

УДК 616.37-098-003.93:615.38

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-220–232

Для цитирования: Пахомова А.В., Першина О.В., Крупин В.А., Ермолаева Л.А., Ермакова Н.Н., Кудряшова А.И., Дыгай А.М., Пан Э.С., Рыбалкина О.Ю., Скурихин Е.Г. Роль стволовых и прогениторных клеток в регенерации поджелудочной железы и семенников при метаболических нарушениях. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 220–232.

Роль стволовых и прогениторных клеток в регенерации поджелудочной железы и семенников при метаболических нарушениях

Пахомова А.В., Першина О.В., Крупин В.А., Ермолаева Л.А., Ермакова Н.Н., Кудряшова А.И., Дыгай А.М., Пан Э.С., Рыбалкина О.Ю., Скурихин Е.Г.

Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины (НИИФирМ) имени Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр (ТНИМЦ) Российской академии наук (РАН)
Россия, 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – изучить регенеративный потенциал стволовых и прогениторных клеток поджелудочной железы и семенников при метаболических нарушениях.

Материал и методы. Эксперименты проведены на мышах линии C57Bl/6. Метаболические нарушения моделировали стрептозотоцином и жировой диетой. Морфологические методы использовали для оценки морфопатологических изменений поджелудочной железы и тестикулярной ткани, фертильности. В иммуногистохимических исследованиях изучалась экспрессия инсулина в островках Лангерганса, CD16 – в семенниках. Биохимическими методами и методом иммуноферментного анализа в биологических образцах оценивали липидный спектр, глюкозу, медиаторы воспаления, тестостерон и глюкозозависимый инсулинопотропный полипептид. Цитометрическими методами исследовали поверхностные антигены стволовых и прогениторных клеток, культуральные методы и трансплантационный тест позволили изучить регенераторный потенциал стволовых и прогениторных клеток.

Результаты. Введение стрептозотоцина и жировая диета вызывали нарушение обмена липидов, тестостерона, глюкозы и инсулинорезистентности у мышей самцов линии C57BL/6. Вследствие метаболических нарушений развивались воспаление, диабет 2 типа, астено- и олигозооспермия, снижался индекс плодовитости. При метаболических нарушениях наблюдали увеличение количества олигопотентных предшественников β-клеток (CD45⁺TER119⁺CD133⁺CD49f^{low}) и предшественников гемангиогенеза (CD45⁺TER119⁺cKit⁺Flk-1⁺) в поджелудочной железе, сперматогонияльных стволовых клеток (CD117⁺CD90⁺ и CD117⁺CD90⁺) и предшественников гемангиогенеза (CD45⁺TER119⁺cKit⁺Flk-1⁺) в семенниках. Стволовые и прогениторные клетки демонстрировали высокую клональную активность и потенциал к самообновлению, способность дифференцироваться в зрелые клетки *in vitro*, эффективно приживлялись в травмированной ткани.

Заключение. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* выявлен высокий регенеративный потенциал предшественников гемангиогенеза и инсулин-продуцирующих β-клеток, сперматогонияльных стволовых клеток мышей самцов линии C57BL/6 при метаболических нарушениях. Низкие темпы регенерации микроциркуляторного русла, инсулин-продуцирующих β-клеток и половых клеток при метаболических

✉ Пахомова Ангелина Владимировна, e-mail: angelinapakhomova2011@gmail.com.

нарушениях связаны с ингибирующим действием диабетических факторов и воспаления на стволовые и прогениторные клетки.

Ключевые слова: метаболические нарушения, воспаление, диабет, гипогонадизм, сперматогонияльные стволовые клетки, предшественники гемангиогенеза, предшественники β -клеток, регенерация.

Метаболический синдром (МС) – это патологическое состояние, характеризующееся центральным (абдоминальным) ожирением, нарушениями гомеостаза и метаболизма глюкозы, дислипидемией и артериальной гипертензией [1–4]. Основными этиологическими факторами МС являются генетическая предрасположенность, избыточное потребление жиров и гиподинамия [4, 6–7]. По своей медико-социальной значимости МС стоит в ряду важнейших медицинских проблем XXI в. [4, 8–9]. Распространенность симптомокомплекса во всех странах весьма значительна. В среднем МС встречается у каждого пятого взрослого человека среди населения развитых стран и в ближайшие 25 лет ожидается увеличение темпов его роста на 50% [3, 10]. В России МС диагностируют у 20,6% лиц в возрасте 30–69 лет, при этом частота его встречаемости у мужчин 40–55 лет составляет 44,4%, у женщин той же возрастной группы – 20,8%, с возрастом число больных увеличивается [11]. Вызывает серьезную озабоченность устойчивый рост частоты МС среди подростков и молодежи [9, 12]. За последние 10 лет количество детей, имеющих признаки МС, возросло с 4,2 до 6,4% [13–15].

МС проявляется в виде таких широко распространенных заболеваний, как сахарный диабет 2 типа, атеросклероз, артериальная гипертензия и ишемическая болезнь сердца [14, 16]. У мужчин с МС одновременно с нарушениями углеводного и жирового обмена регистрируется низкий уровень тестостерона [17–20]. Сохранение в течение длительного времени этой патологической триады приводит к мужскому гипогонадизму. По некоторым данным, примерно у 15% мужчин с МС старше 40 лет диагностирован гипогонадизм [21–22]. Сниженная гонадотропная функция гипофиза сформировала тактику лечения мужского гипогонадизма. Терапия базируется на восполнении дефицита тестостерона [21, 23].

Ввиду заместительного характера лечения гормональные препараты назначаются постоянно. Гормонотерапия лишь уменьшает симптомы андрогенной недостаточности [20]. Между тем тестостероном невозможно полностью восстановить структуру и функцию клеток, образующих ткань яичек. По современным представлениям,

основой регенерации тканей организма постнатального развития выступают костномозговые и тканеспецифичные стволовые клетки (СК) и прогениторные клетки. Однако при МС стволовые клетки мало изучены. Это не позволяет сформировать тактику фармакологической регуляции СК и прогениторных клеток в целях стимуляции регенерации пораженных клеток и тканей при МС.

Целью настоящего исследования явилось изучение регенераторного потенциала стволовых и прогениторных клеток поджелудочной железы и семенников у мышей линии C57BL/6 при метаболических нарушениях.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на мышах линии C57BL/6 (самцы $n = 250$, самки $n = 60$), полученных из питомника отдела биомоделирования НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (квалификационный сертификат имеется). Исследование проводилось в несколько этапов, на каждом из которых количество животных в группах составляло не менее 10 особей. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах или в иных научных целях.

Рождение животных принимали за 0-й день эксперимента. Метаболические нарушения моделировали однократным подкожным введением стрептозотоцина (Sigma, США) (200 мг/кг) через 24 ч после рождения и жировой диетой (Siff EF R/M with 30% Fat кат. № E15116-34, Германия) на 28–70-е сут после рождения [24]. Эвтаназию мышей проводили в CO_2 -камере на 70-е сут эксперимента. Биохимическими методами оценивали содержание в крови холестерина, триацилглицеролов, липопротеинов высокой, низкой и очень низкой плотности, и глюкозы. С применением иммуноферментного анализа (ИФА) определяли содержание тестостерона, инсулина, глюкозозависимого инсулилотропного полипептида, IFN- γ , TGF- β 1, IL-1 β , 2, 5, 17, 23 в биологических пробах. Проводили морфологическое исследование поджелудочной железы и семенников. Иммуногистохимически изучали экспрессию инсулина в островках Лангерганса и CD16 в семенниках. Дополнительно оценивали продуктивность

сперматогенеза и индекс плодовитости у мыш-ей-самцов [25]. По экспрессии мембранных ре-цепторов (CD24, CD31, CD34, CD45, CD49f, CD51, CD52, CD90, CD117 (cKit), CD133, TER119, Flk-1, PDX1) делали вывод о содержании предшествен-

ников β -клеток, прогениторных эндотелиальных клеток, предшественников гемангиогенеза, спер-матогоний, сперматогонияльных СК, клеток Ле-йдига, пан-гемопоэтических клеток, моноцитов в тканях (таблица).

Т а б л и ц а

Содержание в тканях (% от всех окрашенных мононуклеаров) стволовых и прогениторных клеток у мышей с метаболическими нарушениями на 70-е сут эксперимента и прирост клеточной массы в культуре (% от исходного содержания клеток в культуре), $M \pm m$				
Клетки (иммунофенотип)	Интактный контроль		Метаболические нарушения	
	Содержание клеток	Прирост клеток в культуре	Содержание клеток	Прирост клеток в культуре
<i>Поджелудочная железа</i>				
Клетки-предшественники гемангиогенеза (CD45 ⁻ TER119 ⁻ cKit ⁺ Flk-1 ⁺)	0,070 ± 0,017	124 ± 24 ●	1,063 ± 0,057 *	72 ± 10 ●
Мультипотентные прогениторные клетки (CD45 ⁻ TER119 ⁻ cKit ⁺ Flk-1 ⁻)	81,326 ± 0,081	102 ± 21 ●	92,271 ± 0,090 *	187 ± 20 ●
Олигопотентные предшественники β -клеток (CD45 ⁻ TER119 ⁻ CD133 ⁺ CD49f ^{low})	0,023 ± 0,023	110 ± 19 ●	0,097 ± 0,009 *	234 ± 31 ●
Общая популяция PDX1 ⁺ - клетки	0,086 ± 0,009	–	0,0542 ± 0,002 *	–
β -клетки (CD45 ⁻ TER119 ⁻ PDX1 ⁺)	0,083 ± 0,009	–	0,0013 ± 0,002 *	–
<i>Семенники</i>				
Пан-гемопоэтические клетки (CD45 ⁺)	5,660 ± 0,008	–	7,416 ± 0,329 *	–
Моноциты (CD45 ⁺ CD90 ⁺ CD31 ⁺ CD34 ⁻)	0,115 ± 0,005	–	0,153 ± 0,014 *	–
Клетки-предшественники гемангиогенеза (CD45 ⁻ CD117 ⁺ Flk1 ⁺)	0,500 ± 0,007	144 ± 16 ●	2,187 ± 0,009 *	102 ± 8 ●
Эндотелиальные клетки (CD45 ⁻ CD31 ⁺)	0,506 ± 0,149	374 ± 34 ●	1,050 ± 0,061 *	192 ± 22 ●
Сперматогонияльные стволовые клетки (CD117 ⁻ CD90 ⁺)	0,726 ± 0,299	325 ± 36 ●	0,933 ± 0,139	1742 ± 200 ●
Сперматогонияльные стволовые клетки (CD117 ⁺ CD90 ⁺)	10,587 ± 0,695	280 ± 35 ●	12,137 ± 1,119 *	74 ± 8 ●
Сперматогонияльные стволовые клетки (CD51 ⁻ CD24 ⁺ CD52 ⁺)	0,912 ± 0,127	12,8 ± 3	0,767 ± 0,241	20 ± 3
Клетки Лейдига (CD51 ⁺)	17,747 ± 1,447	219 ± 28 ●	16,469 ± 0,508	143 ± 16 ●

П р и м е ч а н и е. Результаты представлены от трех независимых серий экспериментов.

* различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$, U-критерий Манна – Уитни),

● различия достоверны по сравнению с исходным содержанием клеток в культуре ($p < 0,05$, U-критерий Манна – Уитни).

Свойства СК и прогениторных клеток были изучены *in vitro*. У олигопотентных предшественников β -клеток (CD45⁻TER119⁻CD133⁺CD49f^{low}) и мультипотентных прогениторных клеток (CD45⁻TER119⁻cKit⁺Flk-1⁻) поджелудочной железы изучали потенциал к самообновлению, клональную активность и дифференцировку в инсулин-продуцирующие β -клетки [26]. У сперматогонияльных стволовых клеток (CD117⁻CD90⁺; CD117⁺CD90⁺; CD51⁻CD24⁺CD52⁺) и прогениторных эндотелиальных клеток (CD45⁻CD31⁺) семенников по методу М. Kanatsu-Shinohara [27] в авторской модификации оценивали потенциал к самообновлению и клональную активность.

По результатам трансплантационного теста определяли эффективность приживления сперматогонияльных СК (CD117⁻CD90⁺; CD117⁺CD90⁺; CD51⁻CD24⁺CD52⁺) и эндотелиальных прекурсоров (CD45⁻CD31⁺) семенников мыш-ей с метаболическими нарушениями (доноры) в тестикулярной ткани мыш-ей с угнетенным бусульфано-м сперматогенезом (реципиенты). Бусульфан реципиентам вводили внутривенно однократно (40 мг/кг) [28–29]. Забор недифференцированных клеток из семенников доноров осуществлялся на 70-е сут от начала моделирования метаболических нарушений. Трансплантацию клеток донора ($\times 10^4$) осуществляли в зону *rete testis* тестикул реципиентов

на 30-е сут после введения бусульфана [28]. На 60-е сут после введения бусульфана мышей-реципиентов этаназировали в CO_2 -камере. Проводили морфологическое исследование тестикулярной ткани, анализ содержания тестостерона в сыворотке крови, гомогенате семенников и количества сперматогонимальных СК, сперматогоний (CD9^+) и прогениторных эндотелиальных клеток в семенниках.

Для статистической обработки данных использовали пакет программного обеспечения Statistica 6.0. Данные представляли в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение, m – стандартная ошибка среднего. Для оценки различий использовали непараметрический критерий Манна – Уитни, а также t -критерий Стьюдента. Различия между показателями в разных группах считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После инъекции стрептозотоцина и жировой диеты в сыворотке крови у самцов мышей линии C57Bl/6 отмечалось достоверное увеличение концентрации триацилглицеролов (на 15%) и липопротеинов очень низкой плотности (на 38%), индекса атерогенности (на 43%) относительно интактного контроля, при этом концентрация липопротеинов высокой плотности, напротив, достоверно снижалась (на 15%). Одновременно с нарушением жирового обмена регистрировалась гипергликемия и нарушение глюкозотолерантного теста, повышение концентрации инсулина и глюкозозависимого инсулинотропного полипептида в сыворотке крови (рис. 1, *a-d*). Дополнительно проводилась оценка индекса Caro и Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance (НОМА-IR) с расчетом по формулам: $\text{Caro} = \text{ГН} / \text{ИН}$ и $\text{НОМА-IR} = (\text{ИН} \times \text{ИГ}) / 22,5$, где ИН – инсулин натощак, мЕ/мл; ГН – глюкоза натощак, ммоль/л (рис. 1, *e-g*) [30], тканевую чувствительность к инсулину определяли по индексу Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKI): $\text{QUICKI} = 1 / (\log \text{ИН} + \log \text{ГН})$ [31]. Из представленных на рис. 1 данных следует, что у животных с метаболическими нарушениями изменялась тканевая чувствительность к глюкозе и развивалась инсулинорезистентность.

Морфологическое исследование тканевых препаратов выявило отек экзокринной части поджелудочной железы, мелко- и средне-капельную жировую дистрофию ацинарных клеток, утолщение и разрастание междольковых перегородок (рис. 2, *a, b*). У мышей опытной группы наблюдалось

снижение количества (на 53%, $p < 0,05$) и площади островков Лангерганса (на 52%, $p < 0,05$), количества островковых клеток (на 52,3%, $p < 0,05$) относительно интактных мышей, при этом в 2,8 раза ($p < 0,05$) возрастало число пикнотизированных клеток. Цитометрическая и иммуногистохимическая оценка антигенов позволила обнаружить сокращение популяции PDX1^+ -клеток и снижение экспрессии инсулина в островках Лангерганса у мышей опытной группы (рис. 2, *c-j*).

Одновременно с диабетическими изменениями у мышей развивались деструктивные изменения канальцевого аппарата семенников: разрежение и снижение количества слоев сперматогенного эпителия в семенных канальцах, отек интерстициальной ткани (рис. 3, *a, b*). В просвете части извитых канальцев обнаруживался клеточный детрит, состоящий из погибших сперматозоидов и сперматид. Изучение половых клеток и фертильности позволило выявить у животных с метаболическими нарушениями астено- и олигозооспермию, а также снижение индекса плодовитости на 64,7% ($p < 0,05$) относительно интактного контроля.

Как известно, ключевым гормоном развития гонад и сперматогенеза является тестостерон [32]. Гормон продуцируется клетками Лейдига и в небольшом количестве – корой надпочечников [33]. По данным представленного исследования стрептозотоцин и жировая диета снижали концентрацию тестостерона в гомогенате (на 10%, $p < 0,05$) и сыворотке крови (на 44,5%, $p < 0,05$) относительно интактного контроля, при этом уменьшалось количество клеток Лейдига (CD51^+) в интерстициальной ткани яичек (на 7,2%), в ряде клеток Лейдига наблюдалась вакуолизация цитоплазмы и гиперхромия ядра (рис. 3, *a, b, e, f*).

Резюмируя изложенное, следует заключить, что моделирование метаболических нарушений вызывает у самцов мышей линии C57Bl/6 нарушения жирового обмена, диабет 2 типа и патологические изменения в репродуктивной системе, что во многом соответствует клинической картине метаболического синдрома. По современным представлениям, неогенез β -клеток и половых клеток поддерживается СК и прогениторными клетками [29]. Согласно данным, полученным при изучении различных популяций предшественников β -клеток, метаболические нарушения у животных сопровождались значительным приростом количества панкреатических олигопотентных предшественников β -клеток ($\text{CD45}^-\text{TER119}^-\text{CD133}^+\text{CD49flow}$), но менее выраженным увеличением числа мультипотентных прогениторных клеток ($\text{CD45}^-\text{TER119}^-\text{cKit}^-\text{Flk-1}^-$) (см. таблицу).

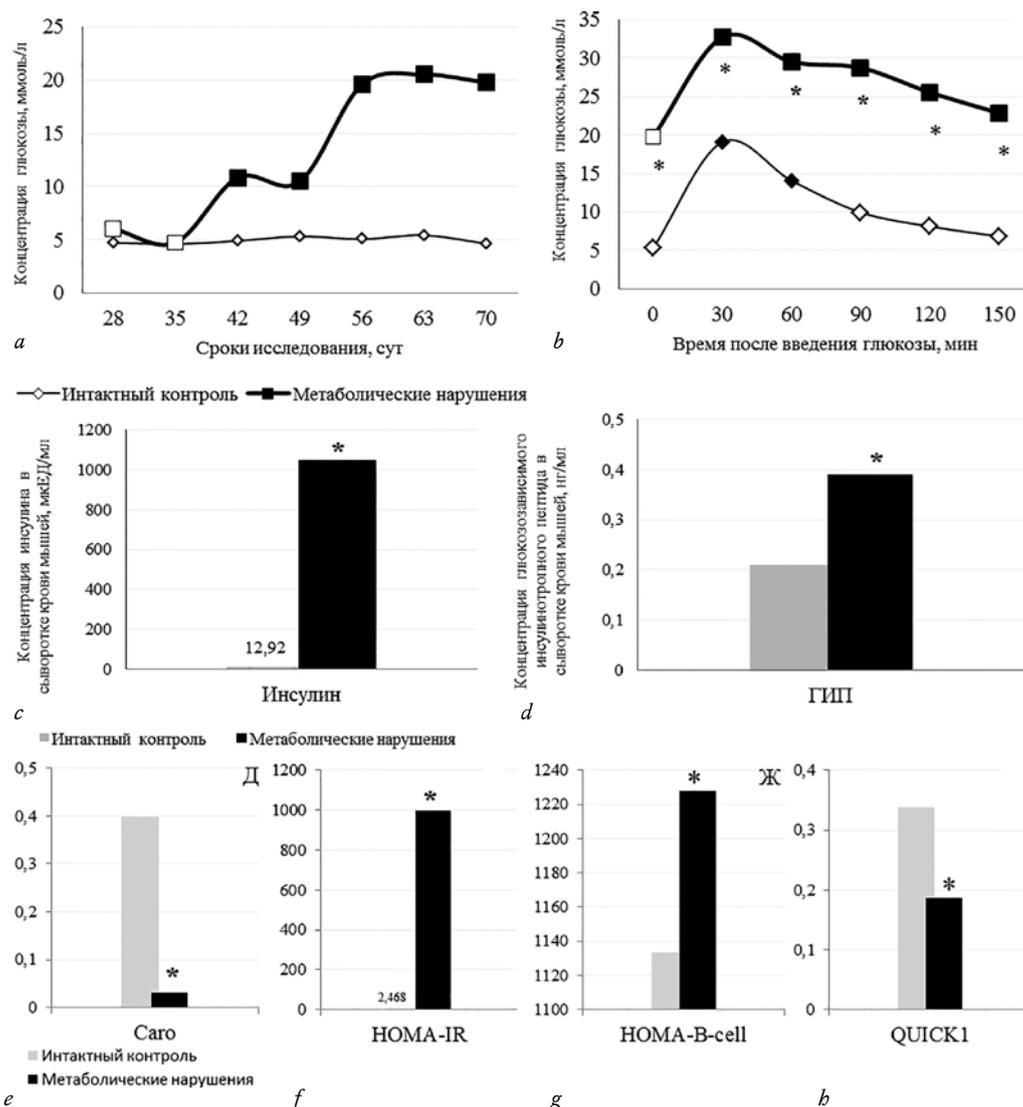
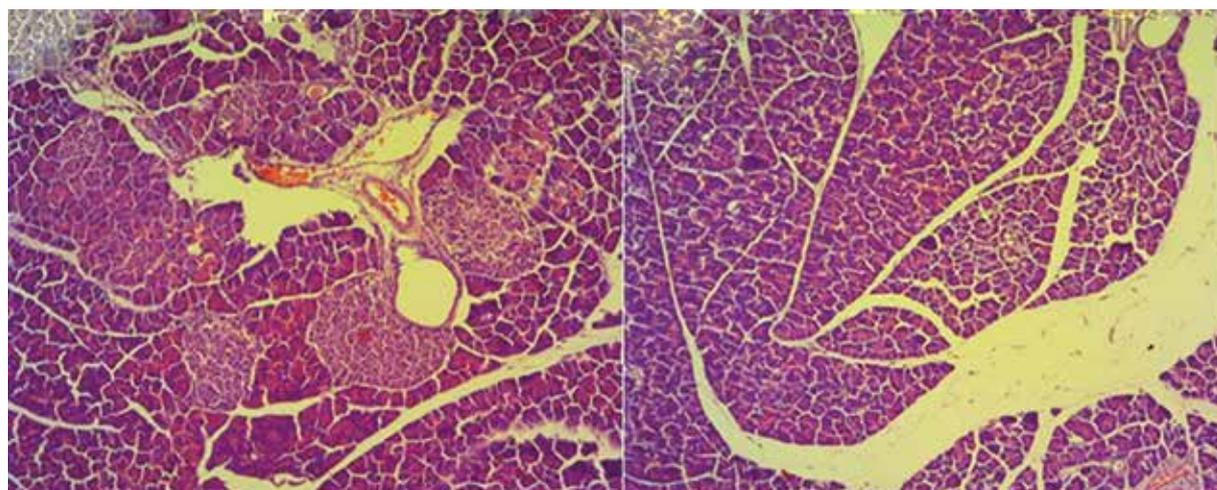


Рис. 1. Уровень глюкозы в сыворотке крови самцов мышей линии C57Bl/6 в условиях моделирования метаболических нарушений в 28–70-е сут эксперимента (a) и при проведении глюкозотолерантного теста на 70-е сут (b); уровень инсулина (c) и глюкозозависимого инсулиотропного полипептида (d) в сыворотке крови, значения индексов Caro (e) и HOMA-IR (f), HOMA-B-cell (g), QUICKI (h), UE, на 70-е сут. Во фрагментах a и b окрашенным символом обозначены статистически значимые различия по сравнению с показателями исходных значений, во фрагментах b–b символом * статистически значимые различия по сравнению с показателями у интактных животных

Fig. 1. The level of glucose in the blood serum of male mice of the C57Bl / 6 line under the conditions of modeling metabolic disorders from the 28th to the 70th day of the experiment (a) and during the glucose tolerance test on the 70th day (b); the level of insulin (c) and the glucose-dependent insulinotropic polypeptide (d) in the serum, and the values of Caro (e) indices and HOMA-IR (f), HOMA-B-cell (g), QUICKI (h), UE, on the 70th day. In a and b fragments, the colored symbol indicates statistically significant differences in comparison with the values of the initial values, in b–b fragments the symbol * means statistically significant differences in comparison with the indices in intact animals

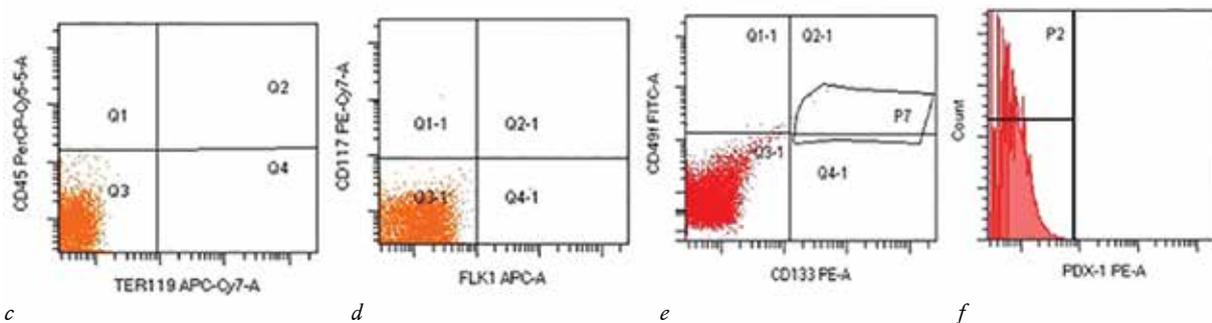
В культуре фракция олигопотентных предшественников β -клеток у подопытных мышей продемонстрировала высокий потенциал к самообновлению. Использование протоколов S. Bonner-Weir et al. [34] и A. Suzuki et al. [35] позволило выявить способность олигопотентных предшественников β -клеток дифференцироваться в направлении инсулин-продуцирующих клеток (дитизон-положительные) в присутствии GLP-1 (7-37) *in*

vitro, при этом дитизон-положительные клетки были способны секретировать инсулин в ответ на глюкозную нагрузку. Следует отметить, что у подопытных мышей интенсивность генерации дитизон-положительных клеток из предшественников β -клеток и уровень инсулина в супернатантах дитизон-положительных клеток значительно превосходили таковые у интактных мышей (в контроле).



a

b

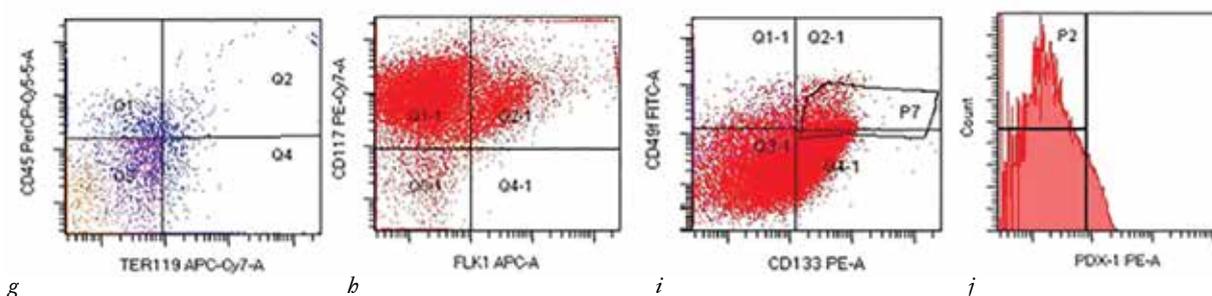


c

d

e

f



g

h

i

j

Рис. 2. Морфологическая картина поджелудочной железы мышей-самцов линии C57Bl/6 контрольной группы (*a*) и с метаболическими нарушениями (*b*) на 70-е сут эксперимента при окрашивании гематоксилином и эозином, $\times 100$. Данные анализа количественной и качественной экспрессии олигопотентных предшественников бета-клеток (CD45⁺ TER119⁺ CD133⁺ CD49^{low}), мультипотентных прогениторных клеток (CD45⁺ TER119⁺ cKit⁺ Flk-1⁺), PDX-1 позитивных клеток на мононуклеарах поджелудочной железы мышей линии C57Bl/6 на 70-е сут эксперимента (*c-j*); *c-f* – дот-плоты и гистограмма изотипического контроля для IgG2a PerCP-Cy 5.5/ IgG2b APC-Cy7; IgG2a APC/ IgG2b APC-Cy7 (*d*); IgG2b FITC/ IgG1 PE (*e*); IgG1 PE (*f*); *g-j* – подтверждение фенотипа и качественный анализ экспрессии CD45 PerCP-Cy 5.5/ TER119 APC-Cy7 (*g*), CD117(c-Kit) APC/ Flk1 APC-Cy7 (*h*); CD49f FITC/ CD133 PE (*i*); гистограмма PDX 1 PE (*j*)

Fig. 2. Morphological pattern of the pancreas of male C57Bl/ 6 mice from the control group (*a*) and metabolic disorders (*b*) on the 70th day of the experiment when stained with hematoxylin and eosin, $\times 100$. Data from the analysis of quantitative and qualitative expression of oligopotent beta precursor cells (CD45⁺ TER119⁺ CD133⁺ CD49^{low}), multipotent progenitor cells (CD45⁺ TER119⁺ cKit⁺ Flk-1⁺), PDX-1 positive cells on pancreatic mononuclears of C57Bl/ 6 on the 70th day of the experiment (*c-j*); *c-f* – dot-plots and histogram of isotypic control for IgG2a PerCP-Cy 5.5 / IgG2b APC-Cy7; IgG2a APC / IgG2b APC-Cy7 (*d*), IgG2b FITC / IgG1 PE (*e*), IgG1 PE (*f*); *g-j* – confirm phenotype and qualitative analysis of CD45 expression PerCP-Cy 5.5 / TER119 APC-Cy7 (*g*), CD117 (c-Kit) APC / Flk1 APC-Cy7 (*h*); CD49f FITC / CD133 PE PDX 1 PE (*j*)

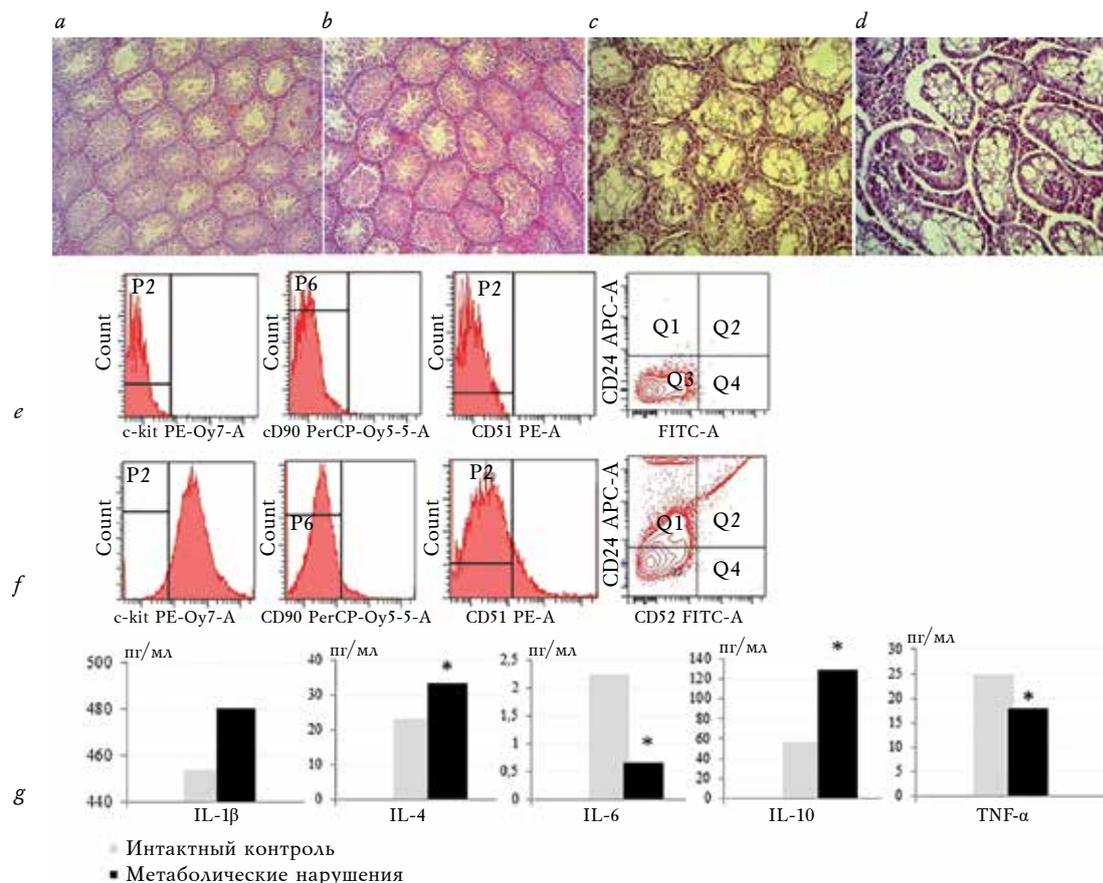


Рис. 3. Морфологическая картина семенников у самцов мышей линии C57Bl/6 контрольной группы (a) и с метаболическими нарушениями (b) на 70-е сут эксперимента при окрашивании гематоксилином и эозином, $\times 100$; у мышей самцов линии C57Bl/6 через 30 сут после введения бусульфана (c) и у мышей-реципиентов в условиях введения бусульфана после трансплантации клеток из семенников мышей-доноров с метаболическими нарушениями (d) при окрашивании гематоксилином и эозином, $\times 200$. Гистограммы и дот-плоты, представляющие данные анализа количественной и качественной экспрессии маркеров сперматогонимальных стволовых клеток с фенотипом c-kit/CD90 и CD51/CD52/CD24 мононуклеаров семенников мышей линии C57Bl/6 (e, f); e – гистограммы и дот-плот изотипического контроля для IgG2b PE-Cy7, IgG2a PerCP-Cy 5.5, IgG1 PE, IgG2b APC/ IgG2a FITC; f – подтверждение фенотипа и качественный анализ экспрессии c-kit(PE-Cy7), CD90(PerCP-Cy5.5), CD51(PE) на гистограммах; CD24(APC)/CD52(FITC) на дот-плоте; g – уровень IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 и TNF- α в гомогенате семенников у мышей с метаболическими нарушениями на 70-е сут эксперимента. * статистически значимые различия по сравнению с показателями интактных животных

Fig. 3. Morphological pattern of testes in male C57Bl / 6 mice of the control group (a) and with metabolic disorders (b) on the 70th day of the experiment when stained with hematoxylin and eosin, $\times 100$; in male C57Bl / 6 mice 30 days after the administration of busulfan (c) and in recipient mice under busulfan administration following transplantation of cells from the testes of donor mice with metabolic disturbances (d) when stained with hematoxylin and eosin, $\times 200$. Histograms and dot-plots presenting the analysis of quantitative and qualitative expression of markers of spermatogonial stem cells with the phenotype of c-kit / CD90 and CD51 / CD52 / CD24 mononuclears of testes of C57Bl / 6 mice (e, f); e – histograms and dot-plot of isotypic control for IgG2b PE-Cy7, IgG2a PerCP-Cy 5.5, IgG1 PE, IgG2b APC / IgG2a FITC; f – phenotype confirmation and qualitative analysis of c-kit expression (PE-Cy7), CD90 (PerCP-Cy5.5), CD51 (PE) on the histograms; CD24 (APC) / CD52 (FITC) on the dot-plot; g – the level of IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 and TNF- α in the testis homogenate in mice with metabolic disturbances on the 70th day of the experiment. * statistically significant differences compared to those of intact animals

Второй класс предшественников, изученный в настоящей работе, относился к сперматогонимальным СК. Как и предшественники β -клеток, популяция сперматогонимальных СК весьма неоднородная и представлена пролиферирующими и дифференцирующимися клетками [36]. В исследовании установлено, что количество пролиферирующих сперматогонимальных СК (CD117-CD90⁺) в семенниках у мышей с метаболическими

нарушениями не изменялось, а число дифференцирующихся сперматогонимальных СК с иммунофенотипом CD117⁺CD90⁺ и CD51-CD24⁺CD52⁺ увеличивалось (см. таблицу). *In vitro* сперматогонимальные СК CD117-CD90⁺ у подопытных мышей активно генерировали колонии и демонстрировали значительный прирост клеточной массы по сравнению с контролем (рис. 3 e, f). В то же время на сперматогонимальные СК культивирова-

ние CD117⁺CD90⁺ и CD51⁻CD24⁺CD52⁺ оказывало ингибирующее действие.

Одним из тестов, позволяющих оценить регенеративный потенциал СК, является трансплантационный тест. В травмированную ткань вводят донорские СК, после чего оценивают их приживание и (или) регенерацию тканей. В настоящей работе сперматогонимальные СК вводились в пораженные бусульфаном семенники самцов мышей C57Bl/6. После введения цитостатика отмечалось падение уровня тестостерона в семенниках (на 82% от интактного контроля), некробиоз, деструкция клеток сперматогенного эпителия и слущивание их в просвет семенных канальцев (рис. 3, *c, d*).

В извитых канальцах отсутствовали все слои сперматогенного эпителия вплоть до базальной мембраны, клетки Сертоли обнаруживались в единичных канальцах, клетки Лейдига в большинстве своем разрушались. Дополнительно бусульфан вызывал гемодинамические нарушения, набухание неклеточных слоев собственной оболочки семенных канальцев, отек и просветление цитоплазматического матрикса миоидных клеток, увеличение площади интерстициальной ткани за счет отека и инфильтрации интерстиция лимфоцитами и макрофагами. Зрелые половые клетки не определялись, количество предшественников уменьшалось (см. таблицу).

На 30-е сут у мышей-реципиентов после введения в их семенники сперматогонимальных СК мышей с метаболическими нарушениями количество клеток с иммунофенотипом CD117⁻CD90⁺ увеличивалось в 4,83 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, прирост числа сперматогонимальных СК CD117⁺CD90⁺ оказался существенно меньше и составил 51% ($p < 0,05$), изменения числа сперматогонимальных СК CD51⁻CD24⁺CD52⁺ были незначительными (см. таблицу). Представленные данные позволяют говорить о том, что обладающие высокой пролиферативной активностью сперматогонимальные СК CD117⁻CD90⁺ эффективно приживаются в пораженных бусульфаном семенниках и активно пролиферируют. Антиген CD117 (c-Kit) является маркером дифференцировки предшественников половых клеток [29]. В этой связи накопление CD117⁺CD90⁺ клеток в бусульфановых семенниках, вероятно, отражает дифференцировку сперматогонимальных СК CD117⁻CD90⁺.

О полноценности регенерации поврежденных тканей судят не только по восстановлению числа и функций специализированных клеток, но и по состоянию микроциркуляторной сети. Морфологические исследования позволили выявить инво-

люцию микрососудистого русла (гиперемия сосудов, сокращение площади микрососудистой сети) поджелудочной железы и семенников у мышей с метаболическими нарушениями. На этом фоне количество клеток-предшественниц гемангиогенеза (CD45⁻TER119⁻cKit⁺Flk-1⁺) в поджелудочной железе увеличивалось в 15 раз ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, в семенниках – в 4,3 раза (см. таблицу). Количество прогениторных эндотелиальных клеток (CD45⁻CD31⁺) в семенниках у подопытных животных возрастало в 2,07 раза ($p < 0,05$). Результаты культуральных исследований и трансплантационный тест продемонстрировали высокий потенциал к самообновлению прогениторных эндотелиальных клеток *in vitro* и эффективное приживание в пораженных бусульфаном семенниках у подопытных мышей.

Таким образом, у самцов мышей C57Bl/6 с метаболическими нарушениями происходит запуск программы регенерации поджелудочной железы и тестикулярной ткани, а также неоваскулогенеза с привлечением СК и прогениторных клеток. Между тем восстановления гистоархитектоники островков Лангерганса и тестикулярной ткани не происходит; напротив, развиваются инфертильность и микрососудистые осложнения. Причину этого можно увидеть в ингибирующем действии диабетических факторов и медиаторов воспаления на сперматогонимальные СК, предшественники β-клеток, прогениторные эндотелиальные клетки и предшественники гемангиогенеза. Подтверждением данного предположения служат результаты ИФА, морфологических, иммуногистохимических и цитометрических исследований.

Развитие моделируемых метаболических нарушений сопровождалось повышением уровня IFN-γ и IL-17 в сыворотке крови, концентрации IL-1β в гомогенате поджелудочной железы и TGF-beta1 и IL-2, 5, 17, 23 в гомогенате семенников (см. рис. 3, *g*). При этом отмечалась инфильтрация тканей подопытных мышей клетками-эффекторами воспаления: поджелудочной железы – CD16⁺-лимфоцитами, семенников – CD45⁺CD90⁺CD31⁺CD34⁻ макрофагами (рис. 3, *d-f*).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При моделировании метаболических нарушений стрептозотоцином и жировой диетой у самцов мышей линии C57Bl/6 изменялся жировой метаболизм и развивалось воспаление в поджелудочной железе и семенниках. Набор воспалительных медиаторов указывал на хронизацию процес-

са воспаления. Во многом факторы воспаления на фоне нарушения жирового обмена вызывали развитие диабетических изменений у животных (гипергликемия и нарушения глюкозотолерантного теста, инсулинорезистентность, патоморфологические изменения поджелудочной железы, уменьшение количества островковых β -клеток).

Между тем значение индекса НОМА В-cell, характеризующий функциональную активность β -клеток [37], в 2,67 раза превосходил таковое у интактных животных на 40-е сут эксперимента. Это указывает на формирование компенсаторной реакции поджелудочной железы в ответ на развитие диабета. Однако к 70-м сут регистрировалось угасание активности β -клеток: у подопытных животных НОМА В-cell составил 108 UE от такового в контроле.

Хроническое воспаление и факторы диабета вызывали развитие нарушений репродуктивной системы у самцов мышей линии C57Bl/6, выражавшиеся в деструктивных изменениях канальцевого аппарата семенников, отеке интестициальной ткани, дегенеративных изменениях в клетках Лейдига, нарушении обмена тестостерона, сокращении площади микрососудистой сети в семенниках, развитии астено-, олигозооспермии и инфертильности.

Одновременно с метаболическими и репродуктивными нарушениями обнаруживалось увеличение числа СК и прогениторных клеток поджелудочной железы и семенников. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* выявлялась значительная активность предшественников гемангиогенеза (CD45⁻TER119⁻cKit⁺Flk-1⁺), прогениторных эндотелиальных клеток (CD45⁻CD31⁺), предшественников инсулин-продуцирующих β -клеток (CD45⁻TER119⁻CD133⁺CD49f^{low}), сперматогонияльных СК (CD117⁻CD90⁺, CD117⁺CD90⁺), признаками которой были: клональная активность, потенциал к самообновлению, дифференцировка в зрелые клетки, эффективное приживление в пораженных цитостатиках тканях. Все перечисленные феномены указывают на запуск программы регенерации поджелудочной железы, тестикулярной ткани и неоваскулогенеза с привлечением СК и прогениторных клеток. Между тем нормализация метаболизма жиров, обмена глюкозы, инсулина и тестостерона, восстановление гистоархитектоники (в том числе микроциркуляторной сети) поджелудочной железы и семенников не наблюдалось. С нашей точки зрения, это связано с ингибирующим действием диабетических факторов и медиаторов воспаления на тканеспецифические СК и прогениторные клетки.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи, и сообщают о вкладе авторов. Пахомова А.В., Першина О.В., Скурихин Е.Г. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных; обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания. Крупин В.А., Ермолаева Л.А., Ермакова Н.Н., Кудряшова А.И., Пан Э.С., Рыбалкина О.Ю. – анализ и интерпретация данных. Дыгай А.М. – проверка критически важного интеллектуального содержания.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено комитетом по этике НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН (протокол № 114062016 от 14.06.2016 г.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают свою признательность генеральному директору ООО «ФАРМИНТЕР-ПРАЙСЕЗ» канд. хим. наук Небольсину Владимиру Евгеньевичу за предоставленные реактивы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Рекомендации экспертов Всероссийского научного общества кардиологов по диагностике и лечению метаболического синдрома. Второй пересмотр // *Практическая медицина*. 2010; 44: 81–101.
2. Rekomendatsii ekspertov Vserossiyskogo nauchnogo obshchestva kardiologov po diagnostike i lecheniyu metabolicheskogo sindroma. Vtoroy peresmotr [Recommendations of the experts of the All-russian scientific society of cardiologists on diagnosis and treatment of metabolic syndrome. Second revision] // *Prakticheskaya meditsina – Practical Medicine*. 2010; 44: 81–101 (in Russian).
3. Мамедов М.Н. Руководство по диагностике и лечению метаболического синдрома: Методические рекомендации. М., 2004: 72.
4. Mamedov M.N. Rukovodstvo po diagnostike i lecheniyu metabolicheskogo sindroma: Metodicheskie rekomendatsii [Manual on diagnosis and treatment of metabolic syndrome: Methodological recommendations]. М., 2004: 72 (in Russian).
5. Чазова И.Е., Мычка В.Б. Метаболический синдром. М.: Медиа Медика, 2004: 168.

- Chazova I.E., Mychka V.B. Metabolicheskiy sindrom [Metabolic Syndrome]. M.: Media Medika Publ., 2004: 168 (in Russian).
4. Кравец Е.Б., Самойлова Ю.Г., Матюшева Н.Б., Буланова А.А., Дорохова В.В., Ядмаа О. Метаболический синдром в общеврачебной практике // Бюллетень сибирской медицины. 2008; 1: 80–87.
 - Gravets E.B., Samoylova Yu.G., Matyusheva N.B., Bulanova A.A., Dorokhova V.V., Yadmaa O. Metabolicheskiy sindrom v obshchevrachebnoy praktike [Metabolic syndrome in general medical practice] // *Byulleten' sibirskoy meditsiny – Bulletin of Siberian Medicine*. 2008; 1: 80–87 (in Russian).
 5. Тишова Ю.А., Калинин С.Ю. Роль коррекции гипогонадизма в лечении метаболического синдрома у мужчин и аспекты безопасности терапии препаратом тестостерона пролонгированного действия // Ожирение и метаболизм. 2010; 2: 36–43.
 - Tishova Yu.A., Kalinchenko S.Yu. Rol' korrektsii gipogonadizma v lechenii metabolicheskogo sindroma u muzhchin i aspekty bezopasnosti terapii preparatom testosterona prolongirovannogo deystviya [The role of correction of hypogonadism in the treatment of metabolic syndrome in men and safety aspects of testosterone with prolonged action] // *Ozbirenie i metabolism – Obesity and Metabolism*. 2010; 2: 36–43 (in Russian).
 6. Бутрова С.А., Дзогоева Ф.Х. Висцеральное ожирение – ключевое звено метаболического синдрома // *Ожирение и метаболизм*. 2004; 1: 10–16.
 - Butrova S.A., Dzogoeva F.Kh. Vistseral'noe ozhirenie – klyuchevoe zveno metabolicheskogo sindroma [The role of correction of hypogonadism in the treatment of metabolic syndrome in men and aspects of safety of therapy with a long-acting testosterone drug] // *Ozbirenie i metabolism – Obesity and Metabolism*. 2004; 1: 10–16 (in Russian).
 7. Мкртумян А.М. Особенности течения и лечения нарушений углеводного обмена при метаболическом синдроме // *Сердце*. 2005; 4–5 (23): 273–276.
 - Mkrtumyan A.M. Osobennosti techeniya i lecheniya narusheniy uglevodnogo obmena pri metabolicheskom sindrome [Features of the course and treatment of disorders of carbohydrate metabolism in metabolic syndrome] // *Serditse – Russian Heart Journal*. 2005; 4–5 (23): 273–276 (in Russian).
 8. Мамедов М.Н. Возможны ли диагностика и лечение метаболического синдрома в реальной практике? // *Лечащий врач*. 2006; 6: 34–39.
 - Mamedov M.N. Vozmozhny li diagnostika i lechenie metabolicheskogo sindroma v real'noy praktike? [Is it possible to diagnose and treat the metabolic syndrome in real practice?] // *Lechashchiy vrach*. 2006; 6: 34–39 (in Russian).
 9. Rask-Madsen C., Kahn C. R. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome and cardiovascular disease // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012; 32 (9): 2052–2059. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.241919.
 10. Урясьев О.М., Горбунова Д.Ю., Щербак О.Н., Пыко А.А. Метаболический синдром – нерешенная проблема медицины и современного общества // *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. 2017; 16 (1): 160–164.
 - Uryas'ev O.M., Gorbunova D.Yu., Shcherbakova O.N., Pyko A.A. Metabolicheskiy sindrom – nereshennaya problema meditsiny i sovremennogo obshchestva [Metabolic syndrome - the unresolved problem of medicine and modern society] // *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoy meditsinskoj akademii*. 2017; 16 (1): 160–164 (in Russian).
 11. Mamedov M., Suslonova N., Lisenkova I. Metabolic syndrome prevalence in Russia: Preliminary results of a cross-sectional population study // *Diab. Vasc. Dis. Res.* 2007; 4(1): 46–47.
 12. Волков В.П. Метаболический синдром: история вопроса // *Universum: медицина и фармакология*. 2017; 38 (4): 36–45.
 - Volkov V.P. Metabolicheskiy sindrom: istoriya voprosa [Metabolic syndrome: the history of the issue] // *Universum: meditsina i farmakologiya*. 2017; 38 (4): 36–45 (in Russian).
 13. Метаболический синдром / под ред. чл.-корр. РАМН Г.Е. Ройтберг. М.: МЕД Пресс-информ. 2007: 224.
 - Metabolicheskiy sindrom [Metabolicheskiy sindrom] / pod red. chl.-korr. RAMN G.E. Roytberg. M.: MED Press-inform Publ., 2007: 224 (in Russian).
 14. Ольховский Д.В. Гиперурикемия и метаболический синдром у больных хронической сердечной недостаточностью // *Медицина сегодня и завтра*. 2007; 3: 82–86.
 - Ol'khovskiy D.V. Giperurikemiya i metabolicheskiy sindrom u bol'nykh khronicheskoy serdechnoy nedostatochnost'yu [Hyperuricemia and metabolic syndrome in patients with chronic heart failure] // *Meditsina segodnya i zavtra*. 2007; 3: 82–86 (in Russian).
 15. Мамедов М. Н. Школа по диагностике и лечению гиперлипидемий: пособие для врачей. М.: Изд. Пфайзер, 2007: 317.
 - Mamedov M. N. Shkola po diagnostike i lecheniyu giperlipidemiy (Posobie dlya vrachey) [School for the diagnosis and treatment of hyperlipidemia: a manual for doctors]. M.: Izd. Pfayzer Publ., 2007: 317 (in Russian).
 16. Оганов Р.Г. Современные представления о метаболическом синдроме: понятие, эпидемиология, риск развития сердечно-сосудистых осложнений и сахарного диабета // *Международный эндокринологический журнал*. 2008; 6 (18): 15–21.
 - Oganov R.G. Sovremennye predstavleniya o metabolicheskom sindrome: ponyatie, epidemiologiya, risk razvitiya serdechno-sosudistyx oslozhneniy i sakharnogo diabeta [Modern concepts of the metabolic syndrome: concept, epidemiology, risk of cardiovascular complications and diabetes mellitus, International] // *Mezhdunarodnyy endokrinologicheskiy zhurnal – Endocrinology Journal*. 2008; 6 (18): 15–21 (in Russian).

17. Wespes E. Metabolic syndrome and hypogonadism // *European Urology Supplements*. 2013; 12 (2): 2–6. DOI: 10.1016/j.eursup.2013.03.003.
18. Калинин С.Ю., Тишова Ю.А. Роль коррекции гипогонадизма в лечении метаболического синдрома у мужчин // *Ожирение и метаболизм*. 2006; 2: 48–51.
- Kalinchenko S.Yu., Tishova Yu.A. Rol' korrektsii gipogonadizma v lechenii metabolicheskogo sindroma u muzhchin [The role of correction of hypogonadism in the treatment of metabolic syndrome in men] // *Ozbirenie i metabolism — Obesity and Metabolism*. 2006; 2: 48–51 (in Russian).
19. Оранская А.Н., Романова Е.В., Мкртумян А.М. Значение инсулинрезистентности в нарушении половой функции мужчин (обзор) // *Вестник новых медицинских технологий*. 2009; 16 (1): 55–56.
- Oranskaya A.N., Romanova E.V., Mkrtumyan A.M. Znachenie insulinrezistentnosti v narushenii polovoy funktsii muzhchin (obzor) [The importance of insulin resistance in the violation of men's sexual function (review)] // *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2009; 16 (1): 55–56 (in Russian).
20. Савельева Л.В., Роживанов Р.В., Шурдумова Б.О., Фадеев В.В. Нормогонадотропный гипогонадизм у мужчин с ожирением // *Ожирение и метаболизм*. 2009; 3: 39–42.
- Savel'eva L.V., Rozhivanov R.V., Shurdumova B.O., Fadeev V.V. Normogonadotropnyy gipogonadizm u muzhchin s ozhireniem [Normogonadotropic hypogonadism in obese men] // *Ozbirenie i metabolism — Obesity and Metabolism*. 2009; 3: 39–42 (in Russian).
21. Ebrahimi F., Christ-Crain M. Metabolic syndrome and hypogonadism--two peas in a pod // *Swiss. Med. Wkly*. 2016; 21 (146): 14283. DOI: 10.4414/smw.2016.14283.
22. Gorbachinsky I., Akpınar H., Assimos D.G. Metabolic syndrome and urologic diseases // *Rev. Urol*. 2010; 12 (4): 157–180. DOI: 10.3909/riu0487.
23. Роживанов Р.В., Яшина Ю.Н. Аспекты применения андрогенной заместительной терапии при лечении гипогонадизма у мужчин с сахарным диабетом и метаболическом синдромом // *Ожирение и метаболизм*. 2015; 12 (1): 11–14.
- Rozhivanov R.V., Yashina Yu.N. Aspekty primeneniya androgennoy zamestitel'noy terapii pri lechenii gipogonadizma u muzhchin s sakharnym diabetom i metabolicheskom sindromom [Aspects of androgen replacement therapy in the treatment of hypogonadism in men with diabetes mellitus and metabolic syndrome] // *Ozbirenie i metabolism — Obesity and Metabolism*. 2015; 12 (1): 11–14 (in Russian).
24. Дыгай А.М., Скурихин Е.Г., Ермакова Н.Н., Пахомова А.В., Першина О.В., Крупин В.А., Кудряшова А.И. Пат. 2611936 RU, МПК G09B 23/28. Способ моделирования гипогонадизма, вызванного метаболическими нарушениями. № 2016105189; Заявл. 16.02.2016; Оpubл. 01.03.2017. Бюл. № 7.
- Dygay A.M., Skurikhin E.G., Ermakova N.N., Pakhomova A.V., Pershina O.V., Krupin V.A., Kudryashova A.I. Pat. 2611936 RU, MPK G09B 23/28. Sposob modelirovaniya gipogonadizma, vyzvannogo metabolicheskimi narusheniyami [Method for modeling hypogonadism caused by metabolic disorders]. № 2016105189; Zayavl. 16.02.2016; Opubl. 01.03.2017. Byul. № 7 (in Russian).
25. Skurikhin E.G., Pakhomova A.V., Ermakova N.N., Pershina O.V., Pan E.S., Ermolaeva L.A., Kudryashova A.I., Krupin V.A., Rybalkina O.Y., Dygai A.M. Response of stem and progenitor cells to testicular ischemia // *Bull. Exp. Biol. Med*. 2016; 161(4): 523–528. DOI: 10.1007/s10517-016-3452-9.
26. Skurikhin E.G., Ermakova N.N., Khmelevskaya E.S., Pershina O.V., Krupin V.A., Ermolaeva L.A., Dygai A.M. Differentiation of pancreatic stem and progenitor β -cells into insulin secreting cells in mice with diabetes mellitus // *Bull. Exp. Biol. Med*. 2014; 156 (6): 726–730. DOI: 10.1007/s10517-014-2434-z.
27. Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Inoue K., Ogura A., Toyokuni S, Honjo T, Shinohara T. Allogeneic Offspring Produced by Male Germ Line Stem Cell Transplantation into Infertile Mouse Testis // *Biol. Reprod*. 2003; 69: 612–616. DOI: 10.1095/biolreprod.102.008516.
28. Ogawa T., Aréchaga J.M., Avarbock M.R., Brinster R.L. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules // *Int. J. Dev. Biol*. 1997; 41: 111–122. PMID: 9074943.
29. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. Т. 2; под ред. М.А. Пальцева. М.: Медицина, 2009: 456.
- Biologiya stvolovykh kletok i kletochnye tekhnologii. T. 2. pod red. M.A. Pal'tseva [Cell Biology and Cell Technologies. V. 2 / ed. M.A. Paltseva]. M.: Meditsina Publ., 2009: 456 (in Russian).
30. Mari A., Akiren B., Pacini G. Assessment of insulin secretion in relation to insulin resistance // *Curr. Opin. Clin. Metab. Care*. 2005; 8 (5): 529–533. DOI: 10.4103/2230-8210.146874.
31. Katz A., Nambi S., Mather K., Baron A., Follman D., Sullivan G., Quon M. Quantitative insulin sensitivity check index: A Simple Accurate Method for Assessing Insulin Sensitivity in Humans // *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2000; 85 (7): 2402–2410. DOI: 10.1210/jcem.85.7.6661.
32. Zheng Y., Zhang Y., Qu R., He Y., Tian X., Zeng W. Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects // *Reproduction*. 2014; 147: 65–74. DOI: 10.1530/REP-13-0466.
33. Zang Z. J., Wang J., Chen Z., Zhang Y., Gao Y., Su Z., Tuo Y., Liao Y., Zhang M., Yuan Q., Deng C., Jiang M. H., Xiang A. P. Regenerative Medicine Transplantation of CD51+ Stem Leydig cells: A New Strategy for the Treatment of Testosterone Deficiency // *Stem Cells*. 2017; 35(5): 1222–1232. DOI: 10.1002/stem.2569.
34. Bonner-Weir S., Taneja M., Weir G.C., Tatarkiewicz K., Song K.H., Sharma A., O'Neil J.J. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue // *Proc*.

- Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97 (14): 7999–8004. PMID: 10884429
35. Suzuki A., Nakauchi H., Taniguchi H. Prospective Isolation of Multipotent Pancreatic Progenitors Using Flow-Cytometric Cell Sorting // *Diabetes.* 2004; 53(8): 2143–2152. PMID: 15277399.
36. Zhang M., Zhou H., Zheng C. Xiao J., Zuo E., Liu W., Xie D., Shi Y., Wu C., Wang H., Li D., Li J. The Roles of Testicular C-kit Positive Cells in De novo Morphogenesis of Testis // *Scientific Reports.* 2014; 4: 5936. DOI: 10.1038/srep05936.
37. Matthews D.R., Hosker J.P., Rudenski A.S. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and b-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man // *Diabetologia.* 1985; 28: 412–419. DOI: 10.1007/bf00280883.

Поступила в редакцию 27.06.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Пахомова Ангелина Владимировна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория регенеративной фармакологии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Першина Ольга Викторовна, д-р мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория регенеративной фармакологии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Крупин Вячеслав Андреевич, канд. мед. наук, лаборант-исследователь, лаборатория регенеративной фармакологии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Ермолаева Любовь Александровна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория лекарственной фармакологии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Ермакова Наталия Николаевна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория регенеративной фармакологии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Кудряшова Анастасия Игоревна, аспирант, лаборатория регенеративной фармакологии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Дыгай Александр Михайлович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, науч. руководитель учреждения, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Пан Эдгар Сергеевич, лаборант-исследователь, лаборатория регенеративной фармакологии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Рыбалкина Ольга Юрьевна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, лаборатория онкофармакологии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Скурихин Евгений Германович, д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией регенеративной фармакологии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

✉ Пахомова Ангелина Владимировна, e-mail: angelinapakhomova2011@gmail.com.

УДК 616.37-098-003.93:615.38

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-220–232

For citation: Pakhomova A.V., Pershina O.V., Krupin V.A., Ermolaeva L.A., Ermakova N.N., Kudryashova A.I., Dygai A.M., Pan E.S., Rybalkina O.Yu., Skurikhin E.G. The role of stem and progenitor cells in the regeneration of the pancreas and testes in metabolic disorders. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2017; 16 (4): 220–232.

The role of stem and progenitor cells in the regeneration of the pancreas and testes in metabolic disorders

Pakhomova A.V., Pershina O.V., Krupin V.A., Ermolaeva L.A., Ermakova N.N., Kudryashova A.I., Dygai A.M., Pan E.S., Rybalkina O.Yu., Skurikhin E.G.

*Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (GRIPRM), Tomsk National Research Medical Centre (TNRMC), Russian Academy of Sciences (RAS)
3, Lenin Str., Tomsk, 634028, Russian Federation*

ABSTRACT

The aim of this research was to investigate the regenerative potential of stem and progenitor cells derived from the pancreas and testes in metabolic disorders.

Materials and methods. The experiments were performing on C57Bl/6 mice. Metabolic disorders (MD) were modeling by streptozotocin and fat diet. Morphological methods were used to assess morphopathological changes in the pancreas and testicular tissue and fertility. We investigated the insulin expression in the islets of Langerhans, CD16 in testes by immunohistochemical methods. We evaluated the blood lipids, level of glucose, inflammatory mediators, testosterone and a glucose-dependent insulintropic polypeptide levels in biological samples by biochemical methods and ELISA. We used cytometric methods to study the surface markers of stem and progenitor cells, culture methods and transplantation test to investigate the regenerative potential of stem and progenitor cells.

Results. After streptozotocin injection and fatty diet we observed the metabolic imbalance of lipids, testosterone, glucose and insulin resistance in C57BL/6 male mice. The inflammation, type 2 diabetes, asthenozoospermia were developed and the fertility index was decreased after the metabolic disorders. We observed the increase of oligopotent β -cell precursors (CD45⁺TER119⁻CD133⁺CD49f^{low}) and precursors of hemangiogenesis (CD45⁺TER119⁻cKit-1⁺Flk-1⁺) count in the pancreas, spermatogonial stem cells (CD117⁺CD90⁺ and CD117⁺CD90⁺) and precursors of hemangiogenesis (CD45⁺TER119⁻cKit-1⁺Flk-1⁺) in the testes in MD. Stem and progenitor cells had a high clonal activity and self-renewal capacity, the ability to differentiate into mature cells in vitro, the effective engraftment in injured tissue.

Conclusions. In experiments in vitro and in vivo we detected a high regenerative potential of precursors of hemangiogenesis and insulin-producing β -cells, spermatogonial stem cells of C57BL/6 male mice with metabolic disorders. Low rates of regeneration of the microvasculature, insulin-producing β -cells and germ cells in metabolic disorders are associated with the inhibitory effect of diabetic factors and inflammation on stem and progenitor cells.

Key words: metabolic disorders, inflammation, diabetes mellitus, hypogonadism, spermatogonial stem cells, precursors of hemangiogenesis, precursors of β -cells, regeneration.

Received June 27.2017

Accepted November 08.2017

Pakhomova Angelina V., PhD, Researcher, Laboratory of Regenerative Pharmacology, GRIPRM, TNRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

Pershina Olga V., DM, Senior Researcher, Laboratory of Regenerative Pharmacology, GRIPRM, TNRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

Krupin Vyacheslav A., PhD, Researcher, Laboratory of Regenerative Pharmacology, GRIPRM, TNRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

Ermolaeva Lybov A., PhD, Researcher, Laboratory of Drug Toxicology, GRIPRM, TNRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

Ermakova Natalia N., PhD, Researcher, Laboratory of Regenerative Pharmacology, GRIPRM, TNRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

Kudryashova Anastasia I., Graduate Student, Laboratory of Regenerative Pharmacology, GRIPRM, TNRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

Dygai Alexander M., DM, Professor, Academician of RAS, Scientific Head of Institute, GRIPRM, TNRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

Pan Edgar S., Junior Researcher, Laboratory of Regenerative Pharmacology, GRIPRM, TNRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

Rybalkina Olga Yu., PhD, Researcher, Laboratory of Oncopharmacology, GRIPRM, TNRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

Skurikhin Evgenii G., DM, Professor, Head of the Laboratory of Regenerative Pharmacology, GRIPRM, TNRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

✉ **Pakhomova Angelina V.**, e-mail: angelinapakhomova2011@gmail.com.