

C-kit - позитивные клетки островков поджелудочной железы крысы как клетки - предшественницы эндокриноцитов при аллоксановом диабете

А.С. Плюшкина¹, М.С. Калигин¹, Д.И. Андреева¹, А.А. Титова¹, И.Х. Валеева¹,
А.В. Демьянов¹, 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 pancreas islets cell of rats pancreas as an endocrine cells progenitor during alloxan diabetes

A.S. Plushkina¹, M.S. Kaligin¹, D.I. Andreeva¹, A.A. Titova¹, I.H. Valeeva¹, A.V. Demyanov¹,
A.A. Gumerova^{1,2}, A.P. Kiassov^{1,2}

¹ Kazan State Medical University, Kazan

² Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan

На сегодняшний день одним из наиболее перспективных маркёров клеток-предшественниц эндокриноцитов поджелудочной железы является рецептор фактора стволовых клеток C-kit или CD117, который участвует в дифференцировке этих клеток в эндокриноциты в пренатальном развитии и сохраняется у взрослого человека в клетках островков поджелудочной железы. Однако до сих пор остаётся неизученным участие C-kit⁺-клеток-предшественниц в восстановлении популяции клеток островков Лангерганса при сахарном диабете I типа. Поэтому целью исследования стало изучение динамики экспрессии C-kit в клетках островков поджелудочной железы крысы при экспериментальном аллоксановом диабете. 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 экспрессию C-kit, инсулина и глюкагона в ткани поджелудочной железы при экспериментальном аллоксановом диабете. В результате исследования уже на 1 сут. экспериментальной гипергликемии нами была обнаружена экспрессия C-kit в клетках островков поджелудочной железы, которая сохранялась на всех исследованных сроках. При этом клетки, имеющие на своей мембране C-kit, экспрессировали также инсулин и глюкагон. Таким образом, C-kit⁺-клетки, синтезирующие инсулин, могут способствовать коррекции нарушений углеводного обмена, возникающих при экспериментальном аллоксановом диабете.

Ключевые слова: поджелудочная железа, прогениторные клетки, рецептор фактора стволовых клеток, сахарный диабет.

Сахарный диабет I типа представляет собой хроническое заболевание, причиной которого является поражение эндокринной части поджелудочной железы (ПЖ), а именно β-клеток островков Лангерганса. В последнее время отмечается большой подъём заболеваемости сахарным диабетом [4]. Кроме того, сахарный диабет имеет большую социальную и экономическую значимость, поскольку приводит к ранней инвалидизации работоспособной части населения [4]. На сегодняшний день одним из основных методов лечения сахарного диабета I типа является заместительная терапия. Её суть сводится к постоянному введению в организм экзогенного инсулина или инсулиноподобных препаратов. Однако это не даёт гарантии отсутствия у пациентов осложнений диабета, ведущих к инвалидизации.

e-mail: ob_alex@mail.ru

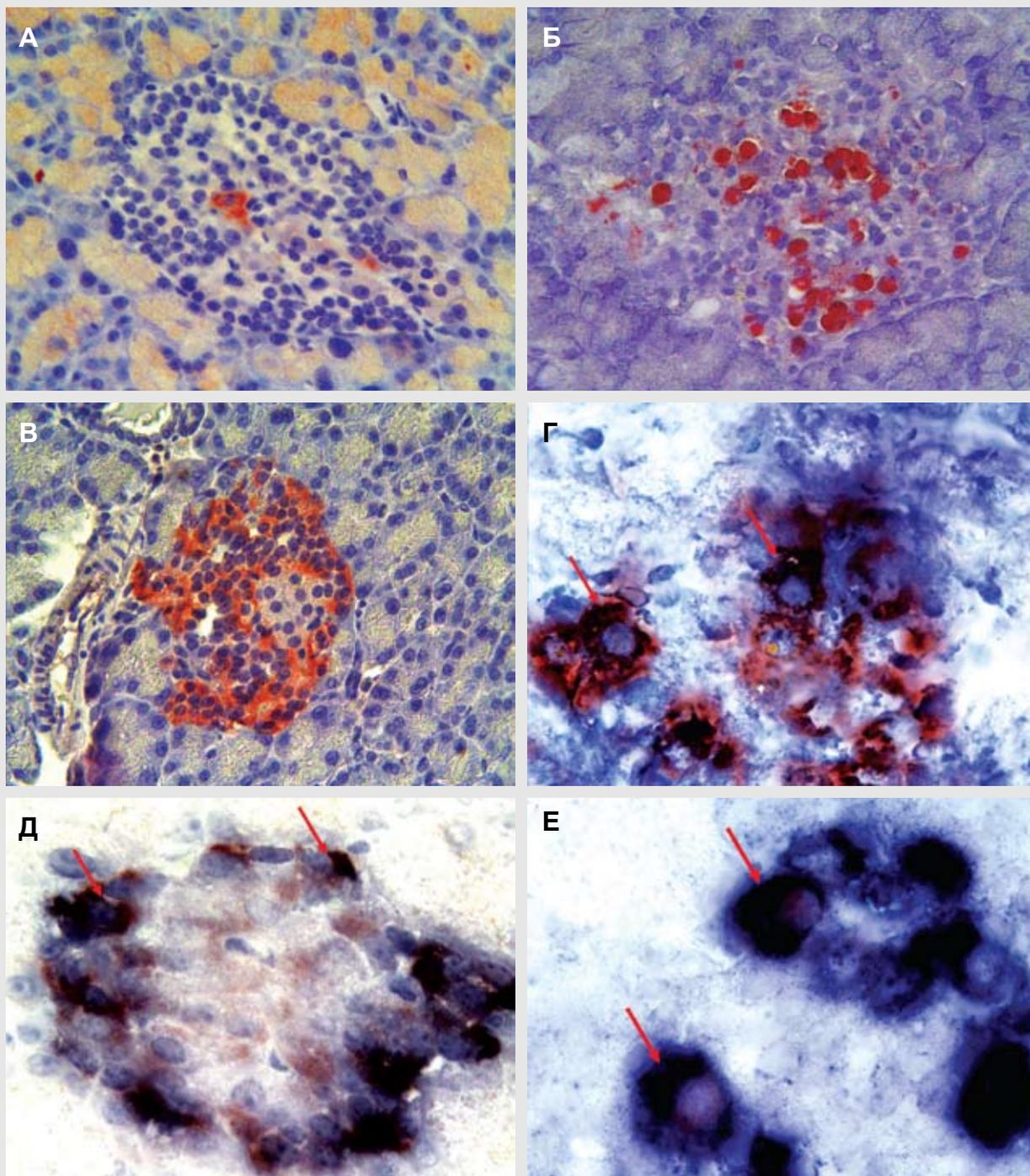
One of the most common markers for stem cells in pancreas is the stem cell factor receptor C-kit (CD117) that plays a main role in differentiation of progenitor endocrine cells of pancreas islets in prenatal development and persists after birth. But still the role of C-kit positive cells in islet β-cells regeneration during the diabetes mellitus type I has not been studied. That's why the aim of our work was to study the dynamic of C-kit expression in the pancreas islets during the experimental alloxan diabetes in rats. The work was made on 33 rats with the experimental diabetes. Blood glucose levels, levels of insulin and glucagon were measured. And also we studied the expression of C-kit, insulin and glucagon in rat pancreas. The results of the study showed the C-kit expression after one day of the experimental hyperglycemia. These cells were also expressed insulin and glucagon. We suppose that C-kit⁺-cells, which produce insulin, were enable to correct disrupted carbohydrate metabolism during alloxan diabetes.

Key words: pancreas, progenitor cells, stem cell factor receptor, diabetes mellitus.

Весьма перспективным решением проблемы сахарного диабета может стать применение клеточных технологий, открывающих возможности этиологического лечения диабета за счет восстановления популяции β-клеток островков Лангерганса. Одна из основных проблем, затрудняющих применение стволовых клеток, заключается в их идентификации и выделении из-за отсутствия чётких сведений об их фенотипе. На сегодняшний день одним из наиболее перспективных маркёров клеток-предшественниц эндокриноцитов ПЖ является рецептор фактора стволовых клеток C-kit, или CD117. Ранее нами была показана его важная роль в пренатальном развитии островков ПЖ человека [1]. Однако значение C-kit при сахарном диабете I типа остаётся неизученным.

Регенерация β -клеток и островков ПЖ исследуется на различных экспериментальных моделях [2]. Наиболее близкой по патогенезу развития гипергликемии является модель диабета, вызванного введением аллоксана, который повреждает β -клетки

островков ПЖ, не нарушая работу её внешнесекреторного аппарата [3]. В связи с этим целью исследования стало изучение популяции C-kit-позитивных клеток ПЖ крысы при экспериментальном аллоксановом диабете.



Поджелудочная железа крысы при экспериментальном аллоксановом диабете, клетки островка Лангерганса:

А – единичные клетки, экспрессирующие C-kit,

Б – клетки, экспрессирующие инсулин,

В – клетки, экспрессирующие глюкагон;

Г – клетки, одновременно экспрессирующие инсулин (синий цвет) и глюкагон (красный цвет);

Д – клетки, одновременно экспрессирующие C-kit (красный цвет) и глюкагон (синий цвет);

Е – клетки, одновременно экспрессирующие C-kit (красный цвет) и инсулин (синий цвет).

А–В – 2 сут.; Г–Е – 3 сут. после введения аллоксана.

Докраска: гематоксилин.

Ув.: А–В $\times 400$, Г–Е $\times 1000$

Материал и методы

Исследование проведено на 33 белых беспородных крысах самцах, которые были разделены на группы. Животным 1-й группы внутривенно 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 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, животных выводили из эксперимента и эксплантировали ПЖ для морфологического анализа. Парафиновые срезы ПЖ окрашивали иммуногистохимически с антителами к C-kit, инсулину — маркеру дифференцированных β -клеток — и глюкагону — маркеру дифференцированных α -клеток. Уровень глюкозы определяли в сыворотке крови глюкозооксидазным методом [5], уровень инсулина и глюкагона определяли методом иммуноферментного анализа.

Результаты

В крови крыс второй и третьей группы уровни глюкозы, инсулина и глюкагона сохранялись в пределах нормы. В ткани ПЖ морфологических изменений в этих группах не выявлено.

Через сутки после введения аллоксана в крови крыс 1 группы наблюдали повышение уровня глюкозы, что свидетельствовало о развитии гипергликемии. Уже на этом сроке в одиночных клетках островков ПЖ крыс мы выявили экспрессию C-kit (рис. А), и она сохранялась в этих клетках на всех исследованных сроках. В других клетках ПЖ экспрессии C-kit мы не наблюдали.

При изучении экспрессии инсулина через 2 сут. эксперимента было обнаружено явное уменьшение количества инсулин⁺-клеток по сравнению с нормой — они становились единичными (рис. Б). К 5–7 сут. число инсулин⁺-клеток приближалось к норме. Следовательно, после однократного введения аллоксана и вызванного этим повреждения β -клеток ПЖ возможно восстановление синтеза этого гормона. Данный вывод подтверждался снижением уровня глюкозы в крови начиная со вторых суток эксперимента и одновременным повышением уровня инсулина в крови на этом же сроке.

При исследовании экспрессии глюкагона мы наблюдали противоположную картину. В норме позитивное окрашивание на глюкагон в поджелудочной железе крысы наблюдается по периферии островков в одном-двух рядах клеток. На 2 и 3 сут. эксперимента количество глюкагон⁺-клеток возрастало. Глюкагон⁺-клетки располагались не только по периферии, но и занимали площадь практически всего островка (рис. В). Однако после 5 сут. в островках ПЖ крыс количество глюкагон⁺-клеток уменьшалось, они вновь располагались лишь по периферии. Такая морфологическая картина коррелировала с показателями уровня глюкозы и глюкагона в крови: на 2 сут. эксперимента уровни глюкагона и глюкозы в крови повышались, а после 3 сут. — снижались.

Интересно, что при сопоставлении результатов морфометрических исследований серийных срезов, окрашенных на инсулин и глюкагон, оказалось, что в островках некоторых образцов сумма площадей инсулин⁺- и глюкагон⁺-частей островка была более 100%. Такие показатели могут быть связаны с тем,

что при экспериментальном диабете в островках появляются клетки, одновременно синтезирующие оба гормона — инсулин и глюкагон, и области окрашивания перекрываются. Это предположение было подтверждено при двойном окрашивании на инсулин и глюкагон (рис. Г).

При окрашивании серийных срезов на глюкагон и C-kit мы обнаружили, что C-kit⁺-островки и глюкагон⁺-островки имели сходную форму и одинаковую локализацию. При проведении двойного окрашивания на C-kit и глюкагон мы обнаружили C-kit⁺/глюкагон⁺-клетки (рис. Д). При анализе серийных срезов, окрашенных на C-kit и инсулин, подобной закономерности выявлено не было. Однако проведение двойного окрашивания на инсулин и C-kit позволило обнаружить единичные C-kit⁺/инсулин⁺-клетки (рис. Е).

Таким образом, C-kit⁺-клетки островков ПЖ могут участвовать в коррекции морфологических изменений в островках и уровня глюкозы в крови крысы при экспериментальном аллоксановом диабете путём дифференцировки в β -клетки через стадию глюкагон-продуцирующих клеток.

Обсуждение

На основании полученных результатов мы предполагаем, что восстановление популяции β -клеток происходит следующим образом. После повреждения β -клеток в крови повышается уровень глюкозы, что является стимулом для активации стволового компартмента островков. На мембране клеток-предшественниц островков появляется C-kit, который связывается со своим лигандом — фактором стволовых клеток, что запускает процесс дифференцировки C-kit⁺-клеток. При этом процесс дифференцировки происходит через стадию C-kit⁺/глюкагон⁺-клеток. Далее C-kit⁺-клетки начинают синтезировать глюкагон и инсулин, и постепенно эти клетки становятся только инсулин-продуцирующими. Самое интересное, что эта последовательность дифференцировки C-kit⁺-клеток очень напоминает пренатальное развитие эндокриноцитов поджелудочной железы человека, когда C-kit⁺-клетки протоков ПЖ начинают сначала синтезировать глюкагон с 8,5 нед. гестации, а затем в этих же клетках появляется инсулин. При этом в островках также имеются C-kit⁺-клетки, одновременно синтезирующие глюкагон и инсулин [1]. Таким образом, результаты нашего исследования опровергают данные о том, что развитие популяций β - и α -клеток происходит независимо друг от друга [6]. Наоборот, они подтверждают существование одной общей клетки-предшественницы β - и α -клеток островков ПЖ [7]. По мере дифференцировки эндокринных клеток количество C-kit на мембране уменьшается, и образуются дифференцированные эндокриноциты.

Обнаружение одной клетки-предшественницы для β - и α -клеток ПЖ, которая сначала синтезирует глюкагон, а затем и инсулин, требует дальнейшего изучения и пересмотра патофизиологических основ развития сахарного диабета I типа. Данный факт позволяет предположить, что при сахарном диабете I типа гипергликемия является следствием не только недостатка инсулина, но и избытка глюкагона. То есть клетки-предшественницы начинают дифференцироваться, чтобы восполнить недостаток инсулина. Однако при этом они сначала начинают синтезировать

глюкагон, который еще более усугубляет ситуацию. То, что C-kit⁺-клетки способны дифференцироваться в α - и β -клетки ПЖ позволяет утверждать, что именно этот маркер действительно характерен для клеток-предшественниц эндокриноцитов, что открывает перспективы для разработки новых методов лечения сахарного диабета I типа путём трансплантации C-kit⁺-клеток ПЖ, которые будут синтезировать гормоны и корректировать нарушения углеводного

обмена. Кроме того, поскольку C-kit — это трансмембранный рецептор, то он является наиболее привлекательным и перспективным маркером с точки зрения выделения этих клеток для последующего культивирования и трансплантации.

Благодарности

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

ЛИТЕРАТУРА:

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

2. Закирьянов А.Р., Онищенко Н.А. Возможные пути реализации регенерационной стратегии при лечении сахарного диабета I типа методами клеточной трансплантации. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2007; 2(III): 23–33.

3. Баранов В.Г., Соколова И.М., Гаспарян Э.Г. Экспериментальный сахарный диабет. Роль в клинической диабетологии. Л.: Наука; 1983.

4. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Фадеев В.Ф. Эндокринология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007.

5. Орехович В.Н. Современные методы в биохимии. М.: Наука; 1977.

6. Herrera P.L., Huarte J., Zufferey R. et al. Ablation of islet endocrine cells by targeted expression of hormone-promoter-driven toxigenes. PNAS USA 1994; 91: 12999–3003.

7. Jensen J., Heller R.S., Funder-Nielsen T. et al. Independent development of pancreatic α - and β -cells from neurogenin3-expressing precursors a role for the notch pathway in repression of premature differentiation. Diabetes 2000; 49: 163–76.

Поступила 01.08.2012