

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ОСТРОВКОВОПОДОБНЫХ КЛАСТЕРОВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ МОНОСЛОЯ ПРОТОКОВОГО ЭПИТЕЛИЯ

Кирсанова Л.А., Бубенцова Г.Н., Баранова Н.В., Скалецкий Н.Н.,
Зайденов В.А., Пушкова И.А.

ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова»
Минздрава России, г. Москва

Монослой протоковых клеток поджелудочной железы новорожденного кролика при культивировании в бессывороточной среде структурно видоизменялся, формируя по истечении двухнедельного срока трехмерные островковоподобные кластеры. Основные типы островковых клеток (β - и α -клетки), ранее не выявляемые в однослойных культурах, идентифицировались в островковоподобных кластерах методом иммуногистохимии. Происхождение этих эндокринных клеток, их вероятные предшественники являются предметом обсуждения.

Ключевые слова: монослой протоковых клеток, островковоподобные кластеры, прогениторные клетки, нестин.

FEATURES OF ISLET-LIKE CLUSTERS GENERATION IN PANCREATIC DUCTAL CELL MONOLAYER CULTURING

Kirsanova L.A., Bubentsova G.N., Baranova N.V., Skaletskiy N.N.,
Zaydenov V.A., Pushkova I.A.

Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs,
Moscow

Newborn rabbit pancreatic cell monolayer was obtained as we described earlier. The cultivated epithelial cells were shown by immunofluorescence to express special ductal marker CK19 and were insulin- and glucagon-negative for 10–15 days. A few fusiforms of nestin-positive cells were found in monolayer. Over 2 weeks in serum-free medium the plaques of epithelial cells became crowded and formed 3-dimensional structures – islet-like clusters. Islet-like clusters contain some insulin- and glucagon-positive cells recognized by immunohistochemistry staining. Pancreatic endocrine cell generation in 3-dimensional structures is discussed.

Key words: pancreatic ductal cell monolayer, islet-like clusters, nestin.

Как известно, неогенез β -клеток островков поджелудочной железы представляет процесс образования новых инсулиноцитов из клеток-предшественников. По классическим представлениям, основным кандидатом на эту роль является эпителий панкреатических протоков [3–6, 11, 13]. Однако какие конкретно фенотипические характеристики имеют клетки-предшественники, какие специальные маркеры они экспрессируют, до сих пор окончательно не выяснено.

В последние годы прогениторность панкреатической ткани часто связывают с экспрессией нестина – белка промежуточных филаментов цитоскелета, признанного маркера нейродифференцировки [10, 16–18]. Но существует и другое мнение, согласно которому нестин-позитивные клетки являются скорее прогениторами клеток мезенхимального происхождения (в частности, эндотелия), чем β -клеток [6, 9, 11]. Таким образом, на сегодняшний день данные о прогениторных клетках поджелудоч-

Статья поступила в редакцию 26.04.12 г.

Контакты: Баранова Наталья Владимировна, научный сотрудник лаборатории клеточной трансплантации
Тел. 8 (499) 190-42-66, e-mail: BarnatS@yandex.ru

ной железы противоречивы, и вопрос остается открытым.

Ранее мы сообщали о получении из поджелудочной железы новорожденного кролика однослойных культур протокового эпителия, экспрессирующего специальный маркер цитокератин-19 [1]. В настоящей работе мы исследовали возможность дифференцировки протокового эпителия в условиях депривации (культивирование в бессывороточной среде) и попытались определить фенотип возможных предшественников островковых клеток доступными нам методами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Однослойные культуры протокового эпителия получали по описанной ранее методике [1]. Начиная с восьмого дня культивирование проводилось в среде 199 без добавления сыворотки.

Для выявления белков цитоскелета 12-суточные культуры фиксировали охлажденным метанолом в течение 10–20 минут при температуре -18°C .

Для определения в монослое инсулинопозитивных и глюкагонопозитивных клеток использовали фиксацию 5% формалином в течение 20 минут при комнатной температуре.

Цитокератин-19, нестин, инсулин и глюкагон выявляли непрямой метод, используя моноклональные антитела к цитокератину 19 (Novocastra), к инсулину (Sigma), к глюкагону (Sigma) и поликлональные антитела к нестину фирмы Abcam. В качестве вторых антител использовали антимышьи моноклональные антитела (Sigma), меченные FITC, и поликлональные козы антитела против иммуноглобулинов кролика, меченные Alexa (Invitrogen). Иммунофлуоресцентное исследование проводили с помощью люминесцентного микроскопа Nikon eclipse 50.

Исследование трехмерных островкоподобных кластеров проводили следующим образом. Культуральную жидкость с взвешенными в ней структурами переносили из культурального флакона в коническую пробирку, центрифугировали в течение 2 минут при 800 оборотах в минуту, супернатант удаляли, и кластеры, представленные в осадке, фиксировали в жидкости Буэна. Материал заливали в парафин, и срезы толщиной 4 мкм подвергали иммуногистохимическому окрашиванию по классической методике с пероксидазой хрена и использованием соответствующих антител для выявления основных типов островковых клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Монослой протокового эпителия окончательно формировался к 10–12-му дню культивирования и

был представлен в основном клетками полигональной формы. Отдельные фибробластоподобные клетки выявлялись на периферии пластинки монослоя, а также и среди типичных эпителиальных клеток.

Иммуногистохимическое окрашивание антителами к цитокератину-19 показало, что монослой окрашивался полностью (рис. 1). При этом в цитоплазме клеток наблюдалось тонкофибрилярное свечение. Выявление в монослое клеток, экспрессирующих нестин, продемонстрировало лишь одиночные иммунопозитивные клетки. Эти клетки имели, как правило, вытянутую веретенообразную форму и были локализованы как на периферии монослоя, так и разбросаны по пласту эпителиальных клеток (рис. 2). Подобную форму нестин-позитивных клеток описывают и другие авторы [6, 9, 18]. Однако далеко не все фибробластоподобные клетки, наблюдаемые нами в монослое, окрашивались антителами к нестину. Если фибробластоподобные клетки в той или иной степени были представлены во всех зонах монослоя, то нестин-позитивные клетки выявлялись лишь в 20–25% таковых.

Иммуногистохимическое окрашивание антителами к инсулину и глюкагону не выявляло иммунопозитивных клеток в монослое в течение всего срока наблюдения (до 15 дней), т. е. дифференцировки протоковых клеток в островковые мы не наблюдали. Однако по истечении двухнедельного срока культивирования были зафиксированы события, связанные со структурными изменениями пластинки монослоя. Эти изменения выражались в постепенном сжатии пласта, сопровождающимся видимым сокращением площади поверхности, и в дальнейшем в формировании трехмерной структуры, так называемого островкоподобного кластера (рис. 3). Проведенное нами иммуногистохимическое исследование данных структур показало наличие в их составе основных типов островковых клеток – β - и α -клеток (рис. 4, 5). Специализированные эндокринные клетки были представлены в подавляющем большинстве полученных нами кластеров (более 80%). При этом β -клетки были представлены количественно более значимо, нежели α -клетки. Так, если в отдельных кластерах мы обнаруживали от 1 до 25 β -клеток, то α -клетки были одиночными и выявлялись не во всех вышеуказанных структурах. И те и другие типы островковых клеток обнаруживались как в поверхностных слоях кластеров, так и в их толще.

Формирование трехмерных структур островковых кластеров в литературе описано при культивировании монослоя панкреатического протокового эпителия поджелудочной железы человека и некоторых видов животных – свиньи, мыши, крысы [2, 7, 12, 15, 18]. При этом отмечалось, что необходимым требованием для эндокринной диффе-

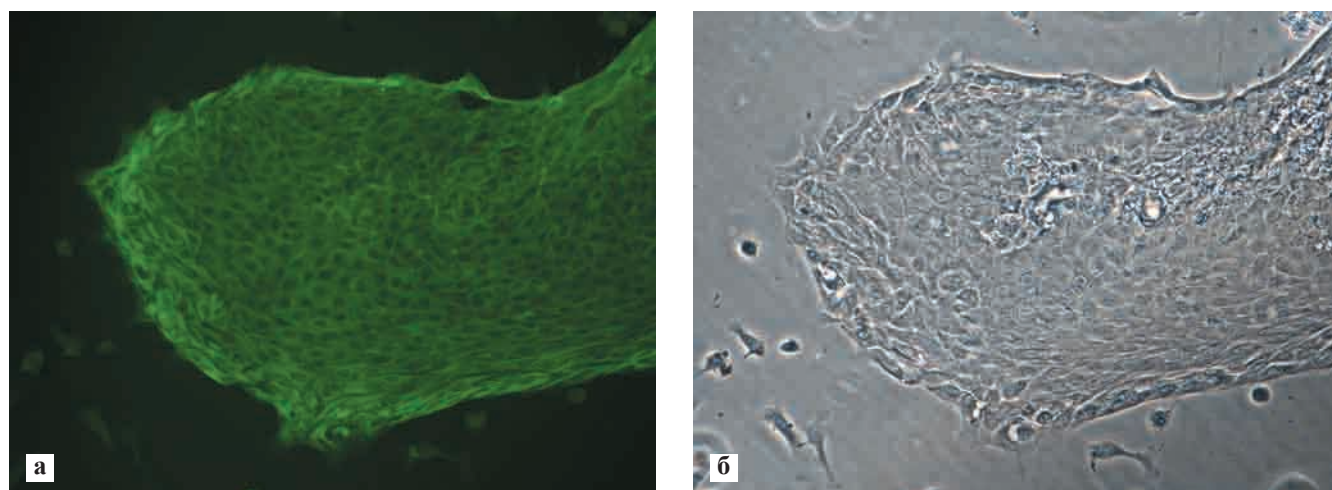


Рис. 1. Монослой протоковых клеток, 10 суток культивирования: а – экспрессия цитокератина-19; метод непрямого иммунофлуоресценции, $\times 200$; б – то же, фазовый контраст, $\times 200$

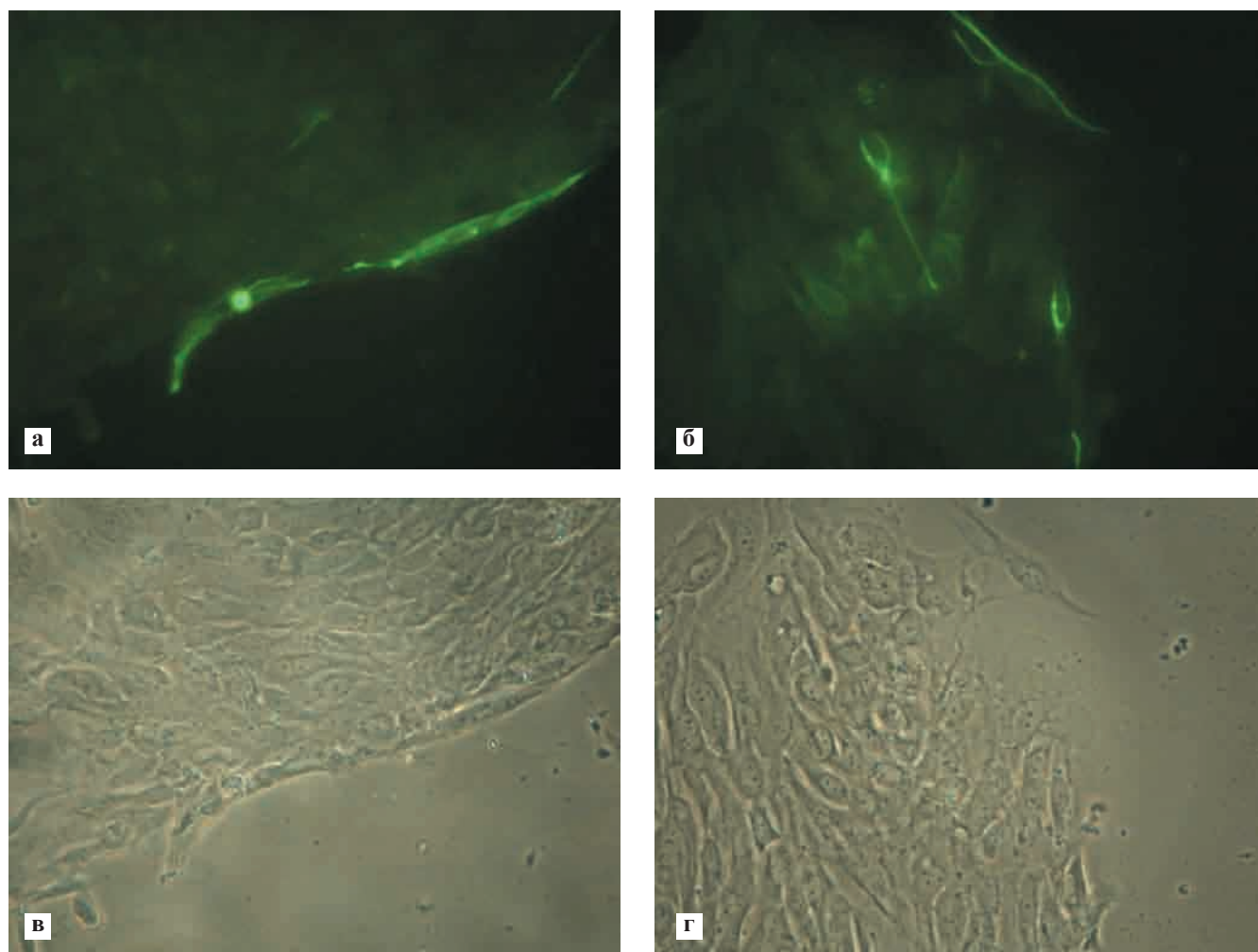


Рис. 2. Монослой протоковых клеток, 10 суток культивирования: а, б – окрашивание антителами к нестину, $\times 400$; в, г – то же, фазовый контраст, $\times 400$

ренцировки протокового эпителия являлось культивирование в бессывороточной среде [6, 16]. Однако, по нашему мнению, именно формирование трехмерных кластеров, сопровождающееся образованием новых межклеточных контактов, яви-

лось, возможно, важнейшим пусковым моментом дифференцировки протокового эпителия в эндокринные островковые клетки. По-видимому, данный феномен объясняется тем, что островковая архитектура крайне важна для слаженного осу-



Рис. 3. Структурные изменения монослоя на разных сроках культивирования: а – 12 суток инкубации, $\times 100$; б – 15 суток инкубации, $\times 100$; в – 17 суток инкубации, $\times 100$

ществления функций входящих в состав островка клеток [8].

Сопоставляя данные, полученные нами при изучении монослоя протокового эпителия ПЖ новорожденного кролика и клеточного состава сформированных монослоем трехмерных структур, и учи-

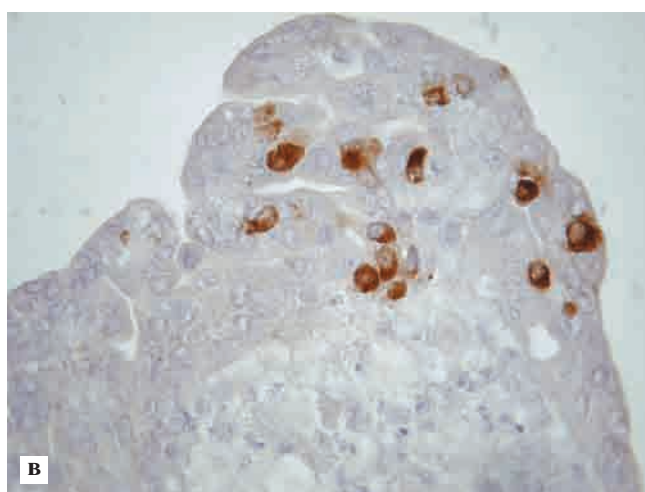
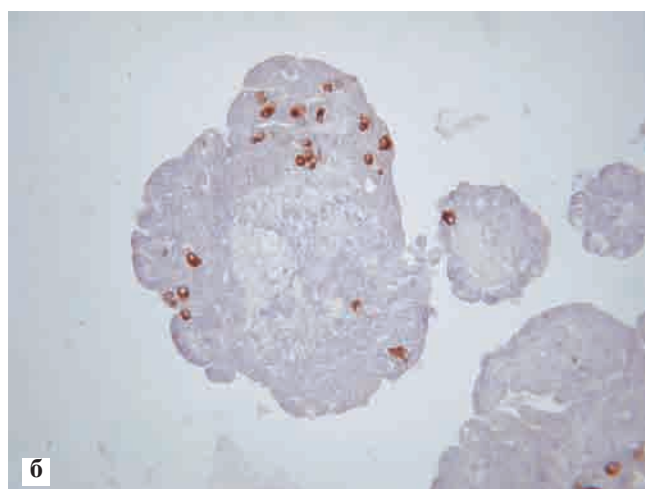
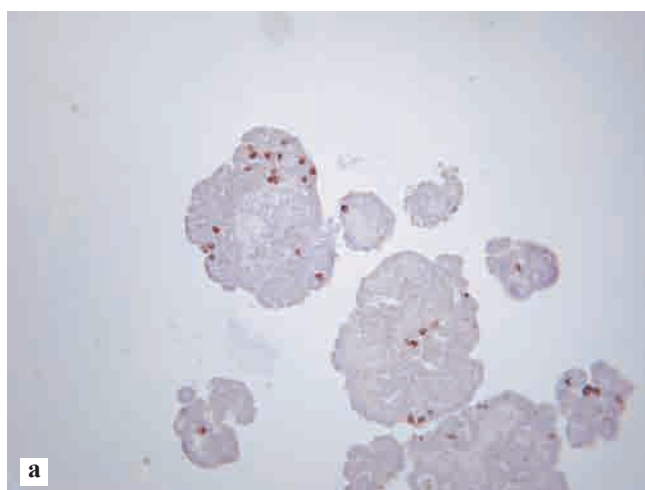


Рис. 4. β -клетки в островкоподобных кластерах. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к инсулину (а – $\times 200$, б – $\times 400$, в – $\times 1000$)

тывая тот факт, что островковые клетки в культивируемом монослое изначально не выявлялись, можно сделать вывод о том, что в процессе структурных изменений происходила дифференцировка протокового эпителия в эндокринные клетки. Исходя из того, что количество клеток в отдельных пластин-

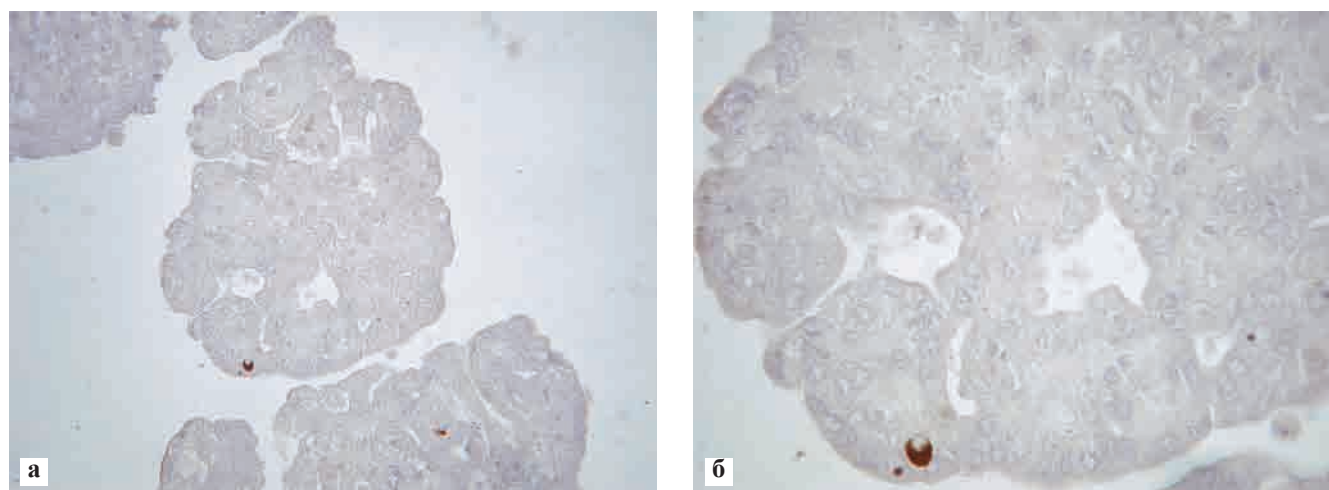


Рис. 5. α -клетки в островкоподобных кластерах. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к глюкагону (а – $\times 400$, б – $\times 1000$).

ках монослоя, как было показано нами ранее [1], достигало нескольких сотен, непосредственно в процесс дифференцировки в описанных нами условиях вовлекается, по-видимому, лишь незначительная часть популяции панкреатических клеток (1–10%). Являются ли именно нестин-позитивные клетки, обнаруживаемые в монослое, предшественниками островковых клеток, пока выяснить не удалось. Нестин-позитивные клетки обнаруживались нами лишь в 20–25% наблюдаемых зон, тогда как специализированные эндокринные клетки выявлялись в большинстве сформированных кластеров. Количество островковых клеток в кластерах и нестин-позитивных клеток в монослое также было несопоставимо. Возможно, неогенез островковых клеток происходит как в результате дифференцировки нестин-позитивных клеток, так и путем трансдифференцировки типичных протоковых клеток [11, 14]. Поскольку мы наблюдали тотальное окрашивание монослоя антителами к цитокератину-19 (все клетки монослоя, в том числе и фибробластоподобные, экспрессировали этот специальный маркер протокового эпителия) и лишь незначительная часть фибробластоподобных клеток была при этом иммунопозитивна к нестину, можно предположить, что нестин-позитивные клетки в нашем случае представляли некую субпопуляцию клеток протокового эпителия. Вопрос о возможной коэкспрессии нестина и цитокератина-19 клетками панкреатического протокового эпителия требует дальнейшего более глубокого изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как показали проведенные нами исследования, культивирование в бессывороточной среде монослоя панкреатических протоковых клеток новорож-

денного кролика приводило к формированию трехмерных островкоподобных кластеров. Иммуногистохимическое исследование выявляло в данных структурах основные типы островковых клеток. Неогенез β - и α -клеток, ранее не распознаваемых в монослое, может быть связан как с дифференцировкой субпопуляции протоковых клеток, экспрессирующих нестин, так и с трансдифференцировкой типичного протокового эпителия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Курсанова Л.А., Баранова Н.В., Скалецкий Н.Н. и др. Поджелудочная железа новорожденных кроликов как источник прогениторных клеток // Вестн. транспл. и искусств. органов. 2011. № 1. С. 61–64.
2. Banerjee M., Bhonde R.R. Islet generation from intra islet precursor cells of diabetic pancreas: *in vitro* studies depicting *in vivo* differentiation // J.O.P. 2003. Vol. 4 (4). P. 137–145.
3. Basta G., Racanicchi L., Mancuso F. et al. Neonatal pig pancreatic duct-derived insulin-producing cells: preliminary *in vitro* studies // Transplant Proc. 2004. Vol. 36 (3). P. 609–611.
4. Bonner-Weir S., Inada A., Yatoh S. et al. Transdifferentiation of pancreatic ductal cells to endocrine beta-cells // Biochem. Soc. Trans. 2008. Vol. 36 (Pt 3). P. 353–356.
5. Dodge R., Loomans C., Sharma A., Bonner-Weir S. Developmental pathways during *in vitro* progression of human islet neogenesis // Differentiation. 2009. Vol. 77 (2). P. 135–147.
6. Gao R., Ustinov J., Pukkinen M.A. et al. Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture // Diabetes. 2003. Vol. 52 (8). P. 2007–2015.
7. Kawakami M., Hirayama A., Tsuchiya K. et al. Promotion of beta-cell differentiation by the alkaloid conophylline in porcine pancreatic endocrine cells // Biomed Pharmacother. 2010. Vol. 64 (3). P. 226–231.

8. Kelly C., Mc Clenaghan N.H., Flatt P.R. Role of islet structure and cellular interactions in the control of insulin secretion // *Landes Bioscience*. 2011. Vol. 3 (2). P. 41–47.
9. Lardon J., Rooman I., Bouwens L. Nestin expression in pancreatic stellate cells and angiogenic endothelial cells // *Histochem. Cell Biol.* 2002. Vol. 117 (6). P. 535–540.
10. Mari-Engler S.S., Correa-Giannella M.L., Labriola L. et al. Co-localization of nestin and insulin and expression of islet cell markers in long-term human pancreatic nestin-positive cell cultures // *J. Endocrinol.* 2004. Vol. 183 (3). P. 455–467.
11. Paris M., Turrel-Cusin C., Plachot C. Ktorza A. Review: Pancreatic b-cell. Neogenesis revisited // *Experimental Diab. Res.* 2004. Vol. 5. P. 111–121.
12. Seo M.K., Sun C.L., Kim J.W. et al. Repeated gene transfection impairs the engraftment of transplanted porcine neonatal pancreatic cells // *Diabetes Metab. J.* 2011. Vol. 35 (1). P. 72–79.
13. Shimoda M., Chen S., Noduchi H. et al. Neurogenic differentiation of cytokeratin 19-positive human pancreatic nonendocrine cells into insulin-producing cells // *Transplant. Proc.* 2010. Vol. 42 (6). P. 2071–2074.
14. Soria B. *In vitro* differentiation of pancreatic beta-cells // *Differentiation*. 2001. Vol. 68 (4–5). P. 205–219.
15. Yao Z.X., Qin M.L., Liu J.J. et al. *In vitro* cultivation of human fetal pancreatic ductal stem cells and their differentiation into insulin-producing cells // *World J. Gastroenterol.* 2004. Vol. 10 (10). P. 1452–1456.
16. Zhang L., Hong T.-P., Hu J. et al. Nestin-positive progenitor cells isolated from human fetal pancreas have phenotypic markers identical to mesenchymal stem cells // *World J. Gastroenterol.* 2005. Vol. 11 (19). P. 2906–2911.
17. Zulewski H. Pancreatic stem cells – a new therapeutic option for the treatment of type1 diabetes mellitus? // *Ther. Umsch.* 2002. Vol. 59 (11). P. 599–602.
18. Zulewski H., Abraham E.J., Gerlach M.J. et al. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes // *Diabetes*. 2001. Vol. 50. № 3. P. 521–533.