C-kit и десмин-позитивные клетки в регенерации островков поджелудочной железы при экспериментальном диабете у крыс

М.С. Калигин [1,2], А.С. Плюшкина [2,1], А.А. Титова [2,1], М.А. Титова [1,2], А.А. Гумерова [1], А.П. Киясов [1]
[1] Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань
[2] Казанский Государственный Медицинский Университет, Казань

C-kit and desmin-positive cells in expression in islets of pancreas during alloxan diabetes in rats.

M.S. Kaligin [1,2], A.S.Plushkina [1,2], A.A. Titova [2,1], M.A. Titova [1,2], A.A. Gumerova [1], A.P. Kiassov [1]
[1] Kazan Federal University, Kazan
[2] Kazan State Medical University, Kazan

В настоящее время получены данные о том, что C-kit и десмин-позитивные звездчатые клетки поджелудочной железы задействованы в регенерации её эндокринной части. Однако до сих пор очень мало что известно об участии и возможных путях дифференцировки этих клеток в ходе восстановления поджелудочной железы. Поэтому целью исследования стало изучение данных клеточных популяций в динамике при экспериментальном аллоксановом диабете у крыс. Работа была проведена на 33 белых беспородных крысах самцах с экспериментальным диабетом, у которых определяли уровень глюкозы, инсулина и глюкагона в сыворотке крови, а также изучали эскпрессию десмина (маркёр звездчатых клеток), α-гладкомышечного актина (α-SMA, маркёр миофибробластов), C-kit (маркёр коммитированых клеток-предшественниц эндокриноцитов), глюкагона и инсулина (маркёры дифференцированных α- и β-клеток островков Лангерганса) в ткани поджелудочной железы. Уже через сутки экспериментальной гипергликемии нами была обнаружена экспрессия десмина в клетках островков поджелудочной железы, максимальное число позитивных клеток отмечено на третьи сутки. Также через сутки в островках появлялись и C-kit позитивные клетки, которые синтезировали глюкагон и инсулин. Поскольку звездчатые клетки поджелудочной железы способны вырабатывать разнообразные факторы роста и компоненты межклеточного матрикса, мы предполагаем, что они являются важным фактором микроокружения для дифференцировки C-kit-позитивных прогениторных клеток в β-инсулоциты через стадию глюкагон-продуцирующих клеток.

Ключевые слова: поджелудочная железа, сахарный диабет, региональные стволовые клетки, C-kit-позитивные клетки, звездчатые клетки поджелудочной железы.

Nowadays there are findings that C-kit-positive and desmin-positive stellate cells help to regenerate endocrine part of pancreas. But still it is unknown about their role and the way of differentiation of these cells during pancreas regeneration. That's why the aim of our work was to study the dynamic of these cells population during alloxan diabetes in rats. The work was made on 33 rats with experimental diabetes. Blood glucose, insulin and glucagon levels were analyzed. Also the expression of desmin (marker of stellate cells), α-SMA (marker of myofibroblast), C-kit (marker of endocrine stem cells), insulin and glucagon (marker of differentiated α- and β-cells of Langerhans islets) was studied. The expression of desmin was found after one day of experimental diabetes in islets cells of pancreas. Maximum of these cells was after the third day of the experiment. Also after one day of the experiment C-kit-positive cells, which expressed insulin and glucagon were found. We suppose that stellate cells are the main factor of microenvironment for differentiation of C-kit-positive progenitor cells into β-cells through the stage of glucagon-positive cells because stellate pancreas cells can produce different growth factors and components of intercellular matrics.

Key words: pancreas, diabetes mellitus, regional stem cells, C-kit-positive cells, stellate pancreas cells.

Проблема поиска новых подходов к лечению сахарного диабета I типа остаётся актуальной задачей современной медицины. Пациенты до сих пор нуждаются в ежедневных инъекциях экзогенного инсулина, причём полностью контролировать уровень глюкозы в крови довольно сложно. Поэтому нередко при сахарном диабете развиваются осложнения, которые приводят молодое работоспособное население к ранней инвалидности [1]. Перспективной альтернативой существующим методам заместительной терапии сахарного диабета может стать трансплантация клеток-предшественниц эндокриноцитов поджелудочной железы (ПЖ). Их применение поможет устранить причину возникновения сахарного диабета I типа — дефицит β-клеток островков Лангерганса, что позволит пациентам отказаться от введения экзогенного инсулина.

Главной проблемой в разработке таких методов лечения является то, что до сих пор не идентифицированы стволовые клетки эндокриноцитов. Предполагают, что эти клетки могут находиться среди клеток эпителия протоков ПЖ или среди ацинарных клеток. Не исключено, что стволовые клетки эндокриноцитов локализуются внутри самих островков [2].

Одним их подходов для идентификации может быть выявление этих клеток по специфическим маркёрам, в частности по C-kit или CD117, которые экспрессируются многими типами стволовых и прогениторных клеток. Это трансмембранный рецептор, поэтому с его помощью можно не только идентифи-

e-mail: mfkaligin@mail.ru

цировать клетки-предшественницы, но и выделять их. Ранее нами была показана важная роль C-kit$^+$-клеток ПЖ человека в пренатальном развитии островков Лангерганса [3].

Еще одной популяцией клеток, которые претендуют на роль предшественниц β-клеток, являются звёздчатые клетки ПЖ, которые по своему фенотипу и свойствам очень близки к звёздчатым клеткам печени. Клетки обеих популяций накапливают витамин А, секретируют широкий спектр факторов роста и синтезируют макромолекулы межклеточного вещества, в связи в чем именно активностью этих клеток многие авторы объясняют развитие фиброза печени и ПЖ [4]. Одним из основных маркеров звёздчатых клеток является белок промежуточных филаментов десмин. Имеются данные о том, что эти клетки могут быть источником развития эндокриноцитов ПЖ [5, 6]. Однако до сих пор нет сведений об участии клеток данной популяции в регенерации ПЖ и, в частности, об их роли в восстановлении эндокриноцитов при различных видах повреждения, в том числе при сахарном диабете I типа. Поэтому целью нашего исследования стало изучение популяций клеток, экспрессирующих C-kit и десмин, в процессе регенерации ПЖ при экспериментальном диабете I типа.

Материал и методы

Исследование проведено на 33 белых беспородных крысах самцах, которые были разделены на три группы. Животным 1 группы внутрибрюшинно вводили аллоксан (Sigma-Aldrich) в 1 мл 0,02 М ацетатного буфера pH = 4,0 в дозе 180 мг/кг, животным 2 группы вводили ацетатный буфер (контроль действия растворителя). Животным 3 группы ничего не вводили (норма). Через 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21, 28 сут. у животных забирали кровь для биохимического исследования, выводили из эксперимента и забирали ПЖ для морфологического анализа. Парафиновые срезы ПЖ окрашивали иммуногистохимически с коммерческими антителами к десмину (1:30, D33, DAKO), α-SMA (1:50, клон 1A4), C-kit (1:200; клон T595, Novocastra, Великобритания), инсулину (1:40; клон 2D11-H5, Novocastra, Великобритания) и глюкагону (1:50; кроличьи поликлональные антитела, Novocastra, Великобритания). Уровень глюкозы определяли в сыворотке крови глюкозооксидазным методом [7]. Полученные данные подвергали статистической обработке с помощью статистического графического пакета Microsoft Excel 2010.

Результаты

Через сутки после введения аллоксана в крови крыс наблюдали повышение уровня глюкозы, что свидетельствовало о развитии гипергликемии. На этом сроке в единичных клетках островков ПЖ крыс мы выявили экспрессию C-kit, и она сохранялась в этих клетках на всех исследованных сроках (рис. 1А). У контрольных животных экспрессию C-kit в клетках ПЖ мы не наблюдали. При проведении серий двойного окрашивания на инсулин, глюкагон и C-kit мы обнаружили, C-kit$^+$-клетки, которые продуцировали и инсулин, и глюкагон (рис. 1Б-Г).

В норме в ПЖ крысы были выявлены единичные десмин$^+$-звездчатые клетки вокруг ацинусов, а также десмин$^+$-гладкомышечные клетки сосудов. В островках не наблюдали клеток, в цитоплазме которых присутствовал бы десмин. Через сутки после введения аллоксана количество десмин$^+$-клеток вокруг ацинусов увеличилось. Еще через сутки таких клеток становилось ещё больше, а через 3 сут. после введения аллоксана число десмин$^+$-клеток достигло максимума и начинало уменьшаться после 5 сут. эксперимента (рис. 2В, Г). В островках десмин$^+$-клетки были выявлены через сутки после введения аллоксана, максимальное их число, так же, как и вокруг ацинусов, отмечено через 3 сут., а после 5 сут. их количество снижалось (рис. 2). При этом на всех сроках эксперимента паттерн окрашивания на α-SMA не отличался от нормы, экспрессия наблюдалось только в мышечной оболочке сосудов (рис. 2Д), что свидетельствует о том, что увеличение количества десмин$^+$-клеток на фоне ЭД не сопровождается их трансдифференцировкой в миофибробласты и, следовательно, повышением риска развития фиброза ПЖ.

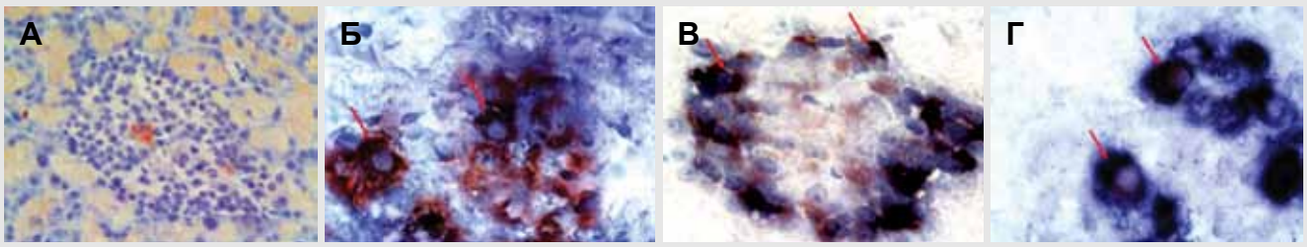
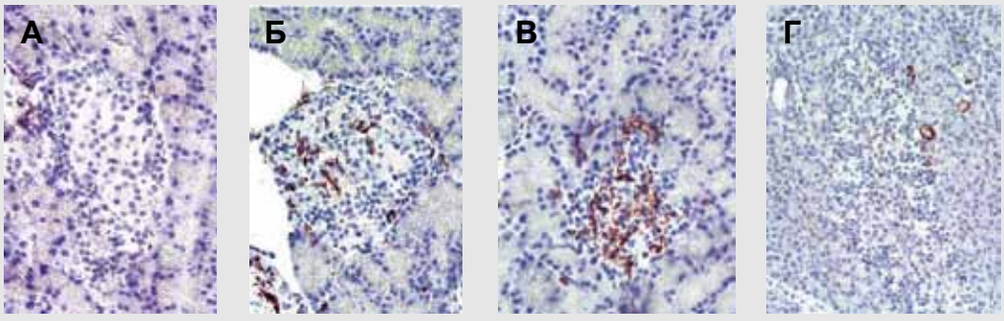


Рис. 1. Клетки островка Лангерганса ПЖ крысы при экспериментальном диабете:
А – единичные клетки, экспрессирующие C–kit;
Б – клетки, одновременно экспрессирующие инсулин (синий цвет) и глюкагон (красный цвет), обозначены стрелками;
В – клетки, одновременно экспрессирующие C–kit (красный цвет) и глюкагон (синий цвет), обозначены стрелками;
Г – клетки, одновременно экспрессирующие C–kit (красный цвет) и инсулин (синий цвет), обозначены стрелкам.
Иммуногистохимическая реакция.
Ув.: А ×400; Б–Г ×1000



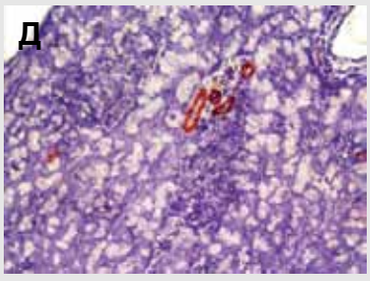


Рис. 2.
Клетки островка Лангерганса ПЖ крысы:
А–Г – экспрессия десмина (красный цвет);
А – в норме;
Б – 1 сут. экспериментального диабета;
В – 2 сут. экспериментального диабета,
Г – 5 сут. экспериментального диабета;
Д – экспрессия α–SMA (красный цвет), 14 сут. экспериментального диабета.
Иммуногистохимическая реакция.
Ув.: А–Г ×400; Д ×200

Обсуждение

Результаты исследования свидетельствуют о том, что десмин$^+$ и C-kit$^+$-клетки появляются в островках ПЖ при экспериментальном диабете, вызванном аллоксаном, следовательно, каким-то образом могут участвовать в регенерации островков. Однако характер этого участия, по-видимому, различен. Если количество C-kit$^+$-клеток увеличивается и они начинают экспрессировать сначала глюкагон, а затем инсулин, что подтверждает возможность их дифференцировки в β-клетки островков Лангерганса, то десмин$^+$-клетки, главным образом, увеличивались количественно без последующей продукции гормонов. Учитывая их способность к секреции факторов роста и компонентов межклеточного вещества, можно предположить, что они обеспечивают необходимое микроокружение для дифференцировки C-kit$^+$-клеток островков в эндокриноциты. При этом нельзя исключать того, что звёздчатые клетки непосредственно сами могут восстанавливать популяцию β-клеток, однако по какому пути идёт их дифференцировка не ясно. Рассматривая полученные данные в комплексе, можно предположить, что при повреждении β-клеток гипергликемия запускает активацию звёздчатых клеток, которые начинают синтезировать факторы роста и цитокины. Синтезированные факторы роста взаимодействуют с рецепторами прогениторных клеток, и, в частности, с рецептором фактора стволовых клеток C-kit [9]. Это взаимодействие приводит к дифференцировке C-kit$^+$ в β-клетки через стадию глюкагон-продуцирующих клеток.

Полученные результаты изучения изменений популяций звёздчатых клеток ПЖ и C-kit$^+$-клеток при экспериментальном диабете позволяют также предположить, что одновременная трансплантация клеток обеих популяций может быть более эффективной для восстановления островков ПЖ, чем изолированная трансплантация только C-kit$^+$-клеток. Однако проверка этой гипотезы требует продолжения исследований в направлении разработки методов клеточной терапии сахарного диабета I типа.

ЛИТЕРАТУРА:
1. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Фадеев В.Ф. Эндокринология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007, 432 С.
2. Закирьянов А.Р., Поздняков О.М., Онищенко Н.А. и др. Регенерационная клеточная терапия сахарного диабета 1 типа и его осложнений. Вестник РАМН 2008; 3: 42–51.
3. Калигин М.С., Гумерова А.А, Титова М.А. и др. C-kit маркёр стволовых клеток эндокриноцитов поджелудочной железы. Морфология 2011; 140 (4): 32–7.
4. Kim N., Yoo W., Lee J. et al. Formation of vitamin A lipid droplets in pancreatic stellate cells requires albumin. Inter. J. Gastroenter. Hepatol. 2009; 58(10): 1382–90.
5. Kordes C., Sawitza I. et al. Stellate cells from rat pancreas are stem cells and can contribute to liver regeneration. PLoS ONE 2012; 12: 51878.
6. Mato E., Lucas M., Petriz J. et al. Identification of pancreatic stellate cell population with properties of progenitor cells: new role for stellate cells in pancreas. Biochem J. 2009; 421: 181–91.
7. Орехович В.Н. Современные методы в биохимии. М.: Наука; 1977, 392 С.
8. Li J., Goodyer C.G., Fellows F. et al. Stem cell factor/c-Kit interactions regulate human islet-epithelial cluster proliferation and differentiation. Int. J. Bioch. Cell Biol. 2006; 38: 961–72.
9. Haas S.L., Fitzner B., Jaster R. et al. Transforming growth factor-β induces nerve growth factor expression in pancreatic stellate cells by activation of the ALK-5 pathway. Growth Factors 2009; 27(5): 289–99.

Поступила 30.08.2013