

Активация C-kit – позитивных прогениторных клеток в поджелудочной железе крысы после частичной гепатэктомии

М.С. Калигин¹, А.С. Плюшкина¹, И.М. Газизов¹, Э.И. Шарипова¹,
А.А. Гумерова^{1,2}, А.П. Киясов^{1,2}

¹ Казанский государственный медицинский университет, Казань

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

C-kit-positive progenitor cells activation in rats pancreas after partial hepatectomy

M.S. Kaligin¹, A.S. Plushkina¹, I.M. Gazizov¹, E.I. Sharipova¹, A.A. Gymerova^{1,2}, A.A. Kiassov^{1,2}

¹ Kazan State Medical University, Kazan

² Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan

Одним из распространенных маркёров стволовых клеток поджелудочной железы является рецептор фактора стволовых клеток C-kit. Установлено, что этот маркёр присутствует в островковых клетках нормальной поджелудочной железы крысы. Однако неизвестно, какие изменения происходят с данной клеточной популяцией при нарушениях углеводного обмена, развивающихся при заболеваниях печени. Поэтому целью нашего исследования стало изучение экспрессии C-kit в клетках поджелудочной железы после частичной гепатэктомии у крыс. Работа выполнена на 27 белых беспородных крысах самцах, которым была проведена частичная гепатэктомия по методике Хиггенса и Андерсона. В ткани поджелудочной железы была изучена экспрессия C-kit, инсулина и глюкагона. В результате эксперимента была установлена экспрессия C-kit в клетках островков и интерстициальных клетках с 3 суток эксперимента, которые, как показали результаты двойного иммуногистохимического окрашивания, экспрессировали также и глюкагон. Таким образом, после частичной гепатэктомии в поджелудочной железе происходит активация C-kit⁺-прогениторных клеток и начинается их дифференцировка в α -клетки островков Лангерганса.

Ключевые слова: поджелудочная железа, частичная гепатэктомия, рецептор фактора стволовых клеток, прогениторные клетки, островковые клетки, дифференцировка.

На сегодняшний день сахарный диабет занимает третье место в структуре заболеваемости и является ведущей причиной инвалидности и смертности в результате развития сосудистых осложнений. Пациенты с диабетом I типа по-прежнему нуждаются в ежедневных инъекциях инсулина. При этом редко удается установить полный контроль над уровнем глюкозы в крови, что ведет к высокому риску развития острых и хронических осложнений сахарного диабета [1]. В качестве альтернативы разрабатываются методы трансплантации целой поджелудочной железы (ПЖ), островков и зрелых β -клеток [2]. Однако трансплантация таких дифференцированных клеток малоперспективна, поскольку через некоторое время после трансплантации они погибают. Выходом из этой ситуации может стать использование клеток-предшественниц эндокриноцитов, которые могли бы поддерживать собственную популяцию и дифференцироваться в зрелые β -клетки.

One of the most common markers of pancreas stem cells is a stem cell factor receptor C-kit. According to some authors, this marker is presented in islet cells of normal rat pancreas. But it is unknown about the behavior of these cells in disorders of carbohydrate metabolism during liver disease. The aim of our study was to evaluate C-kit expression in pancreas after partial hepatectomy in rats. Partial hepatectomy was performed for 27 white male rats. The expression of C-kit, insulin and glucagon in rats pancreas was studied. The expression of C-kit in islets and interstitial cells was shown in results after 3 days of the experiment, and double staining showed that these cells can express glucagon. Thus, there is the activation of C-kit⁺ progenitor cells in pancreas after partial hepatectomy and the beginning of their differentiation to α -cells of Langerhans islets.

Key words: pancreas, partial hepatectomy, stem cell factor receptor, progenitor cells, islet cells, differentiation.

Одним из претендентов на роль клеток-предшественниц инсулоцитов являются C-kit⁺ клетки ПЖ [3]. C-kit – трансмембранный рецептор тирозинкиназы (receptor protein tyrosine kinase – RPTK). Взаимодействие C-kit со своим лигандом, фактором стволовых клеток, запускает цепь внутриклеточных реакций, которая приводит к началу транскрипции определенных генов, росту и дифференцировке клеток-предшественниц [4]. Распределение и динамика экспрессии C-kit⁺-клеток как возможных источников клеток островков ПЖ, в том числе и β -клеток, изучается на различных экспериментальных моделях [5]. Выбор модели частичной гепатэктомии обусловлен ключевой ролью печени в углеводном обмене, нарушения которого, связанные с дефицитом массы органа после 70% гепатэктомии [6], могут вызывать морфофункциональные изменения клеток островков ПЖ, которые остаются неизученными. Кроме того, участвовавшие случаи резекции печени

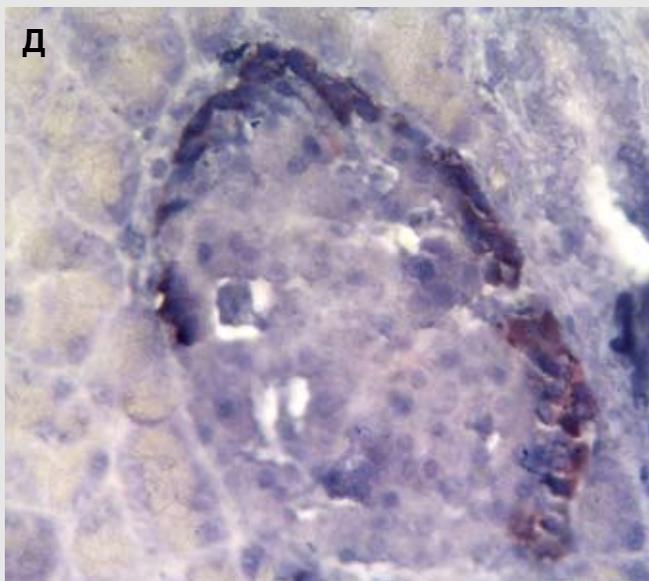
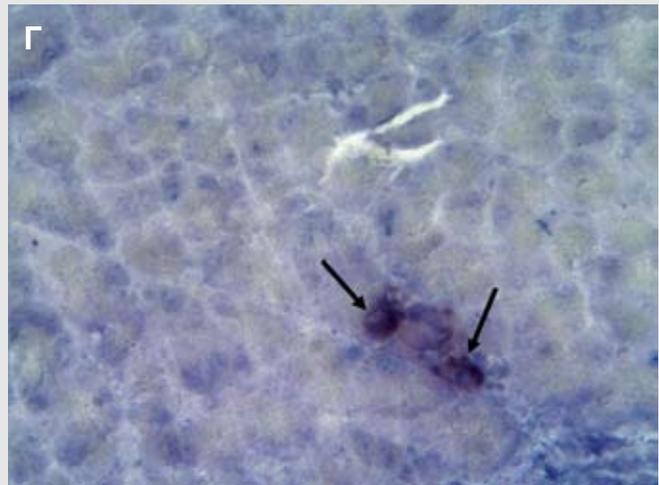
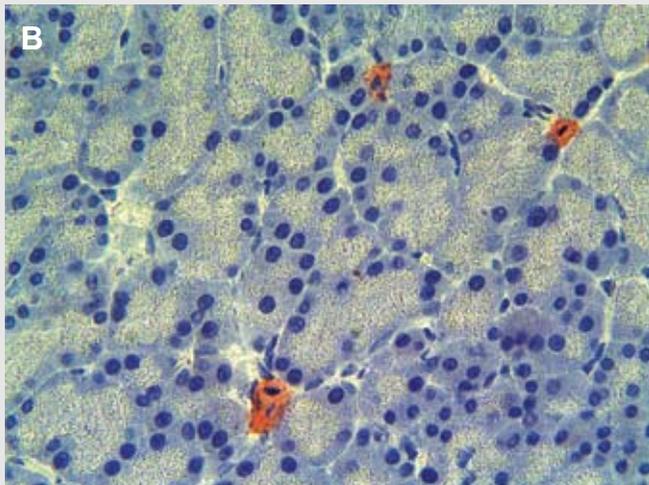
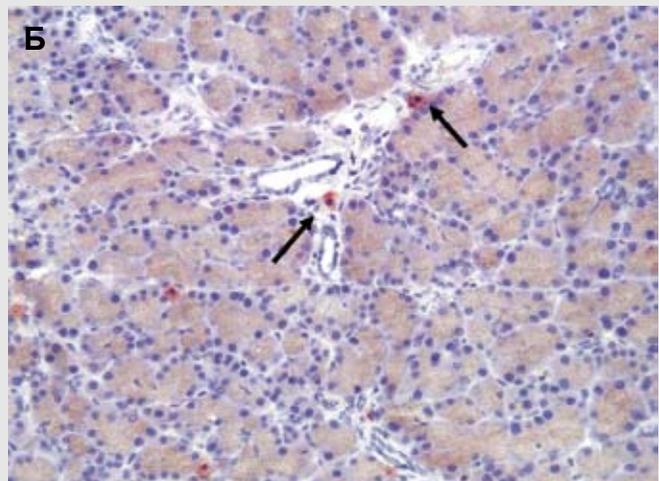
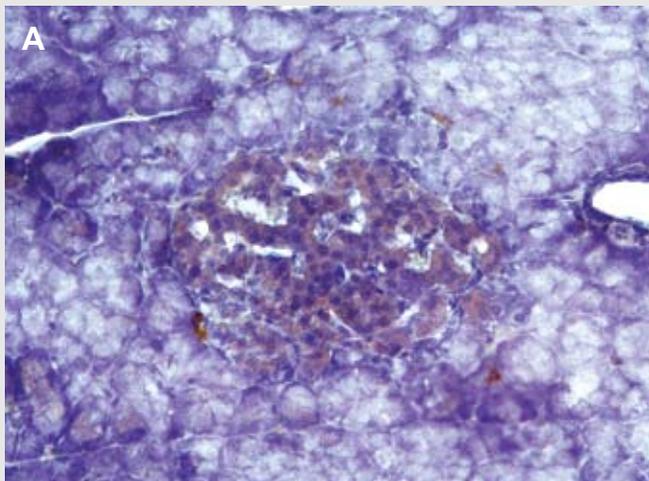
e-mail: mfkaligin@mail.ru

в связи с опухолевыми заболеваниями также требуют исследования изменений, развивающихся в поджелудочной железе в результате подобных операций. Поэтому целью нашего исследования стало изучение экспрессии C-kit в клетках ПЖ после частичной гепатэктомии у крыс.

Материал и методы

Работа выполнена на 27 белых беспородных крысах самцах, которым провели операцию частичной

гепатэктомии по методике Хиггенса и Андерсона. Эксплантацию органов производили через 1, 2, 3, 5 и 7 сут. после операции, материал помещали в 10% нейтральный формалин на 0,2 М фосфатном буфере (рН = 7,4) на 24 ч для фиксации и заливали в парафин по стандартной методике. Срезы ПЖ окрашивали иммуногистохимически с коммерческими антителами к C-kit – маркёру клеток-предшественниц (1:200; клон Т595, Novocastra, Великобритания), инсулину – маркёру дифференцированных β -клеток (1:40;



Поджелудочная железа крысы после частичной гепатэктомии:
 А – 3 сут. после операции, C-kit-позитивные клетки красного цвета в островке Лангерганса;
 Б – 3 сут. после операции, одиночные C-kit-позитивные клетки в интерстиции (обозначены стрелками);
 В – 2 сут. после операции, единичные клетки, экспрессирующие глюкагон;
 Г – 3 сут. после операции, в интерстиции одиночные эндокриноциты, содержащие C-kit и глюкагон (обозначены стрелками);
 Д – 5 сут. после операции, эндокриноциты островка Лангерганса, содержащие C-kit и глюкагон.
 Иммуногистохимическая реакция.
 Ув.: А, Б $\times 200$; В $\times 400$; Г, Д $\times 1000$

клон 2D11-H5, Novocastra, Великобритания) и глюкагону — маркёру дифференцированных α -клеток (1:50; кроличьи поликлональные антитела, Novocastra, Великобритания). Иммуногистохимическое окрашивание было проведено непрямой иммунопероксидазным и стрептавидин-биотиновым методами, методом меченых иммунных комплексов, методом амплификации с тирамид-биотином (CSA). Также было проведено двойное иммуногистохимическое окрашивание для выявления экспрессии C-kit и инсулина, глюкагона и инсулина, C-kit и глюкагона.

Морфометрический анализ размеров C-kit⁺, инсулин⁺ и глюкагон⁺ частей островков поджелудочной железы крыс для оценки динамики изменения числа C-kit⁺, инсулин⁺ и глюкагон⁺-клеток в островках при частичной гепатэктомии проведен с помощью морфометрической окулярной сетки на микроскопе Leica DM 1000 (Германия) при увеличении $\times 400$. Полученные данные подвергали статистической обработке с помощью статистического графического пакета Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали отсутствие в норме экспрессии C-kit в клетках поджелудочной железы. С 3 сут. эксперимента мы наблюдали слабую экспрессию C-kit в островках Лангерганса (рис. А), а также одиночные C-kit⁺-клетки в интерстиции (рис. Б). При окрашивании с антителами к инсулину видимых изменений его экспрессии в клетках островков Лангерганса ПЖ крыс выявлено не было.

При изучении экспрессии глюкагона визуально было отмечено увеличение числа α -клеток островков ПЖ. Однако морфометрическое исследование не выявило статистически значимых различий в количестве глюкагон⁺-клеток в норме и после частичной гепатэктомии. Однако на всех сроках эксперимента мы наблюдали появление множества одиночных глюкагон⁺-клеток в интерстиции ПЖ. Клетки имели небольшие размеры, округлую или треугольную форму и располагались, главным образом, вблизи протоков и сосудов (рис. В). Можно предположить, что они появлялись компенсаторно в ответ на снижение уровня глюкозы в крови после частичной гепатэктомии [7].

Окрашивание серийных срезов с антителами к C-kit и глюкагону показало, что позитивные по данным антигенам клетки имеют сходные морфологию

и локализацию, что позволило предположить, что это могут быть одни и те же клетки. Наша гипотеза была подтверждена результатами двойного окрашивания, когда мы обнаружили в интерстиции C-kit⁺-клетки, синтезирующие глюкагон (рис. Г). Такие же клетки, экспрессирующие одновременно оба антигена, были обнаружены и в островках на всех сроках эксперимента (рис. Д).

Таким образом, мы установили, что при нарушениях углеводного обмена, вызванных частичной гепатэктомией, в ПЖ появляются клетки, экспрессирующие на своей мембране C-kit, что указывает на активацию стволового компартмента островков поджелудочной железы. C-kit⁺-клетки появляются в островках Лангерганса и клетках интерстиции. Исходя из этого, можно предположить, что в ПЖ существует две популяции C-kit⁺-клеток — интерстициальные и островковые — или, что более вероятно, в островках C-kit⁺-клетки появляются в результате миграции туда интерстициальных C-kit⁺-клеток. Появление секреции глюкагона в выявленных нами C-kit⁺-клетках как в интерстиции, так и в островках, позволяет сделать вывод о начале дифференцировки данных C-kit⁺-прогениторных клеток в α -эндокриноциты, что, как уже было сказано, по-видимому необходимо для компенсации гипогликемии, развивающейся у крыс после частичной гепатэктомии.

Ранее было показано, что в процессе дифференцировки C-kit⁺-клеток-предшественниц инсулоцитов они сначала начинают синтезировать глюкагон, а затем — инсулин [8]. Однако нам не удалось установить секреции инсулина в данных клетках. Вполне вероятно, что такой уровень дифференцировки достигается C-kit⁺-клетками на более поздних сроках, уже после нормализации углеводного обмена.

Подводя итог, можно сделать вывод, что C-kit является удобным маркером, позволяющим выявлять активацию прогениторных клеток-предшественниц эндокриноцитов ПЖ на различных моделях. Использование данного маркера так же перспективно для выделения и культивирования прогениторных клеток из ПЖ для разработки методов клеточной терапии заболеваний этого органа.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ МК-3632.2011.7.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Фадеев В.Ф. Эндокринология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007.
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., Андреева Д.И., Сабиров А.Г. и др. Перспектива использования CD117-позитивных клеток поджелудочной железы человека для разработки новых методов лечения сахарного диабета I типа. Тезисы докладов научно-практической конференции молодых учёных Приволжского федерального округа с международным участием 2010; 112.
4. Linnekin D. Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. Int. J. Biochem. Cell Biol. 1999; 31: 1053–74.

5. Баранов В.Г., Соколова И.М., Гаспарян Э.Г. и др. Экспериментальный сахарный диабет. Роль в клинической диабетологии. Л.: Наука; 1983.
6. Caruana J.A., Whalen D.A., Anthony W.P. et al. Paradoxical effects of glucose feeding on liver regeneration and survival after partial hepatectomy. Endocr. Res. 1986; 12(2): 147–56.
7. Okabayashi T., Hnazaki K., Nishimori I. et al. Continuous post-operative blood glucose monitoring and control using a closed-loop system in patients undergoing hepatic resection. Dig. Dis. Sci. 2008; 53(5): 1405–10.
8. Калигин М.С., Гумерова А.А., Титова М.А. и др. C-kit — маркёр стволовых клеток эндокриноцитов поджелудочной железы человека. Морфология 2011; 140(4): 32–7.

Поступила 30.07.2012