

DOI: 10.15825/1995-1191-2016-1-32-37

ВЫЯВЛЕНИЕ ОСТРОВКОВОГО ПОТЕНЦИАЛА ДОНОРСКОЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Н.Н. Скалецкий, Л.А. Кирсанова, Г.Н. Бубенцова, Н.В. Баранова, Г.Н. Скалецкая, В.И. Севастьянов

ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Целью работы было детальное морфологическое исследование донорской поджелудочной железы (ДПЖ) для изучения возможностей максимального получения островковой ткани, подходящей для трансплантации пациенту с сахарным диабетом 1-го типа. **Материалы и методы.** Восемь ПЖ были получены в результате мультиорганного донорского забора. Морфологические исследования проводились с помощью гистологических и специальных иммуногистохимических методов. **Результаты.** Большинство островков было выявлено в хвостовой части ДПЖ. Помимо расположенных интралобулярно типичных островков Лангерганса с преобладанием мозаично расположенных бета-клеток, в междольковых прослойках соединительной ткани выявлены скопления островковых клеток, формирующих так называемые интерлобулярные (перилобулярные) островки. Кроме того, в клетках эпителия протоков ДПЖ был выявлен нестин, который является маркером прогениторных клеток. **Заключение.** Для получения максимального потенциала островковой ткани из ДПЖ необходимо использовать интралобулярно расположенные островки, а также клетки-предшественники поджелудочной железы, которые имеют способность к трансдифференцировке в островковые клетки.

Ключевые слова: донорская поджелудочная железа, морфологические исследования, интерлобулярные островки, прогениторные клетки.

IDENTIFICATION OF ISLET CAPACITY IN DONOR'S PANCREAS USING IMMUNOMORPHOLOGICAL ANALYSIS

N.N. Skaletskiy, L.A. Kirsanova, G.N. Bubentsova, N.V. Baranova, G.N. Skaletskaya, V.I. Sevastianov

V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

The aim of the work was detailed morphological investigations of donor pancreas (DP) for the study of possibilities of maximal selection of islet tissue suitable for transplantation to a patient of diabetes mellitus type 1. **Materials and methods.** Eight DPs were received as a result of multiorgan donation. Morphological investigations were performed by means of histological and special immunohistochemical methods. **Results.** The Majority of islets were revealed in the tail part of the DP. Besides typical Langerhans islets with predominance of mosaicly located beta cells, the accumulations of islet cells forming so-called interlobular (perilobular) islets were revealed in the layers of interlobular connecting tissue. In addition, in the cells of ductal epithelium nestin which is a marker of progenitor cells was revealed. **Conclusion.** To obtain the maximal potential of islet tissue from DP it is necessary to use interlobular located islets as well as to use progenitor cells of pancreas, which have the ability to transdifferentiate into islet cells.

Key words: donor pancreas, immunomorphological investigations, interlobular islets, progenitor cells.

Для корреспонденции: Скалецкий Николай Николаевич. Адрес: 123182, г. Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел.: (499) 190-42-66; 8-903-790-95-39. E-mail: NSkaletsky@mail.ru.

For correspondence: Skaletskiy Nikolay Nikolaevich. Address: 1, Shchukinskaya St., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel.: (499) 190-42-66, 8-903-790-95-39. E-mail: NSkaletsky@mail.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация островков поджелудочной железы (ПЖ) считается наиболее действенным и перспективным направлением в лечении сахарного диабета типа 1, с постепенным улучшением клинических результатов, как следует из данных Международного регистра трансплантации островков [1, 2]. Основным показанием применения этого метода являются резкая лабильность уровня гликемии с развитием тяжелых гипогликемических состояний, а также выраженная резистентность к действию препаратов инсулина. Анализ клинических данных, собранных во всем мире в течение последних 5 лет, подтверждает положительную тенденцию в этой области, с интегрированным управлением ключевых факторов, которыми являются получение адекватного количества островков, совершенствование протоколов иммуносупрессии, применение дополнительной противовоспалительной терапии, оценка аллогенного иммунитета перед пересадкой. Инсулинонезависимость наблюдалась в нескольких клинических испытаниях на различных сроках после трансплантации у 65–100% пациентов; поддержание этого состояния во время последующих наблюдений постепенно уменьшалось, составляя в среднем 44% через 3 года после последней инфузии. Рекордной длительностью посттрансплантационной инсулинонезависимости является 13-летний срок. Непосредственными результатами функционирования трансплантации островков являются устранение гипогликемических состояний и снижение уровня гликозилированного гемоглобина, характеризующего степень компенсации сахарного диабета. Кроме того, многие исследования показали влияние успешной трансплантации островков на хронические осложнения сахарного диабета, такие как периферическая нейропатия, ретинопатия, и макроангиопатии. Однако самое грозное осложнение – диабетическая нефропатия – по-прежнему остается критерием исключения, так как иммуносупрессивная терапия может привести к ухудшению почечной функции. Поэтому проблемы, связанные с неизбежным применением иммуносупрессии при трансплантации островков для лечения сахарного диабета типа 1 должны быть рассмотрены в каждом случае для правильной оценки соотношения риск/польза.

Дефицит донорских органов не позволяет выполнять аллотрансплантации островков ПЖ в значимом количестве, тем более что для проведения эффективной пересадки (с достижением инсулинонезависимости реципиента) требуется последовательное использование в качестве источника островков от 2 до 4 донорских ПЖ. Поэтому актуальны исследования по разработке методических приемов, которые могли бы обеспечить увеличе-

ние массы выделяемых островков и проведение большего числа пересадок при использовании того же количества донорских желез. Из-за постоянной нехватки донорских ПЖ человека проведение необходимого объема морфологических исследований панкреатической ткани с целью определения более рациональных способов получения островковой ткани возможно лишь при использовании ПЖ животных. Поэтому нами для отбора и отработки наиболее информативных общегистологических и иммуногистохимических методов идентификации островковых клеток в качестве доступной донорской модели была использована ПЖ кроликов [3]. В частности, для выявления основных типов островковых клеток применяли специфическое иммуногистохимическое окрашивание, а для выявления протокового эпителия препараты обрабатывали антителами к цитокератину-19, а также антителами к нестину как маркеру прогениторных клеток. Эти морфологические исследования были применены при изучении донорских ПЖ человека как потенциальных источников островков для трансплантации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поджелудочные железы получали в результате мультиорганного забора. Донорами явились трупы 8 человек (7 мужчин и 1 женщина, возраст 18–45 лет, в среднем 38,5 года). Длительность холдовой ишемии органа составила от 6 до 9 часов (в среднем 7 часов 40 минут). Из хвоста каждой ПЖ вырезали по 2 образца, из головки и тела органа – по 1 образцу, каждый размерами 0,5×1×1 см, которые помещали в раствор соответствующего фиксатора.

Образцы донорских ПЖ подвергали морфологическому исследованию с помощью рутинных гистологических и специальных иммуногистохимических методов окрашивания. Материал, зафиксированный в 10%-ном забуференном растворе формалина и частично в жидкости Буэна, обезживали в спиртах восходящей концентрации, хлороформе и заливали в парафин. Срезы толщиной 4–5 мкм получали на микротоме Leica RM 2245 и использовали для дальнейшей обработки.

Для выявления протокового эпителия окрашивание препаратов антителами к цитокератину-19 (Novocastra) осуществляли с использованием Concentrated Peroxidase Detection System (RE 7130-K, Leica Microsystem), следуя инструкции производителя. Предварительно перед окрашиванием депарафинированные срезы подвергали ретривизации инкубацией в 0,1%-ном растворе трипсина при температуре 37°C в течение 40 минут. Идентификацию клеток, экспрессирующих маркер прогениторных клеток нестин (Abcam), в паренхиме железы осуществляли с предварительной ретривизацией антигена кипячением в цитратном буфере в течение 20 минут с последующим охлаждением при комнат-

ной температуре и дальнейшей визуализацией по стандартной методике с пероксидазой хрена. Кроме того, используя антитела к инсулину и глюкагону (Cell Marque), проводили окрашивание основных типов эндокринных клеток островков Лангерганса. При этом использовали систему визуализации Reveal-Biotin-Free Polyvalent DAB (Spring).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Иммуноморфологическое исследование препаратов образцов донорской поджелудочной железы выявило преимущественное расположение островковой ткани в хвостовой части ПЖ (рис. 1). Интрапаренхиматозно расположенные островки Лангерганса имели, как правило, округлую и реже неправильную вытянутую форму и демонстрировали классическую картину распределения основных

типов инсулоцитов [4]. В островках преобладали мозаично расположенные инсулинпозитивные бета-клетки (рис. 2, а). Глюкагонпозитивные аль-

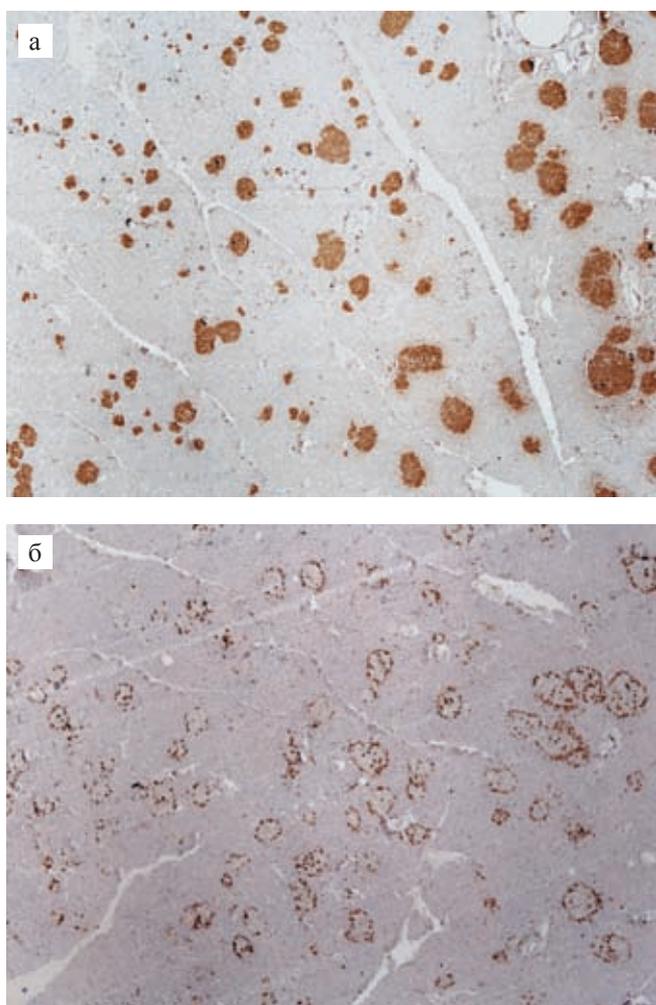


Рис. 1. Островки Лангерганса в хвостовой части донорской поджелудочной железы. Иммуногистохимическое окрашивание β -клеток антителами к инсулину (а) и α -клеток – к глюкагону (б). $\times 40$

Fig. 1. Islets of Langerhans in the tail part of donor pancreas. Immunohistochemical staining of β -cells with insulin antibodies (a) and α -cells with glucagon antibodies (б). $\times 40$

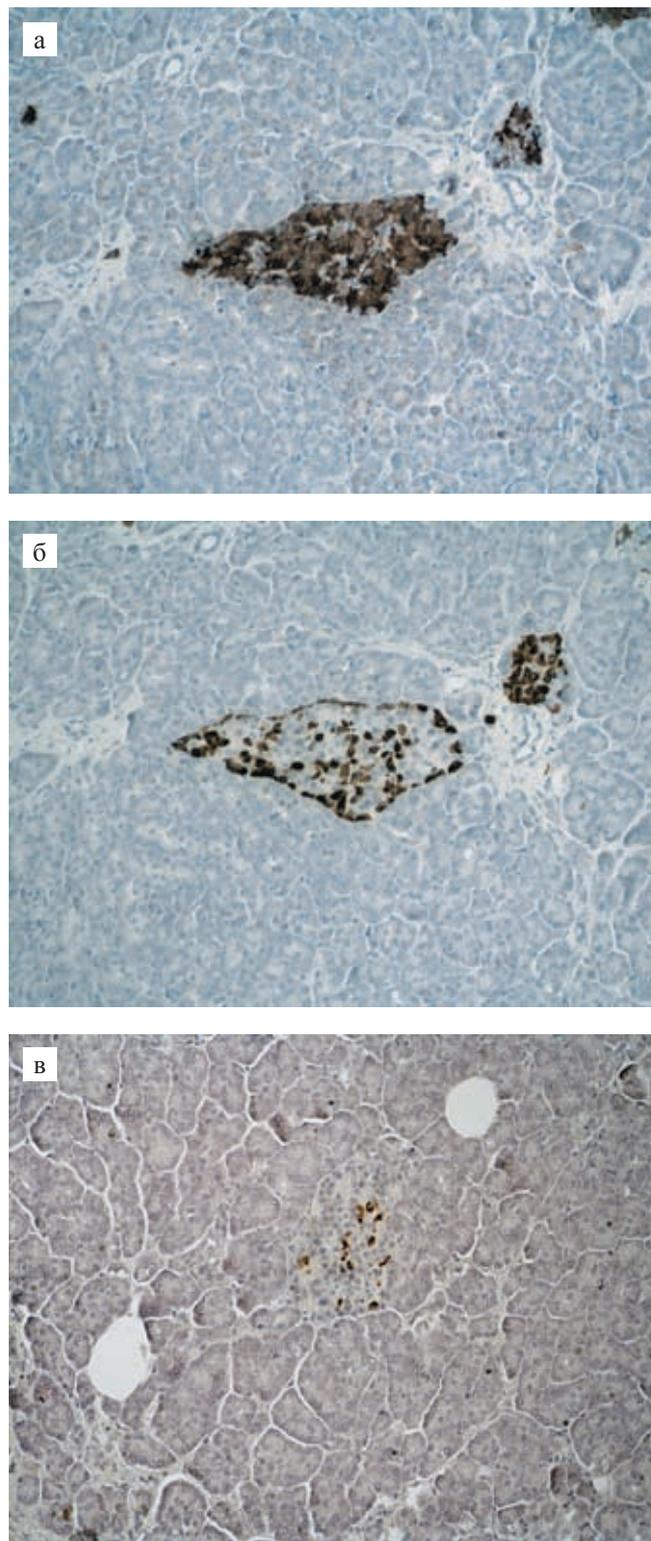


Рис. 2. Интралобулярные островки Лангерганса. Инсулинпозитивные (а), глюкагонпозитивные (б), соматостатинпозитивные (в) клетки. $\times 200$

Fig. 2. Intralobular islets of Langerhans. Insulin-positive (a), glucagon-positive (б) and somatostatin-positive (в) cells. $\times 200$

фа-клетки обнаруживались как на периферии островков, так и в центральной их части (рис. 2, б). Редкие соматостатин-позитивные дельта-клетки распределялись в островках без четкой локализации (рис. 2, в). Кроме описанных выше типичных

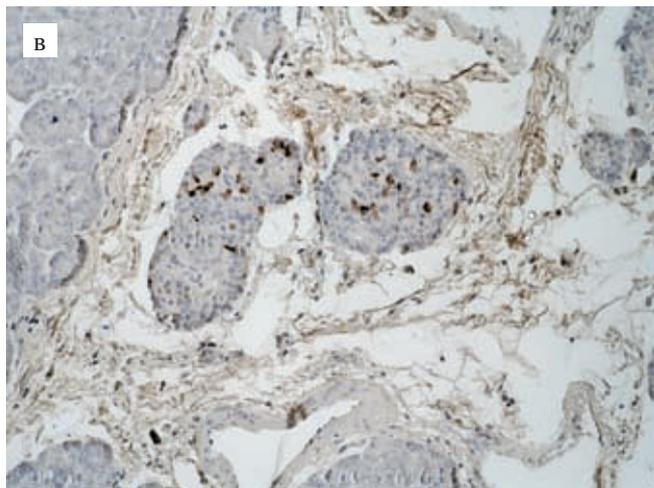
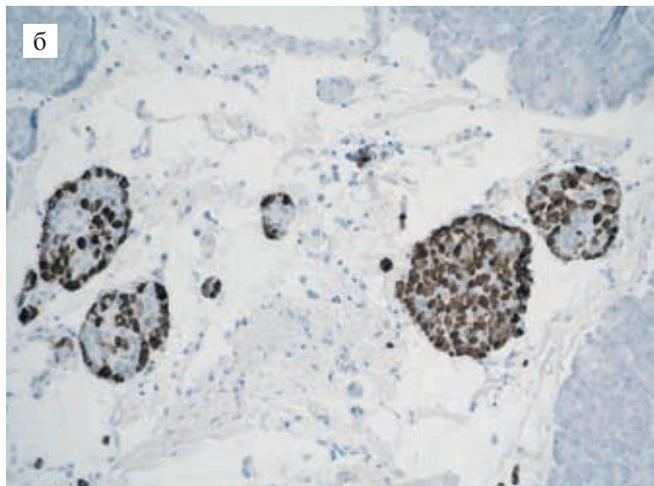
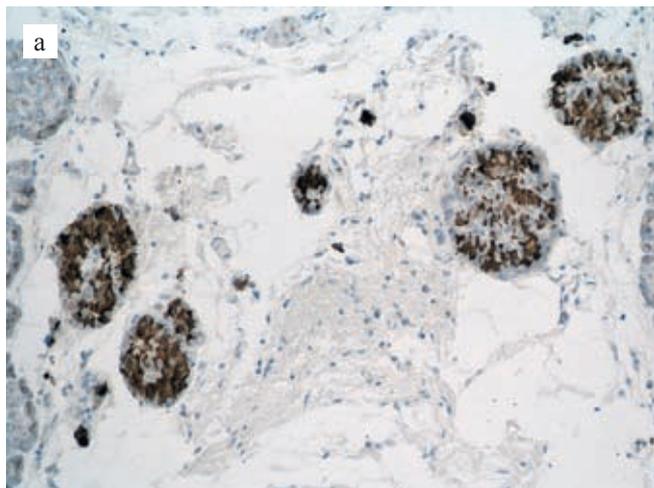


Рис. 3. Интерлобулярные островки. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к инсулину (а), глюкагону (б), соматостатину (в). $\times 200$

Fig. 3. Interlobular islets. Insulin-positive (a), glucagon-positive (б) and somatostatin-positive (в) cells. $\times 200$

островков Лангерганса в междольковых прослойках рыхлой соединительной ткани обнаруживались сферической формы клеточные скопления, демонстрировавшие характерное окрашивание на инсулин, глюкагон и соматостатин (рис. 3). Скорее всего, они представляют собой так называемые интерлобулярные (перилобулярные) островки, выявляемые как раз между дольками ПЖ. Отличительной чертой таких островков являются прежде всего их топографические характеристики, тогда как клеточный состав и локализация инсулоцитов практически не отличаются от таковых в островках Лангерганса. Интерлобулярные островки описаны у некоторых видов животных [5], однако их функциональная значимость и происхождение остаются неясными. Как известно, эпителий мелких выводных протоков рассматривается как основной источник региональных прогениторных клеток. Проведенное иммуногистохимическое окрашивание антителами к цитокератину-19, обычно выявляемому в клетках протокового эпителия [6], оказывалось позитивным в клетках протоков донорской ПЖ разного калибра и демонстрировало их мощную разветвленную трубчатую сеть (рис. 4). Экспрессия нестина, являющегося маркером прогениторных клеток [7–9], наблюдалась в разбросанных в паренхиме железы одиночных клетках и реже – в группах, состоящих из 3–4 клеток (рис. 5). Как правило, эти клетки были локализованы в области мелких выводных протоков, а также в ацинусах (вероятно, в составе вставочного отдела протока). При этом непосредственно в островках нестин-позитивные клетки не обнаруживались.

Следующим этапом наших исследований будет разработка наиболее рационального и продуктив-

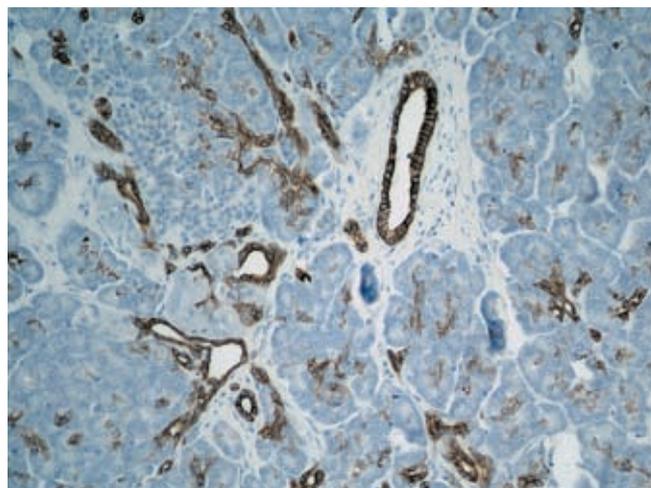


Рис. 4. Позитивное окрашивание антителами к цитокератину-19 в клетках протокового эпителия донорской поджелудочной железы. $\times 200$

Fig. 4. Positive staining by antibodies to cytokeratin-19 in ductal epithelial cells of the donor pancreas. $\times 200$

ного метода выделения островков из донорской ПЖ. Как известно, островковая ткань составляет лишь около 2% от общей массы ПЖ, поэтому ее выделение (изоляция) является крайне сложной задачей. Существующие методы изоляции островков представляют собой целый набор последовательно осуществляемых процедур, основными из которых являются перфузия панкреатических протоков ферментом коллагеназного действия (обычно это либереза для человеческих островков) с целью диссоциации панкреатической ткани и последующее очищение островков от экзокринной ткани путем центрифугирования с использованием непрерывных градиентов фиколла [10]. Для того чтобы минимизировать риск повреждающего действия холодной ишемии, трансплантируют чаще всего свежеприготовленные островки сразу после их сбора, исключая таким образом возможность их культивирования. Однако несмотря на все предосторожности, в процессе изоляции островков возможна существенная потеря их количества, а также происходит снижение функциональных способностей пересаживаемых бета-клеток. Поэтому для достижения инсулинонезависимости у реципиентов с сахарным диабетом 1-го типа требуется использование, как правило, двух и более донорских ПЖ. При этом в изолированных указанным образом островках содержатся клетки эндотелия, лейкоциты, которые способны инициировать иммунную реакцию реципиента, что делает необходимым применение иммуносупрессивной терапии. Последняя, оказывая токсическое действие на бета-клетки пересаженных островков, в свою очередь, способствует снижению антидиабетического эффекта проводимых трансплантаций. В связи с этим целесообразно, по нашему мнению, после деликатной ферментной диссоциации измельченной донорской ПЖ проводить достаточно длительное ее культивирование с целью максимально возможного устранения экзокринных клеток и избавления от эндотелиоцитов, лейкоцитов и других иммуногенных клеток. Это предположительно устранил или максимально уменьшит необходимость проведения посттрансплантационной иммуносупрессии реципиентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное иммуноморфологическое исследование донорских ПЖ человека подтвердило преимущественное расположение островковой ткани в хвостовой части органа. При этом помимо типичных островков Лангерганса, разбросанных в паренхиме ПЖ, между дольками были выявлены группы островковоподобных структур, также состоящих из бета-, альфа- и дельта-клеток – интерлобулярные островки, которые могут рассматриваться как дополнительный источник эндокрин-

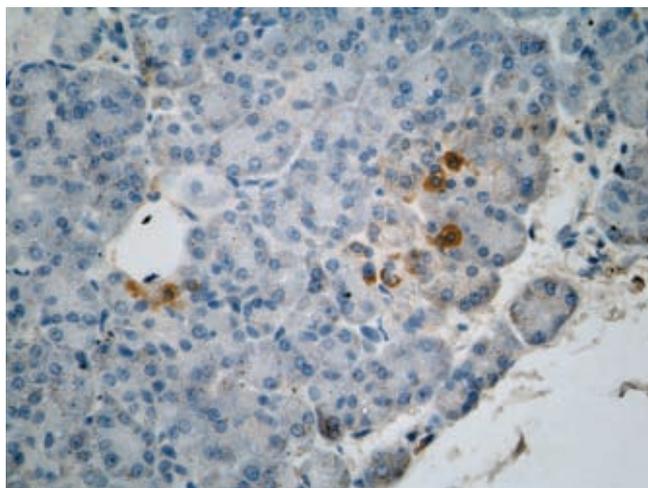


Рис. 5. Нестин-позитивные клетки в составе мелких выводящих протоков донорской поджелудочной железы. ×400

Fig. 5. Nestin-positive cells in the part of the small excretory ducts of the donor pancreas. ×400

ной ткани. Можно также сделать вывод о том, что популяция клеток, экспрессирующих нестин, связана именно с протоковым эпителием и представляет собой резервный пул клеток-предшественников, сохраняющихся в онтогенезе, и способных стать потенциальным источником островковых клеток.

Работа выполнена при поддержке государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (от 28.01.2015 г. ч. 1, раздел 1) «Разработка и экспериментальное исследование тканеинженерной конструкции поджелудочной железы человека; № гос. регистрации 115102010015.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Barton FB, Rickels MR, Alejandro R, Hering BJ, Wease S, Naziruddin B et al. Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999–2010. *Diabetes Care*. 2012 Jul; 35 (7): 1436–1445. doi: 10.2337/dc12-0063.
2. Balamurugan AN, Naziruddin B, Lockridge A, Tiwari M, Loganathan G, Takita M et al. Islet product characteristics and factors related to successful human islet transplantation from the Collaborative Islet Transplant Registry (CITR) 1999–2010. *Am J Transplant*. 2014 Nov; 14 (11): 2595–2606. doi: 10.1111/ajt.12872. Epub 2014 Oct 2.
3. Скалецкий НН, Кирсанова ЛА, Севастьянов ВИ. Разработка и экспериментальное исследование тканеинженерных конструкций поджелудочной железы из культур островковых клеток поджелудочной железы и биodeградируемых носителей с целью стимуляции регенерации β-клеток у больных сахарным диабетом. *Трансплантология: итоги и перспективы*. 2013; V: 140–152. Skaletskiy NN, Kirsanova LA, Sevastyanov VI. Development and experimental research cell-engineer-

- ring constructs from cultures of pancreatic islet cells and biodegradable scaffolds in order to stimulate the regeneration of β -cells in patients with diabetes. *Transplantation: results and prospects*. 2013; V: 140–152.
4. Тимофеев АВ. Клеточно-популяционная организация поджелудочной железы и применение клеточных технологий в лечении сахарного диабета. *Биология стволовых клеток и клеточные технологии*. 2009; 2: 253–310. Тимофеев АВ. A cell-population structure of the pancreas and the use of cellular technology in the treatment of diabetes. *Stem cell biology and cellular technologies*. 2009; 2: 253–310.
 5. Merkwitz C, Blaschuk OW, Schulz A. The ductal origin of structural and functional heterogeneity between pancreatic islets. *Prog. Histochem. Cytochem*. 2013 Oct; 48 (3): 103–140. DOI: 10.1016/j.proghi. 2013.09.001. PMID: 24100070.
 6. Shimoda M, Chen S, Noduchi H, Matsumoto S, Grayburn PA. Neurogenic differentiation of cytokeratin-19-positive human pancreatic nonendocrine cells into insulin-producing cells. *Transplantation Proceedings*. 2010; 42 (6): 2071–2074. DOI: 10.1016/j.transproceed. 2010.05.114. PMID: 20692411.
 7. Lardon J, Rومان I, Bouwens L. Nestin expression in pancreatic stellate cells and angiogenic endothelial cells. *Histochem. Cell Biol*. 2002; 117 (6): 535–540. PMID: 12107504.
 8. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PhB, Moritz W, Muller B. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate *ex vivo* into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes*. 2001; 50 (3): 521–533. PMID: 11246871.
 9. Mari-Engler SS, Correa-Giannella ML, Labriola L, Krogh K, Colin C. Co-localization of nestin and insulin and expression of islet cell markers in long-term human pancreatic nestin-positive cell cultures. *J Endocrinol*. 2004; 183 (3): 455–467. PMID: 15590972.
 10. Fiorina P, Shapiro AMJ, Ricordi C, Secchi A. The clinical impact of islet transplantation. *Am J of Transplantation*. 2008; 8 (8): 1990–1997. DOI: 10.1111/j.1600-6143. 2008.02353.x. PMID: 18828765.

Статья поступила в редакцию 11.11.2015 г.
The article was submitted to the journal on 11.11.2015