

## ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИАБЕТЕ

М.С. Калигин<sup>1</sup>, А.А. Титова<sup>1</sup>, А.С. Плюшкина<sup>1,2</sup>, М.А. Титова<sup>1</sup>,  
А.А. Гуменова<sup>1</sup>, А.П. Киясов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) Федеральный университет, Казань, Россия

<sup>2</sup> Казанский Государственный медицинский университет, Казань, Россия

### Proliferation of cells of the pancreas in experimental diabetes

M.S. Kaligin<sup>1</sup>, A.A. Titova, A.S. Plushkina<sup>1,2</sup>, M.A. Titova<sup>1</sup>,  
A.A. Gumerova<sup>1</sup>, A.P. Kiassov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

<sup>2</sup> Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Важнейшим событием репаративной регенерации является усиление пролиферативных процессов в повреждённом органе. Однако, возможности пролиферации клеток поджелудочной железы при её повреждении изучены очень мало. Целью настоящего исследования стало изучение пролиферативной активности в ткани поджелудочной железы при экспериментальном аллоксановом диабете. Работа выполнена на 33 белых беспородных крысах самцах, у которых определяли уровень глюкозы в сыворотке крови, а также изучали экспрессию ядерного антигена пролиферирующих клеток PCNA в клетках поджелудочной железы.

Установлено, что уже через сутки экспериментальной гипергликемии обнаруживается экспрессия PCNA в клетках островков и ацинусов поджелудочной железы, которая сохранялась на всех сроках исследования. Через 2 сут. также были обнаружены единичные PCNA-позитивные клетки с цитоплазматическим окрашиванием в интерстиции, около сосудов и протоков, показано, что данные клетки синтезируют инсулин. Таким образом, после повреждающего воздействия аллоксана на  $\beta$ -клетки островков при экспериментальном диабете I типа пролиферация возможна и в клетках островков, и в ацинарных клетках. Кроме того, результаты исследования подтверждают возможность пролиферации  $\beta$ -инсулоцитов или их предшественников.

**Ключевые слова:** поджелудочная железа, сахарный диабет, регенерация, пролиферация, региональные стволовые клетки.

Лечение пациентов с сахарным диабетом (СД) I типа до сих пор остаётся одной из нерешённых проблем современной медицины. Осложнения СД, которые приводят к ранней инвалидности молодое работоспособное население, делают это заболевание социально и экономически значимым [1]. Поэтому поиск новых методов лечения, воздействующих на причины заболевания, имеет большое значение как для фундаментальной, так и для клинической медицины. Одним из подходов к разработке новых методов лечения СД I типа может стать применение клеточных технологий, позволяющих восстанавливать популяцию утраченных  $\beta$ -клеток, то есть устранять причину заболевания. При этом клетки, отобранные для разработки методов клеточной терапии, должны быть способны поддерживать собственную популяцию, в том числе путём деления. Способность клеток делиться необходима также для получения нужного для трансплантации количества клеток в условиях *in vitro*. В связи с этим изучение пролиферативного потенциала клеток поджелудочной железы в норме и после повреждения представляется весьма актуальным. На сегодняшний день уже существуют доказательства постоянного обновления  $\beta$ -клеток поджелудочной

The proliferative process intensification in the disrupted organs is very important in reparative regeneration. But the possibility of pancreas cells proliferation during damage is not been studied. The aim of our work was to examine the proliferation activity of pancreas during the experimental alloxan diabetes. The work was made on 33 rats. Blood glucose levels were measured. Also the expression of nuclear antigen of proliferating cells PCNA was studied in pancreas cells.

After the day of the experimental hyperglycemia PCNA expression in islet and acinar cells of pancreas was found, which was persisted at all stages of the experiment. After 2 days of the experiment single PCNA-positive cells with the cytoplasmic staining were found in the interstitium, near vessels and ducts. Proliferating cells, which produce insulin were found in islets during double staining. Thus, there is the proliferation in islet and acinar cells of pancreas during experimental diabetes type I after alloxan damage. Also, the results of our study confirms the ability of  $\beta$ -cells and progenitor pancreas cells proliferation.

**Key words:** pancreas, diabetes mellitus, regeneration, proliferation, regional stem cells.

железы взрослого человека [2]. Исследователи указывают, что у лабораторных грызунов эндокринные клетки могут образовываться за счет дифференцировки островковых клеток предшественниц, клеток эпителия протоков, преобразования ацинарных клеток, пролиферации дифференцированных эндокринных клеток в островках [3]. Однако до сих пор нет сведений о пролиферативной активности клеток поджелудочной железы при различных видах повреждения, в том числе при сахарном диабете I типа. Поэтому целью нашего исследования стало изучение процессов пролиферации в ткани поджелудочной железы при экспериментальном аллоксановом диабете.

### 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, США) в 1 мл 0,02 М ацетатного буфера pH = 4,0 в дозе 180 мг/кг, животным 2 группы вводили ацетатный буфер (контроль действия ацетатного буфера). Животные 3 группы не подвергались каким-либо воздействиям. Через 1, 2, 3, 5, 7 сут. у животных забирали кровь

для биохимического исследования, затем выводили из эксперимента и забирали поджелудочную железу для морфологического анализа. Парафиновые срезы окрашивали иммуногистохимически с коммерческими антителами против ядерного антигена пролиферирующих клеток (Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA, клон PC10, разведение 1:100, DAKO, Дания) и инсулина (клон 2D11-H5, разведение 1:40, Novocastra, Великобритания). Уровень глюкозы определяли в сыворотке крови глюкозооксидазным методом [4]. Полученные данные подвергли статистической обработке с помощью статистического графического пакета Microsoft Excel 2010.

## Результаты

В крови крыс второй и третьей группы изменений уровня глюкозы и морфологии поджелудочной железы не выявлено.

В норме в поджелудочной железе пролиферировали клетки островков и некоторых ацинусов. В островках выявляли не более 2–4 клеток с окрашенными ядрами, равномерно расположенными по всему островку. В части ацинусов также обнаружены единичные (1–2 на ацинус) пролиферирующие клетки (рис. 1А). При этом пролиферативная активность клеток отличалась от дольки к дольке.

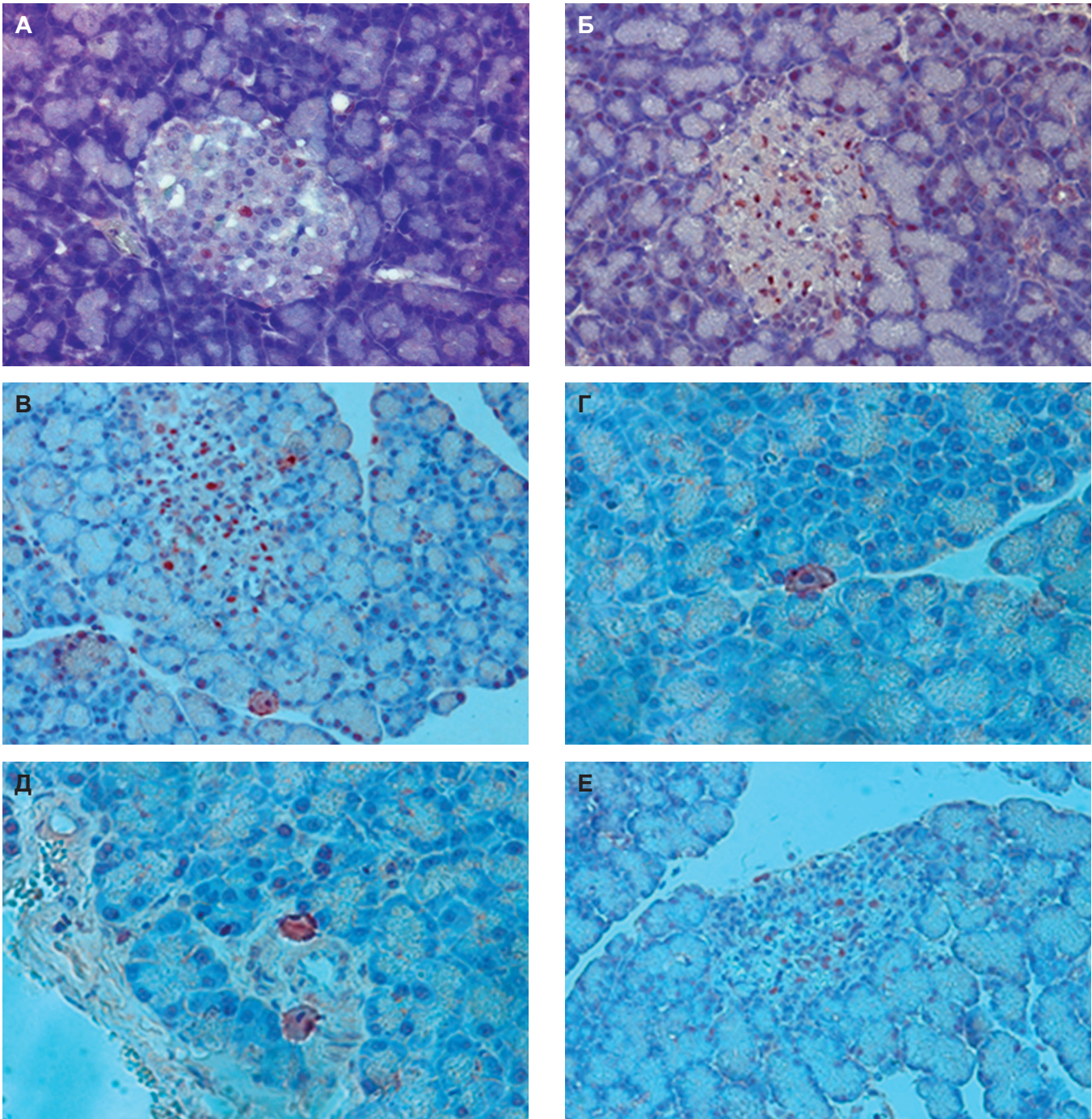


Рис. 1. Клетки с PCNA-позитивными ядрами (А, Б, В, Е) и цитоплазмой (Г, Д) в поджелудочной железе крыс: А – в норме; Б – 1 сут. после введения аллоксана (и гипергликемии); В, Г, Д – 2 сут. после введения аллоксана (и гипергликемии); Е – 3 сут. после введения аллоксана (и гипергликемии). Иммуногистохимическая реакция, продукт реакции коричневого цвета. Ув.: А–В, Е  $\times 400$ ; Г, Д  $\times 630$

Как правило, рядом с островками, клетки которых пролиферировали, всегда располагались ацинусы с PCNA-позитивными клетками. И наоборот, имелись участки, пролиферативная активность в которых отсутствовала как в островках, так и в ацинусах.

Через сутки после введения аллоксана в крови крыс экспериментальной группы наблюдали повышение уровня глюкозы, что свидетельствовало о развитии гипергликемии. После 2 сут. уровень глюкозы снижался (рис. 2)

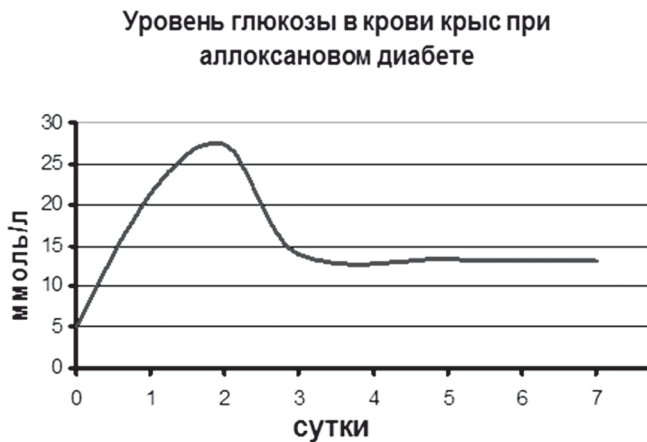


Рис. 2. Уровень глюкозы в крови крыс при аллоксановом диабете

Через сутки экспериментального диабета число пролиферирующих клеток становится больше по сравнению с нормой (см. рис. 1Б). В островках окрашенные ядра располагались равномерно по всей поверхности, в некоторых островках число позитивных клеток доходило до 25–30. Также следует отметить, что размеры окрашенных ядер были заметно меньше, чем в норме. В ацинусах также установлено повышение числа пролиферирующих клеток до 3–4 в каждом ацинусе. Следует отметить, что пролифе-

ративная активность в пределах среза была более равномерной по сравнению с нормой.

Через 2 сут. эксперимента картина окрашивания в островках принципиально не изменилась. В них по-прежнему наблюдали большое число окрашенных ядер. Однако в ацинусах количество пролиферирующих клеток заметно уменьшилось, картина в них стала близка к норме (см. рис. 1В).

На этом сроке обнаружен интересный феномен — единичные позитивные клетки, у которых была окрашена цитоплазма. Эти клетки располагались в интерстиции или рядом с сосудами и протоками и имели неровные волнистые контуры (см. рис. 1Г, Д).

Через 3 сут. число пролиферирующих клеток в островках существенно уменьшилось. Проллиферативная активность клеток ацинусов не изменилась (см. рис. 1Е) Количество и локализация клеток с окрашенной цитоплазмой также не изменились.

Через 5 сут. пролиферативная активность клеток приблизилась к норме, число PCNA-позитивных клеток снизилось и вновь стала заметна неравномерность распределения PCNA+ клеток от дольки к дольке.

На последующих сроках эксперимента картина окрашивания не изменилась, но одиночные клетки с окрашенной цитоплазмой могли быть выявлены до конца эксперимента. Надо заметить, что окрашенные ядра мы наблюдали и в клетках сосудов и протоков.

Результаты морфометрии PCNA-позитивных ядер в островках поджелудочной железы представлены в таблице. Максимальная пролиферация клеток происходит через 1 сут. экспериментального диабета, а через 7 сут. возвращается к норме.

При проведении двойного окрашивания мы обнаружили в островках пролиферирующие клетки, вырабатывающие инсулин (рис. 3). Эти клетки регистрировались через 1, 2 и 3 сут. эксперимента. Через 5 сут. эксперимента пролиферирующих инсулин-продуцирующих клеток мы не обнаружили. В норме таких клеток также не было.

#### Среднее число PCNA-позитивных ядер клеток островков поджелудочной железы крысы при экспериментальном диабете ( $P < 0,05$ )

| Норма   | 1 сут.  | 2 сут.    | 3 сут.  | 5 сут.   | 7 сут.   |
|---------|---------|-----------|---------|----------|----------|
| 0,4±0,1 | 19,91±8 | 7,13±5,11 | 6,6±4,8 | 2,2±1,56 | 0,4±0,11 |

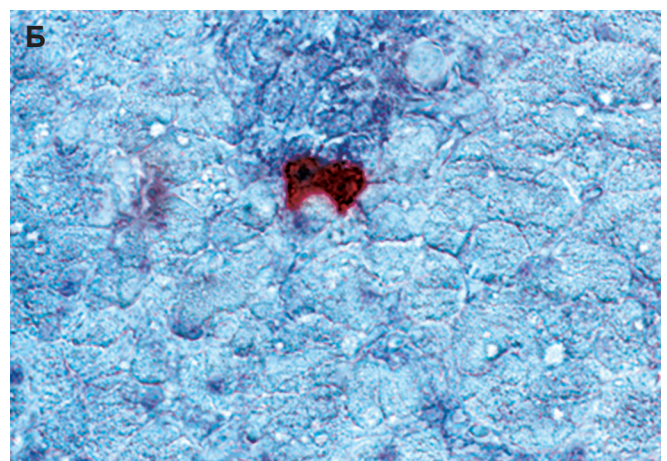
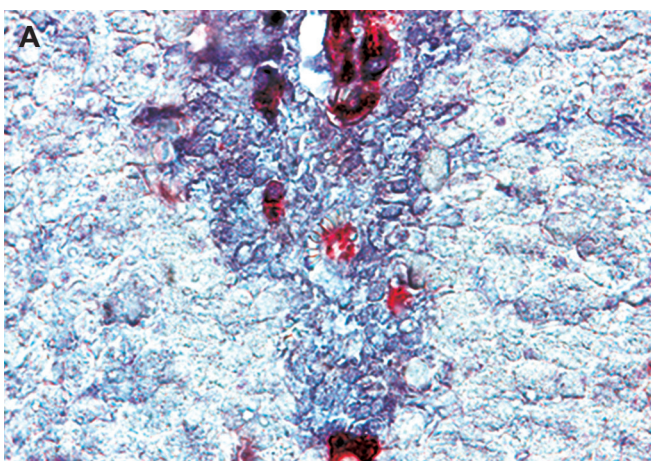


Рис. 3. Клетки островка поджелудочной железы крысы, 3 сут. экспериментального аллоксанового диабета, одновременно экспрессирующие PCNA (синий цвет) и инсулин (красный цвет). Ув.: А ×400, Б ×1000

## Обсуждение

Результаты нашего исследования демонстрируют, что пролиферация в ткани поджелудочной железы происходит как в норме, так и при экспериментальном диабете. Возможность самообновления эндокриноцитов в островках в норме обсуждается не первый год. В качестве клеточных источников клеток островков упоминаются клетки эпителия протоков, островков и ацинусов [5]. Наши данные о наличии в норме PCNA-позитивных клеток в поджелудочной железе подтверждают это предположение. Интересно, что PCNA-позитивные клетки в островках и ацинусах располагались, как правило, рядом. Это может свидетельствовать о том, что самообновление тканей поджелудочной железы происходит не равномерно по всей ткани, а определёнными участками в разное время, причем обновление в пределах каждой дольки происходит одновременно и в эндокринном, и в экзокринном отделах. Возможно, что какие-то клетки поджелудочной железы периодически выделяют необходимые факторы роста, стимулирующие её обновление в норме, и эти факторы, вероятно, одновременно запускают пролиферацию и эндокринной, и экзокринной части железы. На наш взгляд на роль таких клеток могут претендовать звёздчатые клетки поджелудочной железы, которые по своим свойствам схожи со звёздчатыми клетками печени по структуре, фенотипу, функции и способности к выработке факторов роста и компонентов межклеточного матрикса [6]. Ранее было показано, что звёздчатые клетки поджелудочной железы участвуют в её регенерации при экспериментальном диабете [7], а в ходе пренатального развития человека способны синтезировать инсулин [8]. Пролиферативную активность самих звёздчатых клеток поджелудочной железы при экспериментальном диабете выявить не удалось.

Максимум пролиферирующих клеток в островках через сутки после повреждения говорит о том, что при экспериментальном диабете уже на этом сроке наблюдается пик восстановления утраченных эндокриноцитов. Мы предполагаем, что этими пролиферирующими клетками могут быть C-kit-позитивные клетки поджелудочной железы, максимальное количество которых также выявляется на этой модели диабета через сутки после введения аллоксана [9]. Нами также ранее было показано, что именно эти клетки играют ключевую роль при развитии островков поджелудочной железы при пренатальном развитии человека [10]. Следующие двое суток, очевидно,

происходит дифференцировка образующихся клеток в инсулин-продуцирующие клетки, что подтверждается появлением пролиферирующих клеток, синтезирующих инсулин, которые выявляли в островках до конца 3 сут. эксперимента, и коррелирует со снижением уровня глюкозы на этом сроке. Таким образом, в целом морфо-функциональное восстановление утраченных  $\beta$ -клеток происходит уже к этому сроку.

Большой интерес вызывает установленный нами факт присутствия в поджелудочной железе при экспериментальном диабете крупных клеток с PCNA-позитивной цитоплазмой. В настоящее время факт наличия PCNA в цитоплазме изучен недостаточно. Однако имеются данные о возможности присутствия в цитоплазме так называемого свободного PCNA. Описаны несколько примеров таких клеток. Одним из них являются клеточные линии человеческого лейкоза HL-60 и K-562 [11], а также CD4+ T-клетки [12]. Функция PCNA в цитоплазме в настоящее время не установлена. Поскольку подобные клетки описаны главным образом среди клеток крови, можно предположить, что это могут быть макрофаги. Возможно, что такой эффект может быть результатом активации макрофагов в ответ на повреждающее действие аллоксана.

Таким образом, после повреждающего воздействия аллоксана на  $\beta$ -клетки островков при экспериментальном диабете I типа пролиферация возможна и в клетках островков, и в ацинарных клетках. Также пролиферация происходит в клетках протокового эпителия и клетках сосудов. До сих пор пролиферативная активность клеток была описана в виде единичных клеток только в островках у приматов при глюкозной нагрузке [13]. Кроме того, результаты исследования подтверждают возможность пролиферации  $\beta$ -инсулоцитов или их предшественников, которыми могут быть клетки, экспрессирующие C-kit.

## Благодарности

*Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров. Работа финансировалась за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Работа частично выполнена на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского (Приволжского) федерального университета.*

## ЛИТЕРАТУРА:

1. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Фадеев В.Ф. Эндокринология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007: 432.
2. Bonner-Weir S. Beta-cell turnover: its assessment and implications. *Diabetes*. 2001; 50: 20-4.
3. Yamada S., Kojima I. Regenerative medicine of the pancreatic islets. *Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 2005; 12: 218-26.
4. Орехович В.Н. Современные методы в биохимии. М.: Наука, 1977: 392.
5. Bonner-Weir S., Toschi E., Inada A. et al. The pancreatic ductal epithelium serves as a potential pool of progenitor cells. *Pediatr. Diabetes*. 2004; 5: 16-22.
6. Kim N., Yoo W., Lee J., Kim H. and all. Formation of vitamin A lipid droplets in pancreatic stellate cells requires albumin. *Int. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2009; 58(10): 1382-90.
7. Калигин М.С., Плюшкина А.С., Титова А.А. и др. C-kit и десмин-позитивные клетки в регенерации островков поджелудочной железы при экспериментальном диабете у крыс. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2013; VIII(3): 113-5.
8. Титова А.А., Шарипова Э.И. Экспрессия инсулина десмин-позитивными звёздчатыми клетками поджелудочной железы человека. 86-я Всероссийская студенческая научная конференция памяти чл.-корр. Академии наук РТ, проф. Салихова. Казань, 2012: 241.

9. Плюшкина А.С., Калигин М.С., Андреева Д.И., Титова А.А. и др. C-kit-позитивные клетки островков поджелудочной железы крысы как клетки-предшественницы эндокриноцитов при аллоксановом диабете. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2012; VIII(3): 138-41.

10. Калигин М.С., Гумерова А.А., Титова М.А., Андреева Д.И. и др. C-kit маркер стволовых клеток эндокриноцитов поджелудочной железы. *Морфология* 2011; 140 (4): 32-7.

11. Grzanka A., Skok Z., Janiak A., Grzanka D. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in leukemia cell lines HL-60 and K-562 at the light and electron microscope level. *Neoplasma* 2000; 47(5): 288-93.

12. Morrow P.W., Tung H.Y., Hemmings H.C. Jr. Rapamycin causes activation of protein phosphatase-2A1 and nuclear translocation of PCNA in CD4+ T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 323(2): 645-51.

13. Fujisawa H., Zhang Z., Sun W. et al. Histopathological Changes in the Pancreas from a Spontaneous Hyperglycemic Cynomolgus Monkey. *Tox. Pathol.* 2012; 25(3): 215-9.

*Поступила: 09.07.2014*