

ПОДЖЕЛУДОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА НОВОРОЖДЕННЫХ КРОЛИКОВ КАК ИСТОЧНИК ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК

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

ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ, Москва

Поджелудочная железа новорожденных кроликов была использована в качестве источника получения протоковых клеток. Эти клетки, обладая свойствами прогениторных, сохраняют способность к дифференцировке *in vivo* и *in vitro* и могут служить дополнительным альтернативным источником островковых клеток для трансплантации больным сахарным диабетом. Наш метод основан на культивировании микрофрагментов панкреатической ткани без предварительного выделения островков и отдельных протоков. В стандартных условиях путем подбора режима культивирования удалось получить стабильное формирование монослоя протокового эпителия, клетки которого активно экспрессировали специфический маркер цитокератин 19.

Ключевые слова: поджелудочная железа, культивирование, монослой протокового эпителия

THE PANCREAS OF NEWBORN RABBITS AS A SOURCE OF PROGENITOR CELLS

Kirsanova L.A., Baranova N.V., Skaletsky N.N., Zaidenov V.A., Bubentsova G.N., Pushkova I.A.
Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

The newborn rabbit pancreas was used as a source of ductal epithelial cells. Our approach includes the cultivation of pancreatic tissue microfragments without preliminary islet and duct isolation. Under ordinary conditions we found the epithelial pancreatic cell monolayer. The cultivated monolayer cells were shown by immunofluorescence to express special ductal cytokeratin 19 and were insulin- and glucagon-negative for 7–15 days.

Key words: rabbit pancreas, ductal cell monolayer, progenitor cells

Наиболее перспективным направлением в обеспечении оптимального глюкозного метаболизма у больных сахарным диабетом 1-го типа становится в последние годы аллотрансплантация островков поджелудочной железы, которая во многих случаях способна привести к длительной инсулинонезависимости реципиентов [14]. Однако ежегодно удается выполнить лишь несколько десятков таких операций, так как островки для трансплантации получают из крайне ограниченного источника – поджелудочной железы трупных доноров [5, 6, 8]. Одним из возможных альтернативных источников островков (островковых клеток) могут служить прогениторные клетки, изначально содержащиеся в донорской

поджелудочной железе. Эти клетки способны пролиферировать и в определенных условиях дифференцироваться с образованием островковых клеток [2, 6, 8, 13]. Известно, что у человека и животных в эмбриональном периоде источником всех клеточных типов паренхимы поджелудочной железы является эпителий примитивных трубочек [10, 11]. В постнатальном периоде как у новорожденных, так и у взрослых особей, прогениторные клетки, являющиеся предшественниками панкреатических паренхиматозных клеток, обнаруживаются в эпителиальной выстилке мелких выводных протоков [2, 5, 13]. Достоверно визуализировать этот клеточный тип удается с помощью иммуногистохимических мето-

Статья поступила в редакцию 25.11.10 г.

Контакты: Зайденов Владимир Анатольевич, старший научный сотрудник лаборатории трансплантационной иммунологии.
Тел. 8-906-760-50-18, e-mail: zaidenov@gmail.com

дов, в частности, по экспрессии антигена цитокератина 19 (у крыс – цитокератина 20), являющегося маркером протокового эпителия [1, 2, 5, 7, 13].

Потенциальная способность протокового эпителия к дифференцировке в условиях *in vitro* и *in vivo* описана при изучении панкреатической ткани человека и некоторых видов животных – мыши, крысы, морской свинки, собаки, овцы, быка [4, 6, 8, 9, 15]. Наше внимание было сосредоточено на возможности получения клеток протокового эпителия с помощью культивирования ткани поджелудочной железы новорожденных кроликов. Обладая прогениторными свойствами, полученные клетки могут дифференцироваться (как *in vitro*, так и *in vivo*) в островковые клетки и использоваться в качестве дополнительного трансплантационного материала при лечении сахарного диабета

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поджелудочную железу ($n = 40$) новорожденных кроликов 1–2-дневного возраста (средняя масса железы – 12,5 мг) обрабатывали, используя оригинальную методику [3], адаптированную к особенностям гистологической структуры органа на данном этапе онтогенеза и с некоторыми модификациями, продиктованными задачами исследования. Полученные микрофрагменты панкреатической ткани помещали в культуральные флаконы (фирма Corning-Costar), в которые вносили соответствующие объемы ростовой среды (среда 199, эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота) с антибиотиками (гентамицин, 40 мкг/мл). Часть материала, используемого в дальнейшем для иммунофлуоресцентного изучения, засеивали в чашки Петри. Культивирование проводили в стандартных условиях при 37 °С в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Смену культуральной среды осуществляли через каждые 3–4 дня. Концентрацию сыворотки в ростовой среде изменяли согласно следующей схеме: 1–7-е сутки инкубации – 3,5%; 7–10-е сутки – 2% и 10–15-е сутки – 0%.

На определенных сроках инкубации (10, 15 дней) материал фиксировали для последующего морфологического и иммунофлуоресцентного изучения. Количественную оценку полученных культур проводили, подсчитывая окрашенные гематоксилином клетки монослоя, полученного из 18 желез, в трех культуральных флаконах в инвертированном микроскопе «Биолам П2-1» с объективом $\times 20$ (увеличение $\times 200$). Обработку данных проводили с вычислением *t*-критерия Стьюдента.

Иммунофлуоресцентное исследование проводили с помощью люминесцентного микроскопа «Nikon eclipse 50i», оснащенного цифровой фотокамерой. Для выявления цитокератина 18 и цитокератина 19 культуры фиксировали охлажденным до –20 °С метанолом в течение 10 минут. Для определения инсулина и глюкагона использовали фиксацию 5%-ным формалином в течение 20 минут при комнатной температуре. Цитокератин 18 в клетках определяли прямым методом, используя моноклональные антитела, меченные FITC (anti-cytokeratin peptide-18, Sigma). Цитокератин 19, инсулин и глюкагон выявляли непрямым методом, используя соответствующие моноклональные антитела: anti-cytokeratin-19 (Novocastra), anti-insulin (Sigma) и anti-glucagon (Sigma). В качестве вторых антител использовали моноклональные антимышинные антитела, меченные FITC (Sigma).

Результаты и обсуждение

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате использованного нами методического подхода панкреатическая ткань была диссоциирована на микрофрагменты размерами не более 500 мкм. После помещения в ростовую среду около 2/3 полученных панкреатических микрофрагментов оседало на дно культуральных флаконов, тогда как меньшая часть оставалась во взвешенном состоянии и при смене культуральной среды удалялась. Прижизненное наблюдение исследуемых культур в инвертированном микроскопе показало, что на 7-е сутки инкубации вокруг многочисленных эксплантатов появлялась однослойная зона роста, представленная клетками со светлой цитоплазмой и округлой формы ядрами, содержащими 1–2 ядрышка. В последующие дни экспансивный рост приводил к формированию монослоя с четкой демаркационной линией и практически без периферической контаминации фибробластоподобными клетками (рис.1). Расширение зоны роста наблюдалось до 10–12 суток культивирования,

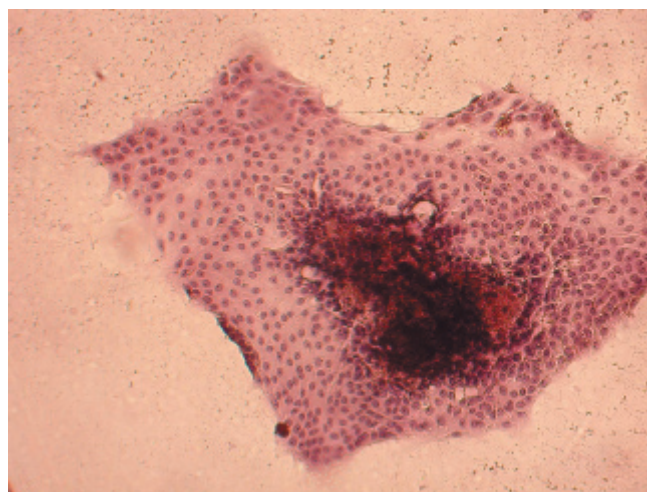


Рис. 1. 10-дневная культура клеток, полученная из поджелудочной железы новорожденных кроликов (гематоксилин, $\times 200$)

после чего происходила стабилизация размеров монослоя, и количество клеток, его формирующих, существенно не менялось. Мы наблюдали зоны роста, численность клеток в которых значительно варьировалась – от 10–20 до нескольких сотен. Такую вариабельность можно объяснить как различиями в исходных размерах эксплантатов (в отдельных случаях слиянием 2–3 очагов прикрепления), так и изначальной массой пролиферирующих клеток в их составе.

Количественная оценка 15-дневных культур, полученных из 18 поджелудочных желез новорожденных кроликов, была проведена путем подсчета зон роста и определения числа клеток, их составляющих (табл. 1). Расчеты показали, что из одной поджелудочной железы новорожденного кролика может быть получено в среднем 5603 ± 13 эпителиальных клеток, формирующих монослой.

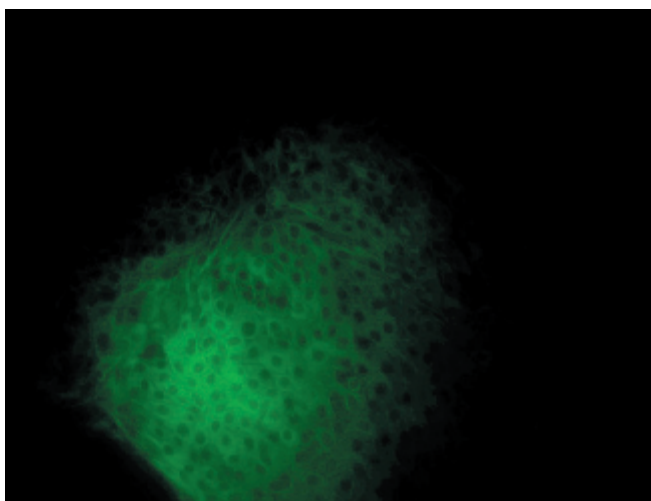


Рис. 2. Культура клеток, полученная из поджелудочной железы новорожденных кроликов. Окрашивание антителами к цитокератину 18. Метод прямой иммунофлуоресценции, $\times 200$

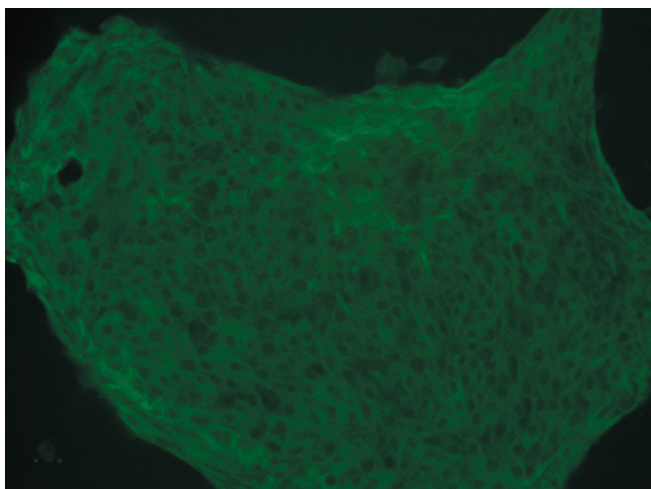


Рис. 3. Монослой, 10 суток инкубации. Экспрессия цитокератина 19. Метод непрямой иммунофлуоресценции, $\times 200$

Иммуногистохимическое исследование культур на 10-е сутки инкубации показало, что подавляющее большинство клеток, формирующих монослой (свыше 90%), интенсивно окрашивалось антителами к цитокератину 18, что характерно для эпителия энтодермального происхождения (рис. 2). Кроме того, эти клетки активно экспрессировали специфический маркер протокового эпителия – цитокератин 19 (рис. 3). При этом в клетках наблюдалось тонкофибрилярное иммунофлуоресцентное свечение (рис. 4). Окрашивание антителами к инсулину не выявляло иммунопозитивных клеток в монослое. Реакция клеток на антитела к глюкагону была негативной.

Таким образом, на основании полученных данных мы определили, что основным клеточным типом, формирующим монослой, является панкреатический протоковый эпителий.

Таблица 1

Определение количества прогениторных клеток, полученных из поджелудочной железы 18 новорожденных кроликов

Параметры	Малые зоны (<600 кл.)	Средние зоны (200–600 кл.)	Большие зоны (>600 кл.)	Σ
Количество зон роста, ед.	79	114	54	247
Количество клеток в зонах, ед.	7387	41867	51599	100853
Среднее количество клеток в 1 зоне роста, ед.	$93,51 \pm 7,75$	$367,25 \pm 13,11$	$955,54 \pm 54,19$	$408,31 \pm 13,34$

Примечание. * $p < 0,05$ – по сравнению с исходными значениями.

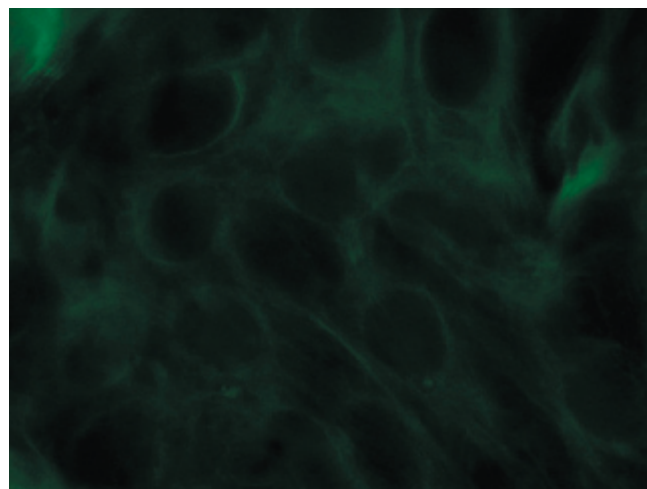


Рис. 4. Окрашивание антителами к цитокератину 19, $\times 1000$

В течение всего срока наблюдения (до 15 суток) в монослое сохранялись специфические антигенные характеристики клеток, что подтверждалось стабильностью специфического для цитокератинов флуоресцентного свечения (рис. 5), и негативная реакция клеток на антитела к инсулину и глюкагону.

Отсутствие видимой дифференцировки прогениторных клеток (эпителий панкреатических протоков) в более зрелые клеточные формы, возможно, объясняется тем, что культивирование проводилось в стандартных условиях без использования специфических факторов роста и дифференцировки (exendin 4, INGAP-PP, EGF) и специальной подложки (Matrigel, миллипоровая мембрана, коллаген I, IV типа и т. п.), факторов, которые модулируют рост дуктального эпителия *in vitro* и, по мнению ряда авторов [4, 5, 9, 12, 13, 15], способствуют островковому неогенезу.

Обычно для получения протокового эпителия проводится культивирование предварительно выделенных из поджелудочной железы фрагментов протоков или же используется переваренная панкреатическая ткань, оставшаяся после выделения островков Лангерганса [5, 6, 9, 13, 15]. Особенности гистологической структуры поджелудочной железы новорожденного кролика определяют нецелесообразность попыток изоляции островков или выделения отдельных протоков [3]. Путем подбора режима культивирования микрофрагментов панкреатической ткани нам удалось получить стабильное формирование монослоя протокового эпителия. Возможно, этому благоприятствовал тот факт, что ткань неонатальной поджелудочной железы обладает определенными преимуществами по сравнению с железой взрослых особей, а именно – большей устойчивостью к ишемии и более высокой пролиферативной активностью [2].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные культуры, состоящие из прогениторных клеток поджелудочной железы, могут быть использованы в качестве модели для изучения панкреатического протокового эпителия как предшественника различных видов островковых клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белецкая Л.В., Махнева Н.В. Меченые антитела в нормальной и патологической морфологии. М., 2000. С. 11.
2. Казанцева И.А., Гуревич Л.Е. Роль полипотентных клеток в развитии опухолей поджелудочной железы // Архив патологии. 2006. Т. 68. № 2. С. 51–56.
3. Скалецкий Н.Н., Кирсанова Л.А., Блюмкин В.Н. Получение культур островковых клеток из поджелудочной железы и их трансплантация // Проблемы трансплантологии и искусственных органов. М., 1994. С. 73–80.

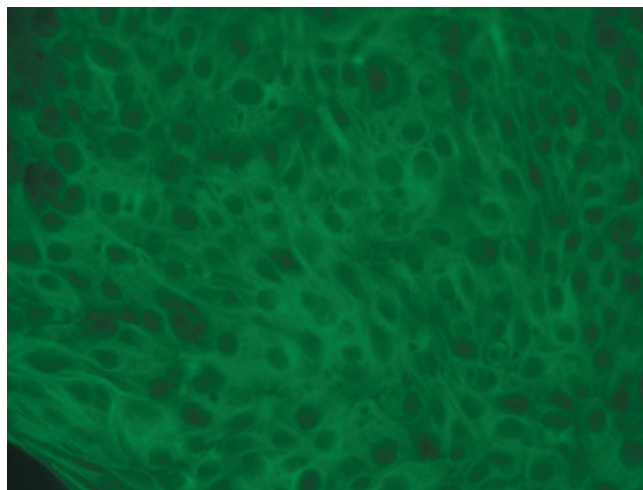


Рис. 5. 15-сут. культура протокового эпителия. Окрашивание антителами к цитокератину19, ×400

4. *Bhattacharyya E., Panchal A., Wilkins T.J. et al.* Insulin, transforming growth factors, and substrates modulate growth of guinea pig pancreatic duct cells in vitro // *Gastroenterology*. 1995. Vol. 109, № 3. P. 944–952.
5. *Bonner-Weir S., Tanega M., Weir G.S. et al.* In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. Vol. 97, № 14. P. 7999–8004.
6. *Bonner-Weir S., Sharma A.* Are the pancreatic progenitor cells from which new islets form after birth? // *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 2006. Vol. 2, № 5. P. 240–241.
7. *Bouwens L.* Cytokeratins and differentiation in the pancreas // *J. Pathol.* 1998. Vol. 184, № 3. P. 234–239.
8. *Cole L., Anderson M., Antin P.B. et al.* One process for pancreatic beta-cell coalescence into islets involves an epithelial-mesenchymal transition // *J. Endocrinol.* 2009. Vol. 203, № 1. P. 19–31.
9. *Cotton C.U., al-Nakkash L.* Isolation and culture of bovine pancreatic duct epithelial cells // *Am. J. Physiol.* 1997. Vol. 272, № 6 (Pt. 1) P. 1328–1337.
10. *Gittes G.K.* Developmental biology of pancreas: comprehensive review // *Dev. Biol.* 2009. Vol. 326, № 1. P. 4–35.
11. *Hick A.-Ch., van Eyll J.M., Cordi S. et al.* Mechanism of primitive duct formation in the pancreas and submandibular glands: a role for SDF-1 // *BMC Dev. Biol.* 2009. Vol. 14, № 9. P. 66.
12. *Hyder A., Laue Ch. and Schrezenmeir J.* Variable responses of islet cells of different ages and species to hypoxia // *Transplant.Proc.* 1998. Vol. 30, № 2. P. 578–580.
13. *Li J., Wang Y., Yu X. et al.* Islet neogenesis-associated protein-related pentadecapeptide enhances the differentiation of islet-like clusters from human pancreatic duct cells // *Peptides*. 2009. Vol. 30, № 12. P. 2242–2249.
14. *Shapiro A.M.J., Ricordi C., Hering B.J. et al.* International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation // *N. Eng. J. Med.* 2006. Vol. 355, № 13. P. 1318–1330.
15. *Zhang M., Schleicher R.L., Fink A.S. et al.* Growth and function of isolated canine pancreatic ductal cells // *Pancreas*. 2000. Vol. 20, № 1. P. 67–76.