

М.С. Калигин, А.А. Гумерова, М.А. Титова, Д.И. Андреева, Э.И. Шарипова и А.П. Киясов

## C-kit — МАРКЕР СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЭНДОКРИНОЦИТОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

Кафедра нормальной анатомии (зав. — проф. А.П. Киясов), Казанский государственный медицинский университет, e-mail: mfkaligin@mail.ru

Цель исследования — анализ экспрессии одного из маркеров прогениторных клеток различных клеточных типов CD117, или C-kit, в ходе пренатального развития поджелудочной железы (ПЖ) человека. Исследование проведено на ПЖ человека с 4-й до 28-й недели внутриутробного развития и в возрасте до 2 мес после рождения. На гистологических срезах были проведены иммуногистохимические реакции с антителами к C-kit, инсулину, глюкагону. Для выявления мРНК проинсулина была проведена реакция гибридизации *in situ*. Первые клетки, экспрессирующие C-kit, были обнаружены на 8,5-й неделе развития в эпителии протоков. В 11,5 нед развития эти клетки обособлялись от эпителия протоков и начинали формировать островки. С 8,5 нед C-kit-позитивные клетки начинали экспрессировать глюкагон и мРНК проинсулина, а с 11,5 нед — инсулин. C-kit-позитивные клетки островков, одновременно экспрессирующие глюкагон и инсулин, обнаруживали и после рождения. C-kit-позитивные клетки-предшественники эндокриноцитов являются общими для А- и В-клеток островков ПЖ и сохраняются в островках после рождения.

**Ключевые слова:** поджелудочная железа, островок, эндокриноцит, клетка-предшественник, C-kit

До недавнего времени считалось, что эндокриноциты поджелудочной железы (ПЖ) не обновляются и не регенерируют. Однако V.K. Ramiya и соавт. впервые *in vitro* показали образование эндокриноцитов, экспрессирующих глюкагон и инсулин, из полипотентных прогениторных стволовых клеток эпителия протоков поджелудочной железы у мышей NOD/Uf [17].

Основная проблема изучения клеток-предшественников эндокриноцитов связана с отсутствием стойких фенотипических признаков, или маркеров, которые позволяют их идентифицировать. Имеются сообщения, что клетки-предшественники эндокриноцитов можно идентифицировать с помощью рецептора фактора роста гепатоцитов (HGF) — C-met [16], белков промежуточных филаментов — нестина (маркер нейральных клеток-предшественников) [22] или цитокератина 19 (маркер эпителиальных клеток протоков) [9].

Клетки-предшественники ряда органов и тканей являются мишенями для фактора стволовых клеток (Stem Cell Factor — SCF) и экспрессируют рецептор C-kit.

C-kit — трансмембранный рецептор белка тирозинкиназы (receptor protein tyrosine kinase — RPTK), который кодируется доминантной аллелью у грызунов *white-spotting* (*w*), располагающейся на 5-й хромосоме [3]; человеческий гомолог расположен на 4-й хромосоме (4 qll-12) [4]. Данный рецептор называется также CD117, рецептор фактора стволовых клеток (Stem Cell Factor Receptor — SCF-R), Kit/SCF-R, рецеп-

тор фактора роста тучных клеток — Mast Cell Growth Factor (MGF) Receptor. Связывание SCF с C-kit ведет к димеризации рецептора, за которой следует повышение внутриклеточной активности [2]. Считается, что димеризация наступает в результате связывания одной молекулы SCF с двумя рецепторными мономерами C-kit [14]. Взаимодействие SCF/C-kit запускает цепь внутриклеточных реакций, что приводит к активации множества процессов, включая увеличение транскрипции генов, быстрый рост и дифференцировку клеток-предшественников, например, гемопоэтических [11].

Показано, что мРНК C-kit экспрессируется в клетках эпителия протоков ПЖ эмбрионов крысы на 13-е сутки развития, а также в островках ПЖ у взрослых особей [7, 12]. C-kit-позитивные клетки ПЖ крысы были низкодифференцированными и имели слабую экспрессию маркеров зрелых клеток [18]. Высказано предположение, что C-kit участвует не только в процессах развития, но и необходим для функциональной активности В-клеток островков ПЖ у крысы [17].

Что же собой представляют C-kit-позитивные клетки ПЖ, и существуют ли они у человека или характерны только для крысы? Точно ответить на этот вопрос сложно, поскольку до сих пор неизвестны ни источники развития, ни сроки появления C-kit-позитивных клеток в ПЖ человека, а также этапы их дальнейшей дифференцировки в ходе онтогенеза. Одним из методических подходов, позволяющих установить, что собой представляют C-kit-позитивные клетки взрослого

организма, является изучение экспрессии этого маркера в клетках в ходе пренатального развития человека. Целью данного исследования было изучение динамики экспрессии C-kit и закономерностей дифференцировки C-kit-позитивных клеток с помощью специфических маркеров в процессе органогенеза, чтобы установить их происхождение, возможные этапы дифференцировки и функциональное значение для ПЖ.

**Материал и методы.** Исследование проведено на эмбрионах и плодах человека, полученных в ходе самопроизвольных выкидышей или легальных медицинских аборт, а также аутопсийном материале ПЖ детей с добровольного согласия пациенток городской клинической больницы № 13 г. Казани и ГМУ «Детская республиканская клиническая больница» МЗ РТ. Проведение исследования одобрено Республиканским комитетом по этическим вопросам при проведении клинических испытаний-исследований лекарственных средств при Министерстве здравоохранения Республики Татарстан. Сроки беременности и количество исследованных образцов ПЖ, полученных от эмбрионов, плодов и детей, следующие: 4, 5 и 5,5–6 нед (по 2 образца); 6,5 и 7 нед (по 2 образца); 8 нед (1 образец); 8,5 нед (2 образца); 11,5 нед (2 образца); 12,5, 15 нед (по 2 комплекса органов); 20 нед (3 комплекса органов); 23 нед (3 комплекса органов); 25 нед (3 комплекса органов); 26–27 нед (1 комплекс органов); 17 сут, 1 мес 24 сут и 2 мес после рождения (по 1 образцу).

Эмбрионы и плоды до 12-й недели развития заливали в парафин целиком. ПЖ, взятую в более поздние сроки развития, разрезали на кусочки размерами 3×4×5 мм, для фиксации помещали в 10% нейтральный формалин на 0,2 М фосфатном буфере (рН 7,4) на 24 ч и заливали в парафин по стандартной методике. Иммуногистохимические реакции на парафиновых срезах проводили с антителами к SCF-R (C-kit) (1:20, клон T595, Novocastra, Великобритания), инсулину (1:75, клон

2D11-H5, Novocastra, Великобритания), глюкагону (1:50, кроличьи поликлональные, Novocastra, Великобритания). Исследования были проведены с помощью непрямого иммунопероксидазного, стрептавидин-биотинового методов, метода меченых иммунных комплексов, метода амплификации с тирамид-биотином — CSA и их комбинаций. Также были проведены двойные иммуногистохимические реакции для выявления экспрессии C-kit и инсулина, глюкагона и инсулина, C-kit и глюкагона с использованием стрептавидин-биотинового метода с щелочной фосфатазой и CSA с пероксидазой хрена. Для выявления мРНК проинсулина проводили реакцию гибридизации *in situ* (Novocastra, Великобритания) согласно протоколу производителя. Далее гистологические срезы изучали под микроскопом (Leica DM 1000, Германия) с последующим фотографированием через фотопреобразователь на фотокамеру (Leica DFC 290, Германия).

Проведено также морфометрическое изучение размеров C-kit-, инсулин- и глюкагон-позитивных частей островков ПЖ человека для оценки динамики изменения числа C-kit-, инсулин- и глюкагон-позитивных клеток в островках в разные сроки развития. Морфометрический анализ проведен с помощью окулярной сетки с площадью одной клетки 0,15625 мкм<sup>2</sup> при увеличении 400. На срезах подсчитывали число клеток на окрашенной части островков, умножали на площадь, занимаемую одной клеткой, и получали площадь части островка, окрашенной при реакции на инсулин, глюкагон или C-kit. Морфометрическому анализу подвергали все островки на срезах. Полученные данные подвергали последующей статистической обработке с помощью статистического графического пакета Microsoft Excel.

**Результаты исследования.** Экспрессия C-kit в ПЖ была обнаружена у зародыша 8,5 нед развития в клетках эпителия выводных протоков (рис. 1, а). При этом в этот и во все последующие сроки C-kit не был обнаружен в клетках мезенхимы

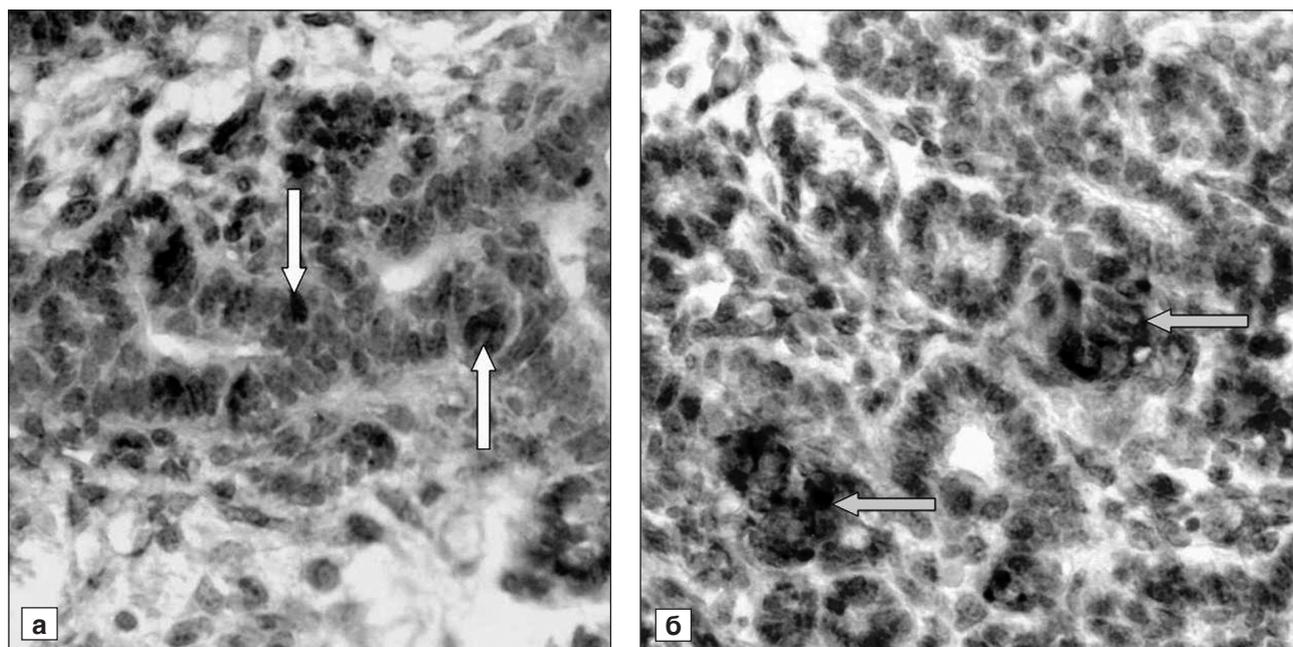


Рис. 1. C-kit-позитивные клетки (стрелки) в эпителии протоков (а) и островках (б) поджелудочной железы зародышей человека 8,5 нед (а) и 11,5 нед развития (б).

Иммуногистохимическая реакция, докраска гематоксилином. Ув. 400.

**Площадь среза C-kit-, инсулин- и глюкагон-позитивной частей островков в ходе органогенеза поджелудочной железы человека ( $\bar{x} \pm SD$ , мкм<sup>2</sup>)**

Сроки развития, нед	Части островка		
	C-kit-позитивная	Инсулин-позитивная	Глюкагон-позитивная
8,5	Одиночные клетки в эпителии протоков	Экспрессия отсутствует	Одиночные клетки в эпителии протоков
11,5	0,2±0,09	0,2±0,001	0,2±0,001
12,5	0,6±0,09*	0,3±0,05*	0,35±0,08*
15	0,8±0,15*	0,48±0,14*	0,9±0,4*
20	1,5±0,6*	1,5±0,6*	1,5±0,09*
23	0,9±0,4*	1,6±0,7*	1,8±0,09*
25	0,6±0,08*	2,2±0,6*	2,0±0,09*
26–27	0,4±0,01*	2,7±0,20*	2,1±0,20*
2 мес после рождения	0,3±0,7*	3,2±0,8*	2,2±0,8*

Примечание. SD — стандартное отклонение. \* Различия по сравнению с предыдущей возрастной группой значимы при  $P < 0,05$ .

железы и выявлялся только в эпителиальных клетках. У плодов 11,5 нед развития C-kit-позитивные клетки обособлялись от эпителия протоков и формировали скопления округлой формы, похожие на островки (см. рис. 1, б). С этого срока и примерно до 20-й недели пренатального развития увеличивалось как количество C-kit-позитивных клеток в островках, так и число самих островков. После 20-й недели количество этих клеток и занимаемая ими площадь среза островков уменьшились, однако C-kit-позитивные клетки в отдельных островках сохранялись в течение первых месяцев после рождения (таблица).

Количество инсулин- и глюкагон-позитивных клеток и занимаемая ими площадь среза островков ПЖ возрастали в процессе ее пренатального развития и были максимальными через 2 мес после рождения (см. таблицу). При этом экспрессию глюкагона мы впервые наблюдали у зародышей 8,5 нед развития в клетках эпителия протоков ПЖ, а инсулина — только у плодов 11,5 нед развития в клетках эпителия протоков и в формирующихся островках.

Сравнительный анализ результатов реакций с антителами к C-kit, инсулину и глюкагону показал, что во все изученные сроки C-kit-позитивные островки по форме и расположению напоминали островки, окрашенные при реакциях на инсулин и глюкагон.

Поскольку после 20-й недели внутриутробного развития количество C-kit-позитивных клеток и занимаемая ими площадь в островках уменьша-

лись (см. таблицу), мы предположили возможность дифференцировки C-kit-позитивных клеток в В-клетки или А-клетки. Для проверки этой гипотезы была проведена реакция на серийных гистологических срезах на инсулин и на C-kit. Было обнаружено, что на серийных срезах C-kit- и инсулин-позитивные островки имели одинаковую локализацию и сходное строение. Наше предположение было подтверждено также результатами двойной реакции, когда мы обнаружили клетки, одновременно экспрессирующие C-kit и инсулин. Более того, такие клетки были выявлены не только у плодов человека, но и в ПЖ новорожденных (рис. 2, а). Также с помощью двойной иммуногистохимической реакции было подтверждено предположение, что C-kit-позитивные клетки могут дифференцироваться не только в В-клетки, но и в А-клетки. При этом дифференцировка начинается еще в эпителии протоков, где с 8,5 нед обнаружены C-kit-позитивные клетки, экспрессирующие глюкагон. В последующие сроки, в том числе после рождения, в островках также находили C-kit-позитивные клетки, содержащие глюкагон (см. рис. 2, б).

Следует отметить, что в 8,5 нед развития одновременно с C-kit-позитивными клетками, экспрессирующими глюкагон, в клетках эпителия протоков было обнаружено образование мРНК проинсулина. При этом экспрессию инсулина мы обнаружили в 11,5 нед развития.

Поскольку в 8,5 нед развития не все C-kit-позитивные клетки эпителия протоков экспрессировали глюкагон, мы решили выяснить, развиваются ли В-клетки и А-клетки из одного или нескольких клеточных типов. Для этого была проведена двойная реакция на инсулин и глюкагон. В 11,5 нед развития в островках были обнаружены клетки, одновременно синтезирующие и инсулин, и глюкагон. Такие клетки сохранялись в островках и после рождения (см. рис. 2, в). Эти результаты позволяют сделать вывод, что популяция C-kit-позитивных клеток может служить общим источником как В-, так и А-клеток, которые сначала синтезируют глюкагон, а затем и инсулин.

**Обсуждение полученных данных.** Полученные данные и анализ экспрессии C-kit в ходе органогенеза ПЖ человека позволяют отнести SCF-R к маркерам коммитированных клеток — предшественников эндокриноцитов. При этом интенсивность экспрессии C-kit можно рас-

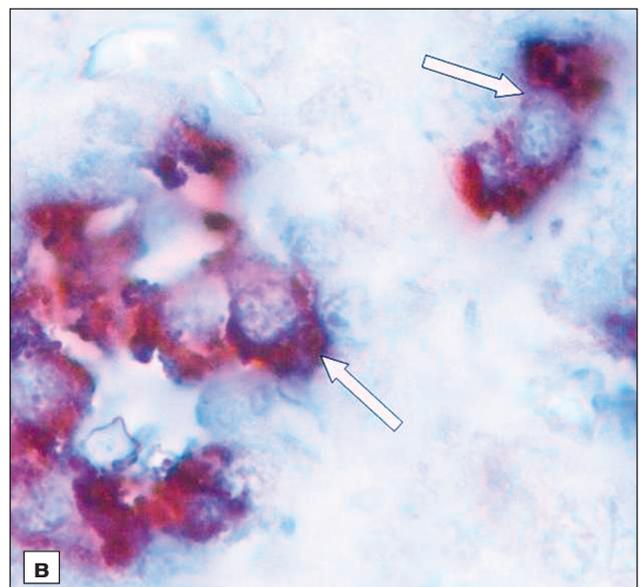
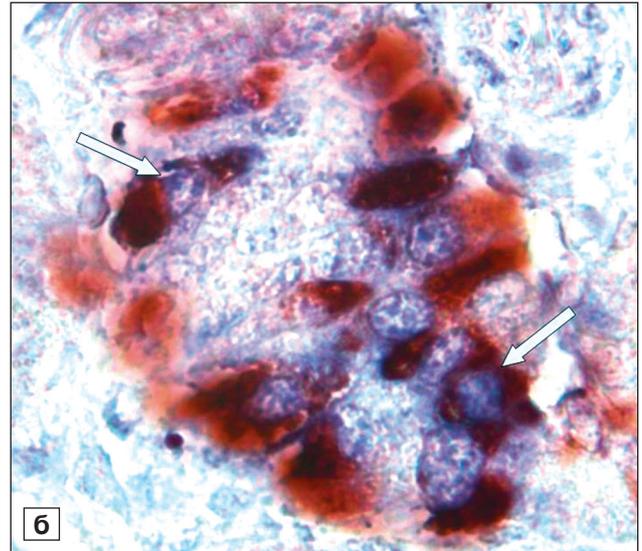
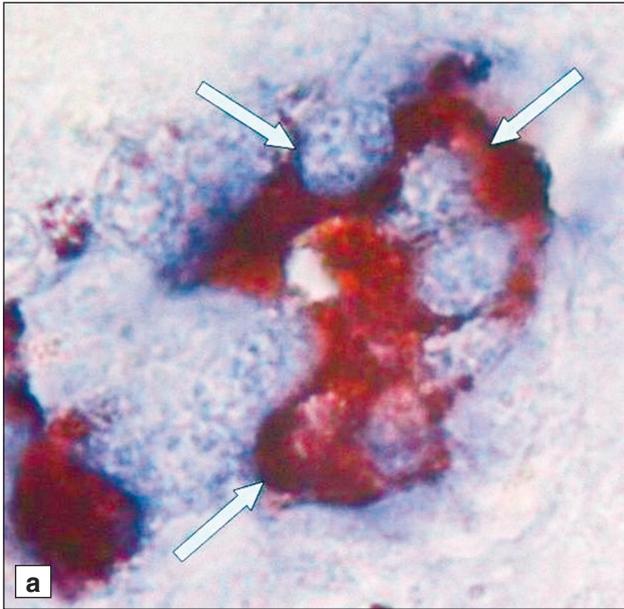


Рис. 2. Поджелудочная железа человека через 17 сут после рождения.

а — эндокриноциты, содержащие инсулин и C-kit (стрелки);  
б — эндокриноциты, содержащие глюкагон и C-kit (стрелки);  
в — эндокриноциты, содержащие инсулин и глюкагон (стрелки). Двойные иммуногистохимические реакции. Ув. 1000.

смаивать как косвенный критерий интенсивности процессов развития, роста и дифференцировки данной клетки-предшественника в указанный момент времени. Возможно, что в клетках со слабой экспрессией C-kit внутриклеточные процессы роста и дифференцировки только начинаются или уже заканчиваются, а у клеток с высокой чувствительностью к SCF процессы роста и дифференцировки протекают с наибольшей силой, или же это мигрирующие клетки, так как C-kit необходим для миграции клеток [2].

Результаты нашего исследования показали, что клетками-предшественниками эндокринной части ПЖ являются C-kit-позитивные клетки эпителия протоков, что позволило предложить наиболее вероятный путь развития В- и А-клеток ПЖ. На определенном этапе развития на плазмолемме клеток эпителия протоков появляется C-kit. Далее он начинает взаимодействовать со своим лигандом — SCF. Это взаимодействие запускает процессы дифференцировки клеток эпителия протоков в эндокриноциты [9]. Взаимодействие SCF/C-Kit активирует взаимодействия внутриклеточных протеинов, рост и дифференцировку путем увеличения PDX-1 [9], который вызывает активацию генов инсулина [13], соматостатина [8] и других. В результате в клетках эпителия начинают синтезироваться гормоны, сами клетки

начинают образовывать островки, которые отделяются от эпителия протоков, формируя самостоятельные образования. Более того, может быть, именно C-kit необходим для миграции клеток из протоков для формирования островков. При этом клетки островков начинают первым синтезировать глюкагон, далее в этих же клетках синтезируется инсулин. Таким образом, результаты нашего исследования не подтверждают данные о том, что развитие популяций В- и А-клеток происходит независимо друг от друга [5]. Наоборот, они подтверждают, что существует одна общая мульти-гормональная клетка-предшественник В- и А-клеток ПЖ [6].

Позже клетки островков дифференцируются в В- и А-клетки, синтезирующие соответствующие гормоны. Эта дифференцировка проходит по мере роста островка, т.е. в нем находятся клетки-предшественники, которые дифференцируются в В- и А-клетки. При этом часть предшественников

эндокриноцитов все же может оставаться в составе эпителия протоков, но основная их часть находится в островках и сохраняется там после рождения. По мере дифференцировки эндокриноцитов количество SCF-R на плазмолемме уменьшается, и образуются дифференцированные эндокриноциты, синтезирующие определенный гормон.

Таким образом, нами установлен источник и прослежена дальнейшая судьба C-kit-позитивных клеток, которые были описаны J. Li и соавт. в островках ПЖ 14–16-недельных плодов человека [9]. Мы показали, что источником этих C-kit-позитивных клеток является эпителий протоков формирующейся ПЖ. Это согласуется с обнаружением J. Li и соавт. [9] экспрессии C-kit-позитивными клетками ПЖ 14–16-недельных плодов человека цитокератина 19 — маркера эпителия протоков. В нашем исследовании показано, что эти C-kit-позитивные клетки появляются в эпителии протоков в 8,5 нед развития, далее они дифференцируются в клетки островков и сохраняются после рождения. Недавно опубликованы результаты исследований этих же авторов, которые были получены практически одновременно с нами. Однако в данной работе C-kit-позитивные клетки ПЖ были исследованы лишь в интервале с 8-й до 21-й недели пренатального развития [10]. Кроме того, в нашей работе дополнительным доказательством дифференцировки эндокриноцитов из эпителия протоков является обнаружение в этих клетках мРНК проинсулина до начала образования самого инсулина.

Обнаружение единой клетки-предшественника для В- и А-клеток ПЖ, которая сначала синтезирует глюкагон, а затем и инсулин, требует дальнейшего изучения и пересмотра основ представлений о патологии ПЖ, в частности, сахарном диабете I типа. Это дает возможность предположить, что при сахарном диабете I типа гипергликемия является следствием не только недостатка инсулина, но и избытка глюкагона, т.е. при недостатке В-клеток клетки-предшественники начинают дифференцироваться, чтобы восполнить недостаток инсулина. При этом они сначала начинают синтезировать глюкагон, который еще более усугубляет ситуацию. Подобное явление наблюдали при исследовании аллоксанового диабета. У крыс в ответ на введение аллоксана наряду с уменьшением численности В-клеток отмечено увеличение численности А-клеток [1].

Результаты исследования развития C-kit-позитивных клеток ПЖ могут быть использованы для дальнейшего изучения региональных стволо-

вых клеток эндокриноцитов островков ПЖ. То, что C-kit является трансмембранным рецептором, позволяет предположить способы выделения этих клеток, что открывает перспективы для разработки новых методов лечения сахарного диабета I типа путем трансплантации C-kit-позитивных клеток ПЖ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алеева Г.Н., Киясов А.П., Миннебаев М.М. и др. Динамика В- и А-клеточной популяций поджелудочной железы и содержания глюкозы в крови крыс при аллоксановом диабете. Бюл. exper. биол., 2002, т. 133, № 2, с. 151–153.
2. Blume-Jensen P., Claesson-Welsh L., Siegbahn A. et al. Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis. EMBO J., 1991, v. 10, p. 4121–4128.
3. Chabot B., Stephenson D.A., Chapman V.M. et al. The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. Nature, 1988, v. 335, p. 88–89.
4. d'Auriol L., Mattei M.G., Andre C. and Galibert F. Localization of the human c-kit protooncogene on the q11–q12 region of chromosome 4. J. Hum. Genetics, 1987, v. 78, p. 374–376.
5. Herrera P.L., Huarte J., Zufferey R. et al. Ablation of islet endocrine cells by targeted expression of hormone-promoter-driven toxigenes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, v. 91, p. 12999–13003.
6. Jensen J., Heller R. S., Funder-Nielsen T. et al. Independent development of pancreatic  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells from neurogenin3-expressing precursors a role for the notch pathway in repression of premature differentiation. J. Diabetes, 2000, v. 49, p. 163–176.
7. LeBras S., Czernichow P. and Scharfmann R. A search for tyrosine kinase receptors expressed in the rat embryonic pancreas. J. Diabetol., 1998, v. 41, p. 1474–1481.
8. Leonard J., Peers B., Johnson T. et al. Characterization of somatostatin transactivating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells. Mol. Endocrinol., 1993, v. 7, p. 1275–1283.
9. Li J., Goodyer C.G., Fellows F. and Wang R. Stem cell factor/c-Kit interactions regulate human islet-epithelial cluster proliferation and differentiation. Int. J. Biochem. Cell Biol., 2006, v. 38, p. 961–972.
10. Li J., Quirt J., Do H.Q. et al. Expression of c-Kit receptor tyrosine kinase and effect on beta-cell development in the human fetal pancreas. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 2007, v. 293, p. 475–483.
11. Linnekin D. Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. Int. J. Biochem. Cell Biol., 1999, v. 31, p. 1053–1074.
12. Oberg-Welsh C., Waltenberger J., Claesson-Welsh L. and Welsh M. Expression of protein tyrosine kinases in islet cells: possible role of the Flk-1 receptor for  $\beta$ -cell maturation from duct cells. J. Growth Factors, 1994, v. 10, p. 115–126.

13. Ohlsson H. and Edlund T. Sequence-specific interactions of nuclear factors with the insulin gene enhancer. *J. Cell*, 1986, v. 45, p. 35–44.
14. Philo J. S., Wen J., Wypych J. et al. Human stem cell factor dimer forms a complex with two molecules of the extracellular domain of its receptor Kit. *J. Biol. Chem.*, 1996, v. 271, p. 6895–6902.
15. Ramiya V.K., Maraist M., Arfors K.E. et al. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *J. Nat. Med.*, 2000, v. 6, p. 278–282.
16. Suzuki A., Nakauchi H. and Taniguchi H. Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *J. Diabetes*, 2004, v. 53, p. 2143–2152.
17. Welsh M., Anneren C., Lindholm C. et al. Role of tyrosine kinase signaling for beta-cell replication and survival. *Ups. J. Med. Sci.*, 2000, v. 105, p. 7–15.
18. Yashpal N.K., Li J. and Wang R. Characterization of c-Kit and nestin expression during islet cell development in the prenatal and postnatal rat pancreas. *J. Dev. Dyn*, 2004, v. 229, p. 813–825.
19. 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. *J. Diabetes*, 2001, v. 50, p. 521–533.

Поступила в редакцию 28.08.2010

Получена после доработки 29.12.2010

## C-KIT IS A MARKER OF HUMAN PANCREATIC ENDOCRINOCYTE STEM CELLS

*M.S. Kaligin, A.A. Gumerova, M.A. Titova,  
D.I. Andreyeva, E.I. Sharipova and A.P. Kiassov*

The aim of our study was to analyze the expression of one of the markers of progenitor cell of different cell types — CD 117 (C-kit) — in human pancreas during prenatal development. The pancreas of human embryos and fetuses at 4–28 weeks of gestation as well as of infants aged up to 2<sup>nd</sup> postnatal month, was studied. In histological sections, the immunocytochemical reactions were performed with the antibodies against C-kit, insulin and glucagon. In situ hybridization was used for detection of proinsulin mRNA. First cells expressing C-kit were found in human pancreas at 8.5 weeks of gestation among ductal epithelial cells. At 11.5 weeks of gestation these cells were found to segregate from the ductal epithelium and start to form islets. From 8.5 weeks of gestation C-kit positive cells started to express glucagon and proinsulin mRNA, and after 11.5 weeks they also expressed insulin. Islet C-kit positive cells coexpressing both glucagon and insulin, were also found after the birth. It may be concluded that C-kit positive endocrinocyte progenitor cells are common for pancreatic islet A- and B-cells and they are preserved in the islets after the birth.

**Key words:** *pancreas, pancreatic islet, endocrinocyte, progenitor cell, C-kit*

Department of Human Anatomy, Kazan State Medical University