive reaction to AChE was detected in bundles of nerve fibers of various diameters, networks of thin nerve fibers as well as in individual neurons of the intramural ganglia. The structures of the nervous system were immunonegative to VAChT. In the exocrine pancreas, that is, in the interlobular connective tissue, near the ducts and inside the forming lobules, thin cholinergic fibers prevailed on the studied developmental periods. In pancreatic islets, cholinergic fibers were detected less frequently and were located at the periphery. Immunopositive reaction with antibodies to AChE and mouse monoclonal antibodies to VAChT was also detected in some endocrine cells in the pancreatic islets.

*Conclusion.* We have shown that antibodies to AChE detect cholinergic neurons and nerve fibers in the developing human pancreas. We have also demonstrated that in the fetal pancreas thin cholinergic fibers prevail in the exocrine part and rarely are detected in the pancreatic islets, which is typical in adults. The results showing the VAChT and AChE immunoreactivity in the endocrine cells of fetal pancreatic islets are in agreement with data obtained in the adult human pancreas and suggest that the endocrine cells can be a source of acetylcholine.

**Keywords:** pancreas, human development, parasympathetic innervation, VAChT, AChE

**Corresponding author:** Yuliya S. Krivova. E-mail: homulkina@gmail.com

**For citation:** Krivova Y.S., Proshchina A.E., Otlyga D.A., Saveliyev S.V. Application of antibodies to the vesicular transporter of acetylcholine and acetylcholinesterase in the studies of prenatal development of parasympathetic innervation of the human pancreas. *Clin. exp. morphology.* 2020;9(3):27–33 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.3.27-33.

**Funding.** The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, Project № 18-015-00146.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received** 10.12.2019. **Received in revised form** 16.01.2020. **Accepted** 11.02.2020.

## Введение

Поджелудочная железа (ПЖ) обильно иннервирована волокнами автономной нервной системы. Хорошо известно, что симпатические и парасимпатические волокна играют важную роль в регуляции экзокринной и эндокринной функции ПЖ [1–4]. Ряд экспериментальных исследований свидетельствует об участии парасимпатических волокон в регуляции количества В-клеток: снижение уровня пролиферации В-клеток обнаружено у мышей [5] и крыс [6] после ваготомии. Кроме того, автономная нервная система вовлечена в патогенез ряда заболеваний, в том числе сахарного диабета 1-го типа. При этом заболевании отмечено снижение количества симпатических нервных волокон в панкреатических островках [7] и снижение количества парасимпатических волокон в экзокринном отделе ПЖ [8].

Считается, что парасимпатическая регуляция экзокринной и эндокринной секреции осуществляется преимущественно за счет выделения постганглионарными волокнами ацетилхолина, который связывается с мускариновыми рецепторами, обнаруженными на всех типах клеток ПЖ [2, 3]. В связи с этим большинство исследований, посвященных парасимпатической иннервации ПЖ, направлено на выявление холинергических нейронов и нервных волокон.

Классическим маркером холинергических нейронов и нервных волокон служит ацетилхолинэстераза

(AChE) – фермент, участвующий в распаде ацетилхолина до холина и ацетата. На срезах ПЖ выявление AChE проводилось преимущественно гистохимическим методом (определение активности AChE) [9–11].

В современных иммуногистохимических исследованиях для идентификации холинергических нейронов и нервных волокон широко используются антитела к везикулярному транспортеру ацетилхолина (VAChT) – транспортному белку, осуществляющему перенос ацетилхолина в секреторные пузырьки. Методами гибридизации *in situ* экспрессия VAChT выявлена в целом ряде нейронов периферической симпатической и парасимпатической системы [12]. В иммуногистохимических работах показано, что антитела к VAChT маркируют как холинергические окончания, содержащие большое количество маленьких синаптических пузырьков, несущих этот антиген, так и тела нейронов, где происходит образование секреторных пузырьков [13, 14].

В ПЖ млекопитающих (мышь, овца, кролик) большинство нейронов парасимпатических интрамуральных ганглиев содержит AChE или VAChT, то есть представляет собой холинергические нейроны [10, 15, 16]. Холинергические нервные окончания обнаружены на гладкомышечных клетках сосудов, вблизи протоков и ацинарных клеток, а также в панкреатических островках [10, 15–18]. Тем не менее их распределение в ПЖ у разных видов существенно отличается. Например,

для курицы [9] и овцы [16] характерно преобладание холинергических волокон в экзокринной части железы. Напротив, в ПЖ мышей плотность холинергических волокон в панкреатических островках значительно выше, чем в экзокринной части; холинергические волокна выявляются в центральной области островков и иннервируют как В-, так и А-клетки [17].

Иннервация ПЖ человека, в том числе парасимпатическая, развита заметно слабее, чем у мышей [17, 18]. У взрослых людей холинергические окончания преобладают в экзокринной части ПЖ [17]. Кроме того, холинергические волокна выявляются вокруг нейронов интрамуральных ганглиев [18] и формируют периваскулярные нервные сплетения [11]. В составе эндокринной части ПЖ холинергические волокна выявляются редко [17, 18]. В гистохимическом исследовании показано, что тонкие холинергические волокна образуют сплетения на периферии панкреатических островков, при этом внутрь островка проникают лишь отдельные волокна [11]. Позднее, методами иммунофлуоресценции и конфокальной микроскопии, установлено, что в панкреатических островках людей присутствуют лишь редкие холинергические волокна, которые располагаются в дискретных регионах и не контактируют с большинством эндокринных клеток [17]. Впрочем, отдельные холинергические волокна обнаружены вблизи А-клеток, на расстоянии, не превышающем 50 мкм [18].

В период внутриутробного развития ПЖ человека иннервирована обильнее, чем у взрослых [19, 20]. Нервный аппарат ПЖ плодов представлен пучками нервных волокон разного диаметра, сетью тонких нервных волокон и интрамуральными ганглиями [19–21]. Кроме того, в ПЖ плодов выявляются комплексы, образованные структурами нервной системы – нейронами и нервными волокнами и эндокринными клетками (нейроинсулярные комплексы) [19, 20]. Однако предыдущие иммуногистохимические исследования, посвященные пренатальному развитию иннервации ПЖ человека, выполнены с применением различных структурных и функциональных маркеров, таких как S100, NSE, нейронспецифический бета-3 тубулин, SNAP-25 и т.д. [19–21]. Данные о распределении структур симпатической и парасимпатической нервной систем в развивающейся ПЖ человека в литературе отсутствуют.

Цель нашей работы – определить возможность использования маркеров холинергических нейронов и нервных волокон (VAcHt и AChE) для исследования пренатального развития парасимпатической иннервации ПЖ человека.

### Материалы и методы

Работа выполнена на 10 аутопсиях ПЖ плодов, гестационный возраст 14–34 недели. Возраст плодов определен по клиническим данным и представлен в неделях от даты последнего менструального цикла.

Фрагменты из тела ПЖ фиксировали в нейтральном формалине (4% формальдегид на 0,1М фосфатном буфере, pH 7,5). Фиксированные образцы ПЖ обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и диоксане, заливали в гистомикс («Биовитрум», Санкт-Петербург, Россия) и готовили серийные срезы толщиной 5–7 мкм.

При проведении иммуногистохимических реакций срезы депарафинировали, гидратировали, проводили блокировку активности эндогенной пероксидазы, демаскирование антигенов и блокировку неспецифического связывания, а затем инкубировали с первичными антителами в течение 1 часа при температуре +37°C. В качестве первичных антител применяли мышинные моноклональные антитела к VAcHt (Sigma, МО, США, Cat.#SAB5200240; 1:50–1:100), кроличьи поликлональные антитела к VAcHt (N-terminal) (Sigma, МО, США, Cat.#SAB4200560; 1:100–1:200), кроличьи поликлональные антитела к AChE (GeneTex, CA, США, Cat.#GTX101648; 1:100–1:500). Демаскирование антигенов проводили кипячением срезов в 0,01М цитратном буфере, pH 6,0, в микроволновой печи в течение 10 минут с последующим остыванием срезов (20 минут). Для блокировки активности эндогенной пероксидазы, блокировки неспецифического связывания и визуализации реакций использовали реактивы из набора UltraVision ONE Detection System (Thermo Fisher Scientific Inc., CA, США, Cat.#TL-015-HDJ) согласно спецификации. Негативным контролем служили реакции, в которых первичные антитела заменяли 0,01М фосфатным буфером.

### Результаты

Во всех исследованных образцах ПЖ в структурах нервной системы наблюдалась иммунопозитивная реакция с антителами к AChE (рис. 1). Иммунореактивность к этому маркеру локализована преимущественно в нервных волокнах, как входящих в состав нервных пучков разного диаметра, так и в одиночных (рис. 1 А). В интрамуральных ганглиях антителами к AChE маркировались преимущественно тонкие нервные волокна, расположенные вокруг нейронов. Слабая иммунопозитивная реакция на AChE наблюдалась в цитоплазме отдельных нейронов (рис. 1 В). В большинстве нейронов интрамуральных ганглиев реакция на AChE была иммунонегативной.

Распределение AChE-содержащих нервных волокон в ткани ПЖ на исследованных сроках развития было сходным. Пучки AChE-содержащих нервных волокон разного диаметра выявлены в междольковой соединительной ткани, где они проходили самостоятельно или сопровождали кровеносные сосуды (рис. 1 А). Тонкие AChE-содержащие волокна присутствовали преимущественно в экзокринной части ПЖ: в междольковой соединительной ткани, вблизи выводных протоков и внутри формирующихся долек (рис. 1 А). В стенке кровеносных сосудов тонкие AChE-содержащие волокна выявлялись редко. Немногочисленные тонкие AChE-содержащие волокна обнаружены в панкреатических

островках, расположенных отдельно (рис. 1 В), а также в панкреатических островках, интегрированных с ганглионарными нейронами в нейроинсулярные комплексы I типа (рис. 1 С). В составе панкреатических островков тонкие АСhE-содержащие нервные волокна были локализованы на периферии и не выявлялись внутри островка между эндокринными клетками (рис. 1 В). В нейроинсулярных комплексах I типа тонкие АСhE-содержащие нервные волокна присутствовали как на периферии островка, так и вокруг ганглионарных нейронов (рис. 1 В).

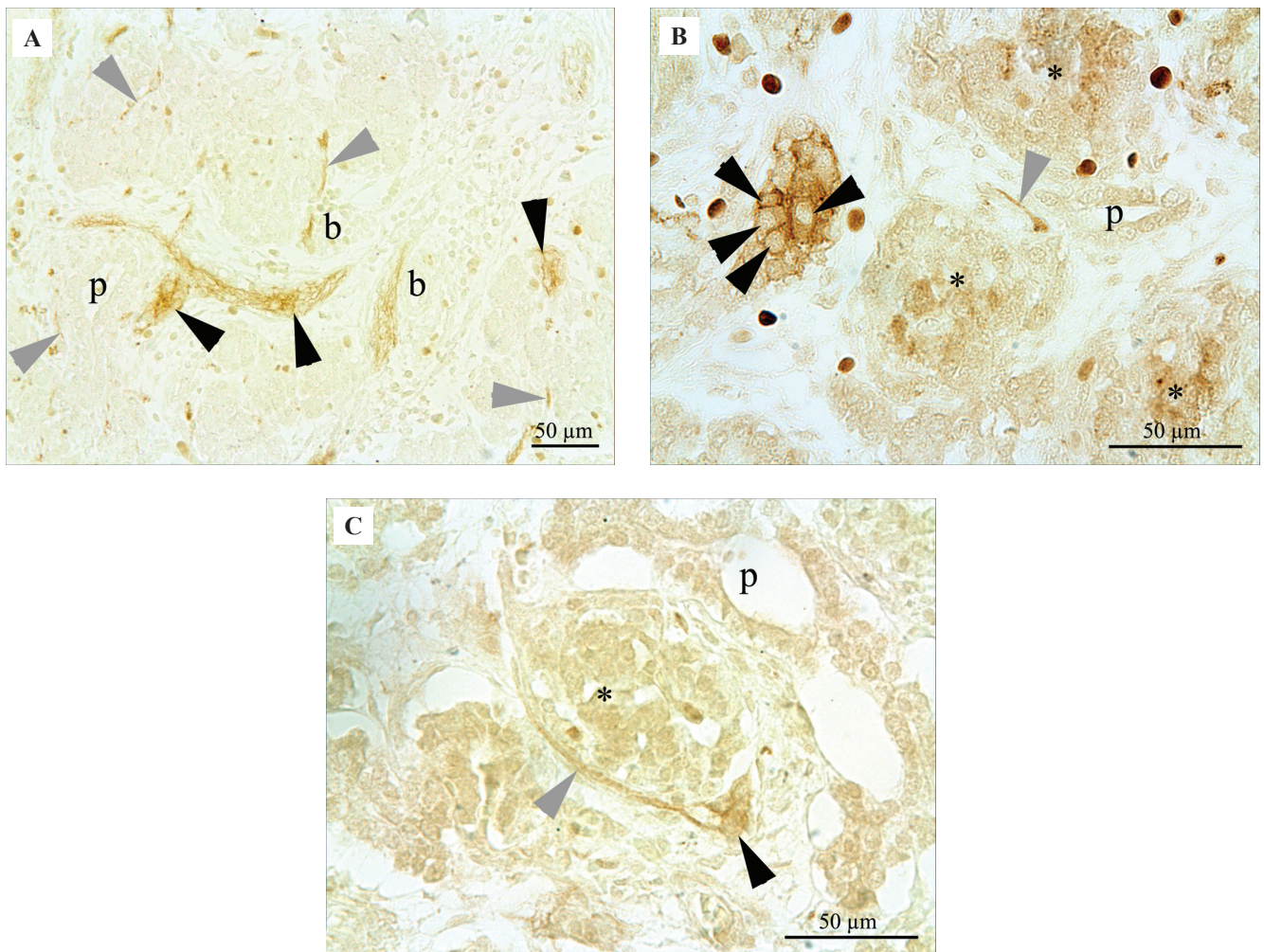


Рис. 1. Поджелудочная железа плодов, гестационный возраст 20 недель (А, В) и 16 недель (С). Иммунопероксидазное маркирование антителами к АСhE.

А – крупные пучки холинергических волокон, интрамуральные ганглии (черные стрелки) и тонкие холинергические волокна (серые стрелки) в экзокринной части железы. В – холинергические нейроны в интрамуральном ганглии (черные стрелки) и тонкое холинергическое волокно (серая стрелка) на периферии панкреатического островка. С – нейроинсулярный комплекс I типа, черной стрелкой указаны ганглионарные нейроны, серой стрелкой – тонкое холинергическое волокно на периферии панкреатического островка

\* – панкреатические островки, b – кровеносные сосуды, p – крупные панкреатические протоки

Fig. 1. Human fetal pancreas, gestational age 20 weeks (A, B) and 16 weeks (C). Immunoperoxidase labeling with antibodies to AChE. A – large cholinergic nerve bundles, intrapancreatic ganglia (black arrowheads) and thin cholinergic fibers (grey arrowheads) in the exocrine pancreas. B – cholinergic neurons in the intrapancreatic ganglia (black arrowheads) and thin cholinergic fiber (grey arrowheads) at the periphery of the pancreatic islet. C – neuro-insular complex type 1, black arrowhead indicates ganglionic neurons, grey arrowhead – thin cholinergic fiber at the periphery of the islet.

\* – pancreatic islets, b – blood vessels, p – pancreatic ducts

При маркировании антителами к VАСhТ (мышинными моноклональными и кроличьими поликлональными) реакция в структурах нервной системы была иммунонегативной.

Во всех исследованных образцах ПЖ иммунопозитивная реакция с мышинными моноклональными антителами к VАСhТ обнаружена в цитоплазме части эндокринных клеток панкреатических островков (рис. 2 А). VАСhТ<sup>+</sup> клетки были локализованы в центральной области панкреатических островков (рис. 2 А). В реакциях с антителами к АСhE эндокринные клетки мар-

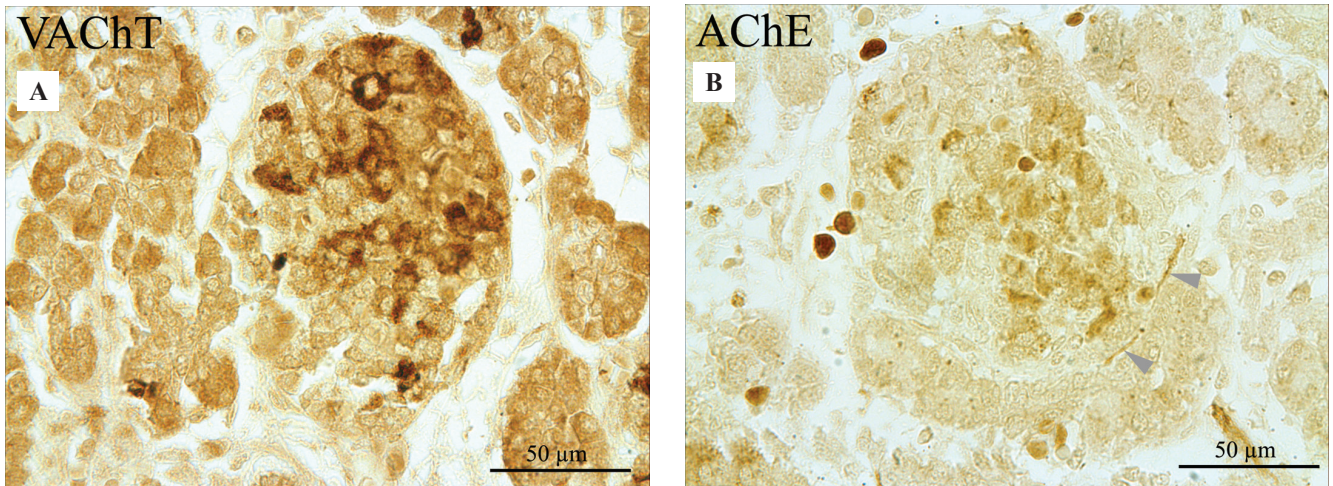


Рис. 2. Клетки, содержащие везикулярный транспортер ацетилхолина (VACht) (А) и ацетилхолинэстеразу (AChE) (В) в панкреатических островках плодов.

А – поджелудочная железа плода, гестационный возраст 32–34 недели, иммунопероксидазное маркирование антителами к VACht. В – поджелудочная железа плода, гестационный возраст 20 недель, иммунопероксидазное маркирование антителами к AChE, серыми стрелками отмечены тонкие холинергические волокна на периферии панкреатического островка

Fig. 2. VACht- and AChE-containing cells in the fetal pancreatic islets.

A – fetal pancreas, gestational age 32–34 weeks, immunoperoxidase labeling with antibodies to VACht. B – fetal pancreas, gestational age 20 weeks, immunoperoxidase labeling with antibodies to AChE, grey arrowheads indicate thin cholinergic fibers at the periphery of the islet

кировались только при использовании концентрации антител 0,0073 мг/мл (рабочее разведение антител 1:100) (рис. 2 В). Как и в реакциях с VACht, AChE<sup>+</sup> клетки располагались преимущественно в центральной части островков (рис. 2 В).

### Обсуждение

Проанализирована возможность использования антител к VACht и AChE для исследования парасимпатической иннервации ПЖ человека в период пренатального развития. Установлено, что антитела к AChE позволяют выявить в развивающейся ПЖ человека пучки нервных волокон разного диаметра, сеть тонких нервных волокон, а также отдельные нейроны интрамуральных ганглиев. При этом реакция с антителами к VACht в структурах нервной системы ПЖ плодов была иммунонегативной. Ранее антитела к VACht успешно применялись для выявления холинергических нейронов и нервных волокон в работах на образцах ПЖ мышей [15, 17], овцы [16] и человека [17, 18]. Отсутствие реакции с антителами к VACht в ПЖ плодов может быть обусловлено низкой специфичностью использованных антител, особенностями фиксации и методики приготовления срезов, невысоким содержанием антигена в структурах нервной системы в период внутриутробного развития и рядом других причин.

При анализе распределения холинергических волокон показано, что на исследованных сроках развития (14–34 недели) тонкие холинергические волокна преобладают в экзокринной части ПЖ: в соединитель-

ной ткани между формирующимися дольками, вблизи протоков и внутри ацинусов, что характерно и для взрослых людей [17]. Кроме того, в ПЖ плодов, как и у взрослых людей [18], тонкие холинергические волокна присутствуют вокруг тел нейронов в интрамуральных ганглиях. Однако в развивающейся ПЖ человека нами не выявлены периваскулярные сплетения холинергических нервных волокон, описанные у взрослых [11]. Мы предполагаем, что формирование этих сплетений происходит на более поздних сроках развития (после 34-й недели) или в постнатальный период. Нами установлено, что в ПЖ плодов тонкие холинергические волокна присутствуют на периферии отдельных панкреатических островков и нейроинсулярных комплексов I типа и не выявляются внутри панкреатических островков между эндокринными клетками. Таким образом, в ПЖ человека в пре- и постнатальный период большинство эндокринных клеток не контактирует с холинергическими окончаниями. Предполагают, что у людей автономная регуляция эндокринной секреции, в том числе парасимпатическая, может осуществляться опосредованно через воздействие на тонус сосудов и изменение локального кровотока в микроциркуляторном русле островков, за счет выделения нейромедиаторов и их диффузии к эндокринным клеткам и/или за счет проникновения нейромедиаторов в локальный кровоток [17, 18].

При использовании антител к AChE нам впервые удалось обнаружить отдельные холинергические ней-

роны в интрамуральных ганглиях развивающейся ПЖ человека. В то же время в большинстве нейронов интрамуральных ганглиев наблюдалась иммунонегативная реакция на АСнЕ, что может быть обусловлено незрелостью нейронов и низким содержанием данного антигена. Не исключено также, что нейроны интрамуральных ганглиев могут синтезировать другие нейромедиаторы (VIP, GRP и PACAP и т.д.), как это было показано в работах на млекопитающих [10, 16].

Нами установлено, что иммунореактивность к VACHT и АСнЕ наблюдается в цитоплазме части эндокринных клеток панкреатических островков. VACHT- и АСнЕ-содержащие клетки располагались в центральной области панкреатических островков, что соответствует по локализации В-клеткам. Тем не менее для уточнения природы этих клеток необходимы дальнейшие исследования. Ранее экспрессия VACHT и холинацетилтрансферазы (ChAT) была обнаружена в А-клетках панкреатических островков взрослых людей [17, 22]. Эти данные и полученные нами результаты свидетельствуют о том, что эндокринные клетки панкреатических островков могут служить источником ацетилхолина.

### Заключение

Установлено, что антитела к АСнЕ позволяют выявить в развивающейся поджелудочной железе человека пучки нервных волокон различного диаметра, сеть тонких нервных волокон и отдельные нейроны в составе интрамуральных ганглиев. Показано, что распределение холинергических волокон в поджелудочной железе плодов сходно с таковым у взрослых людей. Холинергические волокна преобладают в экзокринной части железы, в междольковой соединительной ткани, вблизи протоков и проникают в ацинусы. В отдельных панкреатических островках и нейроинсулярных комплексах I типа холинергические волокна проходят по периферии. В панкреатических островках плодов, в цитоплазме части эндокринных клеток выявлена иммунорезистивная реакция на АСнЕ и VACHT. Эти результаты согласуются с данными литературы и свидетельствуют о том, что эндокринные клетки могут служить источником ацетилхолина.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Ю.С. Кривова, А.Е. Прошина, С.В. Савельев.  
Сбор и обработка материала – Ю.С. Кривова, Д.А. Отлыга.  
Написание текста – Ю.С. Кривова.  
Редактирование – Ю.С. Кривова, А.Е. Прошина, Д.А. Отлыга, С.В. Савельев.

### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – Y.S. Krivova, A.E. Proshchina, S.V. Saveliev.  
Collected the data and performed the analysis – Y.S. Krivova, D.A. Otylga.  
Wrote the paper – Y.S. Krivova.  
Edited the manuscript – Y.S. Krivova, A.E. Proshchina, D.A. Otylga, S.V. Saveliev.

### Литература/References

1. *Ahrén B.* Autonomic regulation of islet hormone secretion – Implications for health and disease. *Diabetologia.* 2000;43(4):393–410. DOI: 10.1007/s001250051322.
2. *Gilon P, Henquin JC.* Mechanism and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic b-cell function. *Endocr Rev.* 2001;22(5):565–604. DOI: 10.1210/edrv.22.5.0440.
3. *Kiba T.* Relationships between the autonomic nervous system and the pancreas including regulation of regeneration and apoptosis: recent developments. *Pancreas.* 2004;29(2):e51–8. DOI: 10.1097/00006676-200408000-00019.
4. *Konturek SJ, Zabielski R, Konturek JW, Czarnecki J.* Neuroendocrinology of the pancreas; role of brain-gut axis in pancreatic secretion. *Eur J Pharmacol.* 2003;481(1):1–14. DOI: 10.1016/j.ejphar.2003.08.042.
5. *Edvell A, Lindstrom P.* Vagotomy in young obese hyperglycemic mice: effects on syndrome development and islet proliferation. *Am J Physiol.* 1998;274(6):E1034–E1039. DOI: 10.1152/ajpendo.1998.274.6.E1034.
6. *Lausier J, Diaz WC, Roskens V, LaRock K, Herzer K, Fong CG et al.* Vagal control of pancreatic beta-cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;299(5):E786–E793. DOI: 10.1152/ajpendo.00202.2010.
7. *Mundinger TO, Mei Q, Foulis AK, Fligner CL, Hull RL, Taborsky GJ Jr.* Human type 1 diabetes is characterized by an early, marked, sustained and islet-selective loss of sympathetic nerves. *Diabetes.* 2016;65(8) 2322–30. DOI: 10.2337/db16-0284.
8. *Lundberg M, Lindqvist A, Wierup N, Krogvold L, Dahl-Jorgensen K, Skog O.* The density of parasympathetic axons is reduced in the exocrine pancreas of individuals recently diagnosed with type 1 diabetes. *PLoS One.* 2017;12(6):e0179911. DOI: 10.1371/journal.pone.0179911.
9. *Hiramatsu K, Watanabe T, Fujioka T.* The distribution of acetylcholinesterase(AChE)-positive nerves in chicken pancreas demonstrated by light and electron microscopy. *Arch Histol Cytol.* 1988;51(2):159–68. DOI: 10.1679/aohc.51.159.
10. *Love JA, Szebeni K.* Morphology and histochemistry of the rabbit pancreatic innervation. *Pancreas.* 1999;18(1):53–64. DOI: 10.1097/00006676-199901000-00008.
11. *Amenta F, Cavallotti C, de Rossi M, Tonelli F, Vatrella F.* The cholinergic innervation of human pancreatic islets. *Acta Histochem.* 1983;73(2):273–8. DOI: 10.1016/S0065-1281(83)80038-5.
12. *Schäfer MKH, Weihe E, Varoqui H, Eiden LE, Erickson JD.* Distribution of the vesicular acetylcholine transporter (VACHT) in the central and peripheral nervous systems of the rat. *J Molec Neurosci.* 1994;5(1):1–26. DOI: 10.1007/BF02736691.
13. *Arvidsson U, Riedl M, Elde R, Meister B.* Vesicular acetylcholine transporter (VACHT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. *J Comp. Neurol.* 1997;378(4):454–67. DOI 10.1002/(SICI)1096-9861(19970224)378:4<454::AID-CNE2>3.0.CO;2-1.
14. *Schäfer MKH, Weihe E, Erickson JD, Eiden LE.* Human and monkey cholinergic neurons visualized in paraffin-embedded tissues by immunoreactivity for VACHT, the vesicular acetylcholine transporter. *J Molec Neurosci.* 1995;6(4):225–35. DOI: 10.1007/BF02736782.

15. Tang SC, Peng SJ, Chien HJ. Imaging of the islet neural network. *Diabetes Obes Metab.* 2014;16(Suppl 1):77–86. DOI: 10.1111/dom.12342.
16. Arciszewski MB, Zacharko-Siembida A. Cholinergic innervation of the pancreas in the sheep. *Acta Biol Hung.* 2007;58(2):151–61. DOI: 10.1556/ABiol.58.2007.2.2.
17. Rodriguez-Diaz R, Abdulreda MH, Formoso AL, Gans I, Ricordi C, Berggren PO et al. Innervation patterns of autonomic axons in the human endocrine pancreas. *Cell Metab.* 2011;14(1):45–54. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.05.008.
18. Tang SC, Baeyens L, Shen CN, Peng SJ, Chien HJ, Scheel DW et al. Human pancreatic neuro-insular network in health and fatty infiltration. *Diabetologia.* 2018;61(1):168–81. DOI: 10.1007/s00125-017-4409-x.
19. Krivova YS, Proshchina AE, Barabanov VM, Saveliev SV. Development of the islets of Langerhans in the human fetal pancreas. In: A. Satou, H. Nakamura (eds.). *Pancreas: Anatomy, diseases and health implications.* Nova Science Publishers, 2012. P. 53–88.
20. Proshchina AE, Krivova YS, Barabanov VM, Saveliev SV. Ontogeny of neuro-insular complexes and islets innervation in the human pancreas. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:57. DOI: 10.3389/fendo.2014.00057.
21. Amella C, Cappello F, Kahl P, Fritsch H, Lozanoff S, Sergi C. Spatial and temporal dynamics of innervation during the development of fetal human pancreas. *Neuroscience.* 2008;154(4):1477–87. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.04.050.
22. Rodriguez-Diaz R, Dando R, Jacques-Silva MC, Facado A, Molina J, Abdulreda M et al. Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming human beta cell function. *Nat Med.* 2012;17(7):888–92. DOI:10.1038/nm.2371.

### Информация об авторах

Юлия Сергеевна Кривова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Александра Евгеньевна Прошина – доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Дмитрий Александрович Отлыга – научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Сергей Вячеславович Савельев – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией развития нервной системы НИИ морфологии человека.

### Author information

Yuliya S. Krivova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Nervous System Development, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0001-9692-3616>

Alexandra E. Proshchina – Dr. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Nervous System Development, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-0515-8275>

Dmitriy A. Otlyga – Researcher, Laboratory of Nervous System Development, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-6719-3383>

Sergey V. Saveliev – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head of Laboratory of Nervous System Development, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-1447-7198>