

¹Кривова Ю. С., ¹Прощина А. Е., ¹Барабанов В. М.,
²Кушнир Б. Л., ¹Савельев С. В.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ВИМЕНТИНА В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА В ПЕРИОД ВНУТРИУТРОБНОГО РАЗВИТИЯ

¹ Научно-исследовательский институт морфологии человека, г. Москва, Россия,
² Российская детская клиническая больница Минздрава России, г. Москва

Детальные сведения о механизмах дифференцировки эндокринных клеток ПЖ и морфогенеза панкреатических островков играют ключевую роль в понимании патогенеза сахарного диабета и разработке эффективных методов терапии этого заболевания. Одним из механизмов образования панкреатических островков считаются процессы эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) и мезенхимально-эпителиального перехода (МЭП), которые заключаются в выселении прогениторных клеток из эпителия протоков, их миграции и последующей агрегации в островки [4]. В качестве доказательств участия этих процессов в развитии эндокринного отдела многие авторы рассматривают присутствие в ПЖ клеток со смешанным фенотипом: коэкспрессирующих мезенхимальные маркеры (виментин, фибронектин и др.) с эпителиальными (цитокератины, бета-катенин, Е-кадгерин и др.) или с гормонами эндокринных клеток (инсулином и глюкагоном). Подобные клетки выявляются при развитии и регенерации ПЖ у ряда млекопитающих (мышь, крыса, овца) [1–3].

Данные об участии ЭМП в развитии эндокринного отдела ПЖ человека многочисленны и противоречивы. Большинство авторов отмечают, что в нормальной ПЖ взрослых людей виментин не экспрессируется в эндокринных и эпителиальных клетках [3, 5]. Однако коэкспрессия виментина с эпителиальными маркерами и инсулином обнаружена в 6 аутопсиях ПЖ плодов (гестационный возраст 11 и 23 недели) [1]. Кроме того, в литературе описан ряд случаев экспрессии виментина в клетках протоков и эндокринных клетках ПЖ при сахарном диабете 2 типа [3, 5].

Целью настоящей работы является изучение распределения виментина в эпителиальных клетках ПЖ человека в период внутриутробного развития.

Материал и методы. Работа выполнена на 35 аутопсиях ПЖ плодов, гестационный возраст — 8–40 недель. Образцы ПЖ фиксировали в кислом формалине, нейтральном формалине (4%-ный параформальдегид на 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,5) или жидкости Буэна. Фиксированные образцы ПЖ обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и диоксане, заливали в парафин и готовили серийные срезы толщиной 5, 7 и 10 мкм.

В иммуногистохимических реакциях в качестве первичных антител применяли мышинные моноклональные антитела к ЦК19 («Novocastra», 1:100–1:200) и кроличьи моноклональные антитела к виментину («Thermo Fisher Scientific»; 1:200). Демаскирование антигенов проводили высокотемпературной обработкой срезов (кипячение срезов в 0,01 М цитратном буфере (pH 6,0) в микроволновой печи в течение 10 мин с последующим остыванием срезов в буфере в течение 20 мин). Для визуализации реакций использовали Multi Vision Polymer Detection

System: anti-rabbit-HRP and anti-mouse-AP, LV Blue and LV Red («Thermo Fisher Scientific»).

Результаты и обсуждение. На ранних сроках развития (8–9 недель) зачаток ПЖ образован первичными протоками, растущими в окружающую мезенхиму. Иммунопозитивная реакция на ЦК19 наблюдается в цитоплазме большинства эпителиальных клеток первичных протоков, позитивная реакция на виментин — в цитоплазме мезенхимальных клеток (рис. 1, А, Б). Эпителиальные выросты первичных протоков тесно контактируют с отростками виментин-позитивных мезенхимальных клеток (рис. 1, А, Б). Колокализация виментина с ЦК19 обнаружена в части клеток в эпителиальных выростах первичных протоков (рис. 1, А, Б), а также в отдельных клетках, расположенных в строме железы вблизи базальной поверхности эпителия первичных протоков (рис. 1, А, Б).

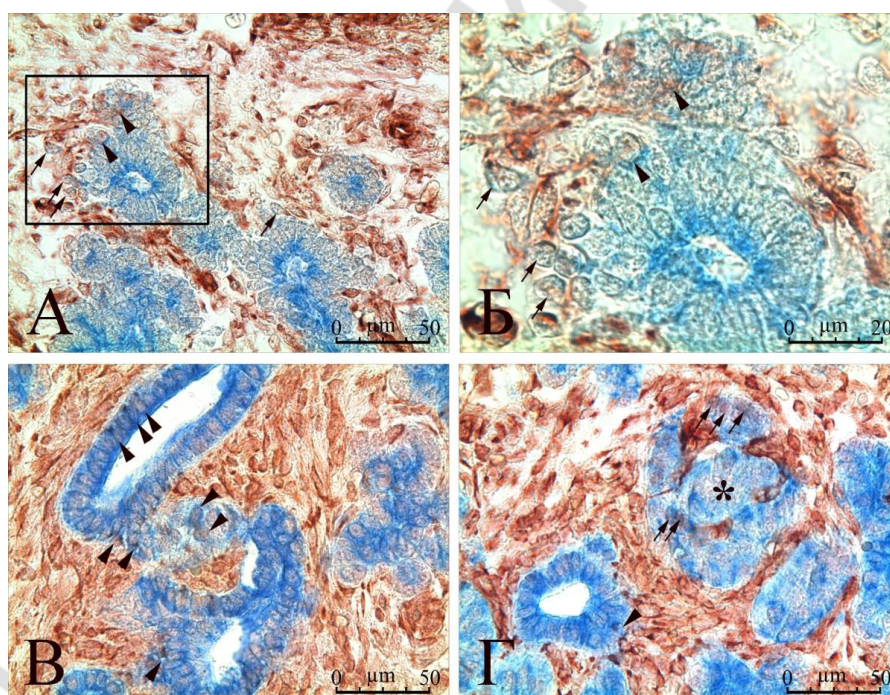


Рис. 1. Двойное иммуногистохимическое маркирование антителами к виментину (коричневый) и ЦК19 (голубой) в образцах ПЖ плодов, гестационный возраст 9 недель (А, Б) и 16 недель (В, Г). Колокализация виментина с ЦК19 в клетках однослойного эпителия протоков и эпителиальных выростов протоков (А–Г) (отмечены короткими стрелками), а также в клетках, локализованных в мезенхиме (А, Б) и в составе панкреатических островков (Г) (отмечены длинными стрелками). Б — выделенный фрагмент рисунка А при большем увеличении. Знаком «*» отмечен панкреатический островок

При развитии ПЖ с 8-й по 40-ю недели экспрессия ЦК19 в дифференцирующихся клетках экзокринного и эндокринного отдела снижается и сохраняется в эпителиальных клетках протоков. Реакция на виментин наблюдается в многочисленных мезенхимальных клетках, а также в эндотелиальных и глиальных клетках. Начиная с 12-й недели и на всех последующих сроках развития колокализация виментина с ЦК19 наблюдалась в части эпителиальных клеток протоков (рис. 1, В), а также в единичных клетках, локализованных в строме железы и в составе панкреатических островков (рис. 1, Г). Как и на ранних сроках разви-

тия, ЦК19+/виментин+ клетки выявлены в эпителиальных выростах протоков (рис. 1, В). Кроме того, реакция на виментин наблюдалась в клетках цилиндрического, кубического и плоского однослойного эпителия, выстилающего протоки железы (рис. 1, В).

Согласно современным представлениям, процессы ЭМП и МЭП наблюдаются в раннем морфогенезе ПЖ при формировании дорсальной и вентральной закладок, а также при образовании и разветвлении первичных протоков [4]. Кроме того, ЭМП наблюдается при выселении и миграции предшественников эндокринных клеток [1, 4]. При развитии ПЖ человека коэкспрессия эпителиальных маркеров (цитокератины, бета-катенин), инсулина и виментина наблюдается в бета-клетках, выселяющихся из протоков или входящих в состав панкреатических островков, что свидетельствует об участии ЭМП в образовании панкреатических островков и их ремоделировании [1].

Нами показано, что клетки со смешанным эпителиально-мезенхимальным фенотипом (иммунопозитивные к виментину и ЦК19) присутствуют в ПЖ на протяжении всего плодного периода развития. С ранних сроков развития (8–9 недель) происходит выселение клеток из эпителия и их миграция в формирующиеся островки, что подтверждается присутствием отдельных ЦК19+/виментин+ клеток в строме железы и в составе панкреатических островков. В то же время, на всех исследованных сроках развития наибольшее число ЦК19+/виментин+ клеток обнаружено в эпителии протоков и их выростах. Поэтому мы предполагаем, что процессы ЭМП и МЭП могут происходить не только при развитии эндокринного отдела, но и при образовании разветвленной структуры железы.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-34-00587.

ЛИТЕРАТУРА

1. *One process for pancreatic b-cell coalescence into islets involves an epithelial-mesenchymal transition* / L. Cole [et al.] // *J. Endocrinol.* 2009. Vol. 203, № 1. P. 19–31.
2. *An Appraisal of Intermediate Filament Expression in Adult and Developing Pancreas: Vimentin Is Expressed in a Cells of Rat and Mouse Embryos* / A. Di Bella [et al.] // *J. Histochem. Cytochem.* 2009. Vol. 57, № 6. P. 577–86.
3. *Expression of the intermediate filament vimentin in proliferating duct cells as a marker of pancreatic precursor cells* // S. H. Ko [et al.] // *Pancreas.* 2004. Vol. 28, № 2. P. 121–8.
4. *Nakaya, Y. EMT in developmental morphogenesis* / Y. Nakaya, G. Sheng // *Cancer Lett.* 2013. Vol. 341, № 1. P. 9–15.
5. *Expression of mesenchymal and a-cell phenotypic markers in islet b-cells in recently diagnosed diabetes* / M. G. White [et al.] // *Diabetes Care.* 2013. Vol. 36, № 11. P. 3818–20.

¹Krivova Y. S., ¹Proshchina A. E., ¹Barabanov V. M., ²Kushnir B. L., ¹Saveliev S. V.

Distribution of vimentin in the epithelial cells of the human pancreas during prenatal development

¹ *Research institute of human morphology, Moscow, Russia,*

² *Russian children's clinical hospital Russian Federation, Moscow*

Recent studies on experimental animals and cell cultures have demonstrated that an intermediate filament protein vimentin can be expressed in the differentiating endocrine cells of the pancreas. In the present study we analyzed the distribution of

vimentin in the epithelial cells of the human pancreas during prenatal development. Double immunohistochemical labeling with antibodies to vimentin and cytokeratin 19 (CK19) was applied on 35 autopsies of the fetal pancreas (gestational age 8–40 weeks). In all investigated stages of development colocalization of vimentin with CK19 was observed in some epithelial cells of pancreatic ducts. Moreover, single cells immunopositive for vimentin and CK19 were detected in the mesenchyme and inside the pancreatic islets. These results suggest the involvement of epithelial-mesenchymal transition in the morphogenesis of human endocrine pancreas.

Key words: human development, pancreas, pancreatic islet, vimentin, cytokeratin 19.