
БИОГЕРОНТОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ ПАНКРАГЕНА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ИХ СТАРЕНИИ

В.Х.Хавинсон¹, А.О.Дурнова², В.О.Полякова², Г.Х.Толибова²,
Н.С.Линькова², И.М.Кветной², Т.В.Кветная², С.И.Тарновская²

¹Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург; ²Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии

Установлено, что при старении клеток поджелудочной железы экспрессия маркеров дифференцировки в них снижается. Тетрапептид панкреатин стимулирует экспрессию факторов дифференцировки ацинарных (Pdx1, Ptf1a) и островковых (Pdx1, Pdx6, Pdx4, Foxa2, Nkx2.2) клеток поджелудочной железы в “молодых” и “старых” культурах. Индуцируемая панкреатином дифференцировка островковых и ацинарных клеток поджелудочной железы может являться одним из механизмов его антидиабетического и противовоспалительного действия. Таким образом, транскрипционные факторы дифференцировки клеток поджелудочной железы являются фармакологической мишенью для панкреатина и позволяют рассматривать его как эффективное средство в терапии сахарного диабета и панкреатита.

Ключевые слова: тетрапептид, дифференцировка, поджелудочная железа, клеточное старение

В последнее десятилетие в мире наблюдается значительное увеличение доли пожилых больных сахарным диабетом и панкреатитом [1]. Известно, что тетрапептид панкреатин усиливает экспрессию инсулина β -клетками и регулирует продукцию глюкагона α -клетками, а также нормализует функциональную активность экзокринных клеток поджелудочной железы (ПЖ) [6-8]. Установлено, что панкреатин проникает через мембрану в ядро и ядрышко клетки [4]. Вероятно, его геропротекторное действие в отношении ПЖ связано с регуляцией транскрипции генов факторов дифференцировки [4]. Важнейшими факторами дифференцировки клеток ПЖ являются Ptf1a, Pdx1, Pdx6, Foxa2, Nkx2.2 и Pdx4 [5]. Белок Pdx1 регулирует пролиферацию и дифференцировку всех типов клеток ПЖ. Белок Ptf1a участвует в дифференцировке ацинарных клеток ПЖ, а также регулирует экспрессию генов ферментов экзокринных клеток ПЖ, включая эластазу 1 и амилазу. Снижение экспрессии гена Ptf1a наблюдается в опухолевых клетках при раке в ПЖ [2, 10]. Белки Pdx6, Foxa2, Nkx2.2 и Pdx4 активируют экс-

прессию генов в инсулинпродуцирующих β -клетках, глюкагонпродуцирующих α -клетках и панкреатит-полипептидсекретирующих клетках островков Лангенганса [3,9,12]. Экспрессия Pdx6 и Pdx4 также обнаружена в соматостатин-содержащих δ -клетках [11]. Известно, что мутации в генах Pdx6, Foxa2 и Nkx2.2 являются причиной развития сахарного диабета, вызванного нарушением синтеза инсулина в β -клетках [5]. При старении наблюдается уменьшение синтеза Ptf1a в ацинарных клетках, что приводит к снижению функциональной активности клеток и является причиной развития хронического панкреатита. Основная патология, которая наблюдается при снижении синтеза Pdx1, Pdx6, Foxa2, Nkx2.2 и Pdx4 в островковых клетках ПЖ — развитие сахарного диабета 2-го типа. В связи с этим исследование влияния панкреатина на совокупность экспрессии указанных транскрипционных факторов дифференцировки является необходимым для понимания молекулярных механизмов его геро- и панкреопротекторного действия.

Целью работы явилось изучение молекулярных механизмов действия панкреатина на дифференцировку ацинарных и островковых клеток ПЖ.

Адрес для корреспонденции: miauy@yandex.ru. Линькова Н.С.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполняли на эмбриональных культурах клеток поджелудочной железы MIA PaCa-2 1 и 14 пассажей, полученных в институте Цитологии РАН (Санкт-Петербург). Первый пассаж расценивали как “молодые”, а 14-й — как “старые” культуры в соответствии с рекомендацией Международной ассоциации исследований клеточных культур (США, Сан-Франциско, 2007 г.). Культуры разделили на 3 группы: в 1-й группе (контрольной) вводили 0.9% раствор NaCl, во 2-й добавляли контрольный пептид бронхоген (20 нг/мл), а в 3-й — панкреатин (20 нг/мл). Клетки культивировали во флаконах площадью 25 см² (“JetBiofil”) в 5 мл ростовой среды при 37°C в среде DMEM с добавлением L-глутамина (“Билот”), 15% сыворотки плодов коровы SC-BIOL (“Биолот”) и 1% раствора пенициллина-стрептомицина. Исходная концентрация клеток составила 10⁶ клеток/мл. Для иммуноцитохимического исследования использовали первичные моноклональные антитела Ptf1a, Pdx1, Pax6, Foxa2, NKx2.2, Pax4 (1:50, “Abcam”), и вторичные антитела — биотинилированные антимышьи иммуноглобулины (“Novocastra”). Пермеабелизацию проводили с применением 0.1% Тритона X-100. Визуализацию реакции выполняли с применением пероксидазы хрена и диаминобензидина (“EnVision Detection System”, Peroxidase/DAB, Rabbit, Mouse). Оценку результатов иммуноцитохимического окрашивания проводили морфометрическим методом на микроскопе “Nikon Eclipse E400” с помощью цифровой камеры “Nikon DXM1200” и программного обеспечения “Videotest Morphology 5.0”. В каждом случае анализировали 5 полей зрения при увеличении 200. Площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах. Этот пара-

метр характеризует количество клеток, в которых экспрессируется исследуемый фактор дифференцировки.

Статистическую обработку данных выполняли в программе “Statistica 7.0”. Для сравнения и оценки межгрупповых различий использовали непараметрический *U* критерий Манна—Уитни, который является наиболее точным методом для сравнения выборок, включающих в себя около 10-15 элементов. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Наблюдалось слабое окрашивание клеток 14-го пассажа 1-й и 2-й групп на все исследуемые маркеры, что свидетельствует о низком уровне их синтеза в клетках. Под действием панкреатина интенсивность окрашивания клеток увеличивалась, что указывает на активацию в них синтеза исследуемых молекул (рис. 1, 2).

При старении культур в контрольной группе площадь экспрессии всех маркеров, кроме Pax4, снижалась (таблица). Наиболее выраженное снижение экспрессии отмечено для маркера Ptf1a, который является фактором дифференцировки ацинарных клеток. Площадь его экспрессии в старых культурах уменьшилась в 4.6 раза по сравнению с молодыми культурами. При введении бронхогена в молодых и старых культурах клеток ПЖ экспрессия маркера Ptf1a достоверно не изменялась (таблица). Под действием панкреатина в молодых и старых культурах площадь экспрессии Ptf1a увеличивалась соответственно в 1.5 и 6 раз. Фактор дифференцировки Pdx1 является ключевым маркером созревания всех типов клеток ПЖ. Площадь экспрессии Pdx1 уменьшалась в старых культурах в 2.72 раза по сравнению с молодыми культурами. При введении бронхогена экспрессия

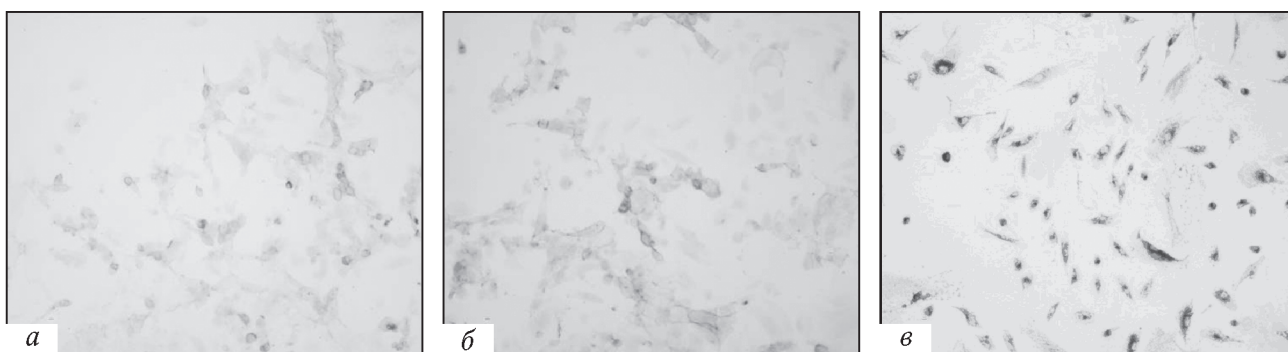


Рис. 1. Экспрессия транскрипционного фактора Ptf1a в культуре клеток ПЖ (14 пассаж). Иммуноцитохимическое окрашивание ($\times 200$).

Здесь и на рис. 2: *a* — контроль, *б* — введение бронхогена, *в* — введение панкреатина.

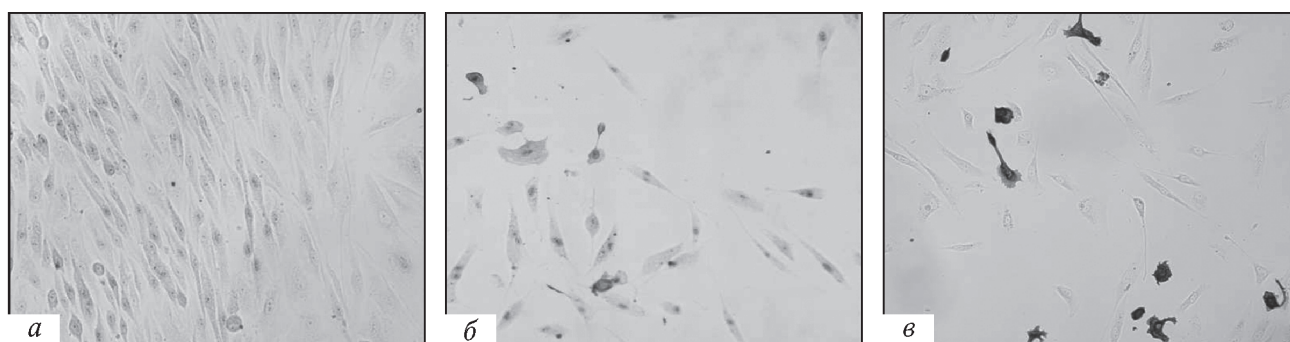


Рис. 2. Экспрессия транскрипционного фактора Nkx2.2 в культуре клеток ПЖ (3-й пассаж). Иммуноцитохимическое окрашивание ($\times 200$).

Pdx1 увеличивалась в молодых и старых культурах на 10% относительно контроля. Под действием панкреатина площадь экспрессии Pdx1 в молодых культурах увеличивалась в 1.3 раза, а в старых — в 2.6 раза. Таким образом, панкреатин оказывает значительно более выраженное стимулирующее влияние на экспрессию Pdx1 по сравнению с бронхогеном.

В созревании α -, β -, δ - и PP-клеток ПЖ участвуют факторы дифференцировки Pax6, Foxa2, Nkx2.2. Их площадь экспрессии в старых культурах клеток снижалась в 2-4 раза по сравнению с молодыми (таблица).

Под действием панкреатина площадь экспрессии маркера Foxa2 в молодых культурах достоверно не изменялась, а площадь экспрессии Pax6 и Nkx2.2 — увеличивалась в 1.3 раза. В старых культурах под влиянием панкреатина площадь экспрессии Foxa2, Nkx2.2 и Pax6 увеличивалась соответственно в 1.6, 2 и 2.3 раза по сравнению с контролем. Бронхоген не влиял на площадь экспрессии маркера Foxa2 ни в молодых, ни в старых культурах. При этом бронхоген оказывал слабое стимулирующее действие на площадь экспрессии маркера Nkx2.2 в молодых культурах и на Pax6 в старых культурах.

Установлено, что при клеточном старении резко снижается концентрация белков Pdx1 и Ptf1a, индуцирующих созревание ацинарных и островковых клеток ПЖ. Известно, что снижение экспрессии Ptf1a наблюдается в опухолевых клетках при раке ПЖ, а отсутствие или снижение концентрации белка Pdx1 тормозит развитие клеток ПЖ из полипотентных клеток [2, 10]. Панкреатин восстанавливает экспрессию Pdx1 и Ptf1a в старых культурах до уровня молодых. Таким образом, панкреатин способствует увеличению числа Ptf1a⁺ ранних предшественников ацинарных клеток в ПЖ.

Кроме того, под действием панкреатина усиливалась экспрессия маркеров предшественников α -, β -, и PP-клеток — Pdx1, Pax6, Pax4, Foxa2 и Nkx2.2. Следовательно, панкреатин стимулирует дифференцировку различных островковых клеток ПЖ, тем самым восстанавливая синтез инсулина, глюкагона, соматостатина и панкреатического полипептида. Площадь экспрессии маркера Pax4, секретируемого предшественниками δ -клеток, при старении культур и введении панкреатина практически не изменялась, что согласуется с данными других исследователей [11].

Таким образом, пептид панкреатин способствует разнонаправленной дифференцировке клеток

Влияние пептидов на площадь экспрессии факторов дифференцировки клеток ПЖ ($M \pm m$; %)

Факторы дифференцировки	Контроль		Бронхоген		Панкреатин	
	молодые культуры	старые культуры	молодые культуры	старые культуры	молодые культуры	старые культуры
Ptf1a	1.48 \pm 0.08	0.32 \pm 0.03	1.65 \pm 0.12	0.45 \pm 0.01*	2.04 \pm 0.11*	1.95 \pm 0.05*
Pdx1	2.84 \pm 0.08	1.05 \pm 0.03	3.05 \pm 0.11*	1.15 \pm 0.03*	3.63 \pm 0.22*	2.75 \pm 0.14*
Pax6	2.32 \pm 0.07	1.15 \pm 0.02	2.29 \pm 0.20	1.35 \pm 0.04*	2.96 \pm 0.11*	2.64 \pm 0.05*
Foxa2	1.55 \pm 0.14	0.45 \pm 0.02	1.63 \pm 0.05	0.36 \pm 0.06	1.66 \pm 0.14	0.75 \pm 0.01*
Nkx2.2	1.32 \pm 0.04	0.34 \pm 0.03	1.45 \pm 0.06*	0.40 \pm 0.03	1.74 \pm 0.06*	0.68 \pm 0.05*
Pax4	0.96 \pm 0.06	1.19 \pm 0.03	1.16 \pm 0.07*	1.38 \pm 0.03*	1.26 \pm 0.11*	1.74 \pm 0.03*

Примечание. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

ПЖ. Фармакотропными мишенями панкреатина являются гены и кодируемые ими факторы транскрипции и дифференцировки, участвующие в развитии разных типов клеток ПЖ и регулирующие их ферментативную и гормональную активность. Индукционное действие панкреатина на дифференцировку и функциональную активность разных типов ацинарных и островковых клеток позволяет рассматривать его как перспективное средство для лечения патологий обмена веществ, в том числе сахарного диабета и панкреатита.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alberto B., Gregg E.W., Gerzoff R.B. et al. // *Diabetes Care*. 2012. Vol. 35, N 4. P. 738-740.
2. Crnogorac-Jurcevic T., Efthimiou E., Capelli P. et al. // *Oncogene*. 2001. Vol. 20, N 50. P. 7437-7446.
3. Doyle M.J., Sussel L. // *Diabetes*. 2007. Vol. 56, N 8. P. 1999-2007.
4. Fedoreyeva L.I., Kireev I.I., Khavinson V.Kh., Vanyushin B.F. // *Biochemistry (Moscow)*. 2011. Vol. 76, N 11. P. 1210-1219.
5. Jorgensen M.C., Ahnfelt-Ronne J., Hald J. et al. // *Endocrine Rev.* 2007. Vol. 28, N 6. P. 685-705.
6. Khavinson V.Kh., Gapparov M.M.G., Sharanova N.E. et al. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2010. Vol. 149, N 3. P. 351-353.
7. US 7,491,703. Tetrapeptide regulating blood glucose level in diabetes mellitus / Khavinson V.Kh., Malinin V.V., Grigoriev E.I., Ryzhak G.A. // USA. 17.02.2009.
8. Korkushko O.V., Khavinson V.Kh., Shatilo V.B. et al. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2011. Vol. 151, N 4. P. 454-456.
9. Lee C.S., Sund N.J., Behr R. et al. // *Dev. Biol.* 2005. Vol. 278, N 2. P. 484-495.
10. Sellick G.S., Barker K.T., Stolte-Dijkstra I. et al. // *Nat. Genet.* 2004. Vol. 36, N 12. P. 1301-1305.
11. Slavin B.G., Lerner S.P. // *Anat. Res.* 1990. Vol. 228, N 1. P. 53-57.
12. St-Onge L., Sosa-Pineda B., Chowdhury K. et al. // *Nature*. 1997. Vol. 387. P. 406-409.

Получено 17.04.11
