Οντογένεση και διαφοροποίηση των παγκρεατικών νησιδίων

04

Α. ΓΑΒΑΛΑΣ[1], Α.Ν. ΜΑΡΓΙΩΡΗΣ[2]

Stem Cell Developmental Biology Laboratory, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens[1] and Clinical Chemistry Laboratory, School of Medicine, University of Crete[2], Greece

Ανατομία και φυσιολογία των παγκρεατικών νησιδίων

Τα παγκρεατικά νησίδια ανακαλύφθηκαν από τον Γερμανό παθολογοανατόμο Paul Langerhans το 1869. Αποτελούν το 1 με 2% της ολικής μάζας του παγκρέατος με βάρος (περίπου 1.5 γραμμαρίων). Στο φυσιολογικό ανθρώπινο παγκρεατικό ιστό υπάρχουν περίπου ένα εκατομμύριο νησίδια. Σε ιστολογικές τομές τα νησίδια εμφανίζονται ως ωχρές συγκεντρώσεις κυττάρων περικυκλωμένα από μια θάλασσα σκουρόχρωμων κυττάρων της εξωκρινούς μοίρας. Περιφερικά των νησιδίων υπάρχουν πυκνά δίκτυα αγγείων και συμπαθητικών και παρασυμπαθητικών νευρώνων. Τα παγκρεατικά νησίδια είναι τμήμα του διάχυτου νευρο-ενδοκρινικού συστήματος του γαστρεντερικού σωλήνα (diffuse neuroendocrine system, DNES). Τα κύτταρα αυτά συνθέτουν πρόδρομες μορφές νευροδιαβιβαστών και ως εκ τούτου χαρακτηρίζονται και ως APUD (amine precursor uptake with decarboxylation) κύτταρα. Τα νησίδια αποτελούνται από τουλάχιστον πέντε τύπους ενδοκρινικών κυττάρων. Τα άλφα κύτταρα που παράγουν την γλυκαγόνη (15-20% του ολικού αριθμού των κυττάρων των νησιδίων), τα βήτα κύτταρα που αποτελούν την πλειονότητα των κυττάρων (70%), συγκεντρώνονται στο κέντρο των νησιδίων, και παράγουν ινσουλίνη και αμυλίνη, τα δέλτα κύτταρα που παράγουν σωματοστατίνη (3-10%), τα F ή PP κύτταρα που παράγουν το παγκρεατικό πολυπεπτίδιο (3-5%) και τα E κύτταρα που παράγουν γκρελίνη (<1%) (Andralojc et al, 2008). Τα κύτταρα των νησιδίων έχουν υποδοχείς των προϊόντων των γειτονικών τους κυττάρων επιτρέποντας έτσι παρακρινικές αλληλεπιδράσεις που αποσκοπούν στον συντονισμό της απάντησης ενός νησιδίου σαν αυτόνομο όργανο. Για παράδειγμα, η ινσουλίνη και η αμυλίνη καταστέλλουν λειτουργίες των άλφα κυττάρων, η γλυκαγόνη ενεργοποιεί τα βήτα και δέλτα κύτταρα ενώ η σωματοστατίνη αναστέλλει λειτουργίες των άλφα και βήτα κυττάρων. Τα βήτα κύτταρα κάθε νησιδίου συγχρονίζονται πιο δυναμικά στην παραγωγή και έκκριση ινσουλίνης με κυτταροπλασματικές γέφυρες (gap junctions) που συνδέουν όλα τα βήτα κύτταρα ενός νησιδίου σε ένα δίκτυο

(Kitsou-Mylona et al, 2008).

Ινσουλινοάντοχος διαβήτης και βήτα κύτταρα

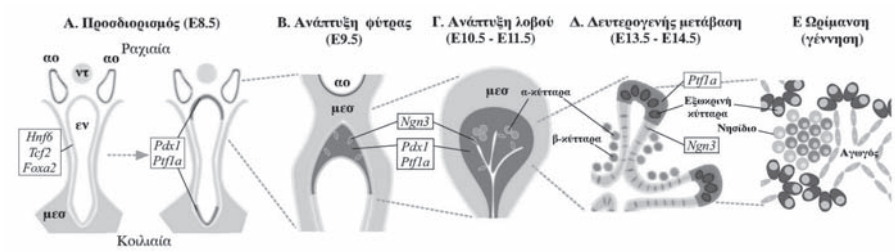
Είναι πλέων γνωστό ότι στον ενήλικα, η αρχική κλινικο-εργαστηριακή διάγνωση υπεργλυκαιμίας σημαίνει ότι ήδη έχουν χαθεί περισσότερο από το 50% των βήτα κυττάρων των παγκρεατικών νησιδίων και ότι η απώλεια των υπόλοιπων 50% είναι ζήτημα ελάχιστων ετών. Τα γεγονότα αυτά και οι δυσκολίες στις μεταμοσχεύσεις νησιδίων ως θεραπεία ινσουλινοπενικών διαβητικών (Reers et al, 2008) οδήγησαν σε επιτάχυνση των ερευνητικών προσπαθειών για να γίνει κατανοητό πως αποπίπτουν τα βήτα κύτταρα και πως αντικαθίστανται από προγονικά νευρο-ενδοκρινικά κύτταρα του παγκρέατος (Oliver-Krasinski and Stoffers, 2008; Leung et al, 2008; Wen et al, 2008; Manisha et al, 2009).

Οντογένεση των παγκρεατικών νησιδίων

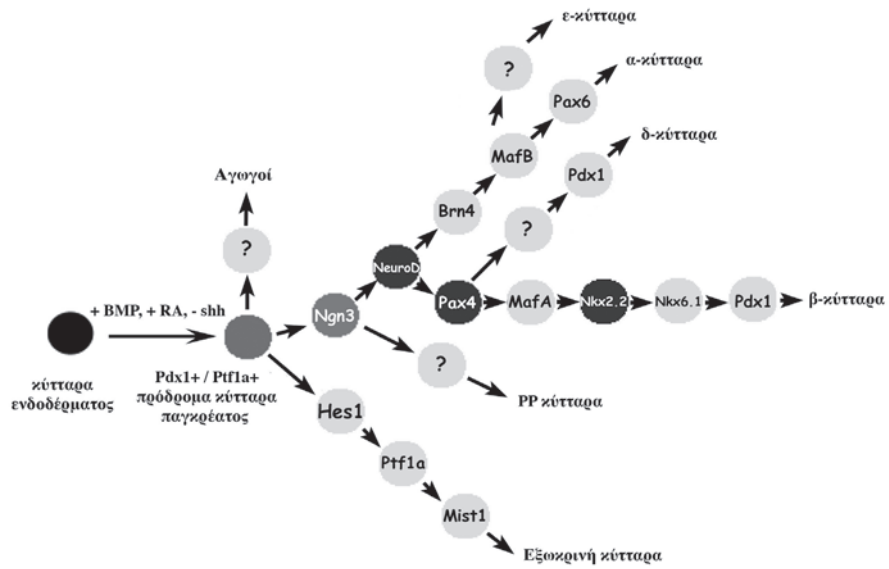
Η οντογένεση του παγκρέατος είναι στενά συνδεμένη με το ρόλο του στον οργανισμό ο οποίος είναι διττός: (α) για την παραγωγή πεπτικών ενζύμων από τα εξοκρινή κύτταρα και την έκκρισή τους στο πεπτικό σωλήνα μέσω του δικτύου των αγωγών κυττάρων (β) την ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Έτσι συχνά το πάγκρεας περιγράφεται σαν δύο όργανα στη συσκευασία του ενός. Το πάγκρεας είναι παράγωγο της ενδοδερμικής βλαστικής στοιβάδας που δημιουργείται με την γαστριδίωση. Δημιουργείται από δύο λοβούς που εμφανίζονται αρχικά σαν φύτρες στην ραχιαία και κοιλιαία πλευρά συγκεκριμένης περιοχής του πρώιμου πεπτικού σωλήνα. Η περιοχή αυτή ορίζεται αρχικά από συγκεκριμένο προφίλ έκφρασης (ύπαρξη ή όχι έκφρασης, επίπεδα έκφρασης) μεταγραφικών παραγόντων (Hox, Hex, Cdx,) οι οποίοι ορίζουν την κυτταρική ταυτότητα πάνω στον εμπρόσθιο / οπίσθιο άξονα.

Ο συνδυασμός εξωκυττάριων σημάτων που προέρχονται από παρακείμενους ιστούς (αορτή, νωτοχορδή, μεσόδερμα, μεσέγχυμα) επάγει το γενετικό πρόγραμμα των πρόδρομων παγκρεατικών κυττάρων που θα μπορούσαν να θεωρηθούν σαν εμβρυικά παγκρεατικά βλαστοκύτταρα γιατί αυτά θα δημιουργήσουν ολόκληρο το πάγκρεας. Λόγω της διαφορετικής θέσης τους σε σχέση με τους παρακείμενους ιστούς τα γενετικά προγράμματα των δύο λοβών δεν είναι πανομοιότυπα αλλά συγκλίνουν στα ουσιαστικά τους σημεία και αυτά θα περιγράψουμε εν συντομία. Έχει δειχθεί ότι η συνδυασμένη δράση ρετινοϊκού οξέος, μορφογενετικών πρωτεϊνών των οστών και η καταστολή του sonic hedgehog είναι απαραίτητες προϋποθέσεις για τον προσδιορισμό της μοίρας των πρόδρομων παγκρεατικών κυττάρων που χαρακτηρίζονται από την ταυτόχρονη έκφραση δυο σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων των Pdx1 και Ptf1a. Καθώς η ανάπτυξη του πρώιμου παγκρέατος προχωράει οι λοβοί μεγαλώνουν, διακλαδώνονται, εισβάλουν στο γειτονικό παρέγχυ-

μα και τελικά ενώνονται μεταξύ τους. Τα Pdx1+ / Ptf1a + πρόδρομα παγκρεατικά κύτταρα οργανώνονται σε διακλαδωμένο επιθήλιο από το οποίο θα προέλθουν τόσο τα ενδοκρινή και εξωκρινή κύτταρα όσο και τα κύτταρα των αγωγών. Σε αυτό το στάδιο και μέσα στο επιθήλιο εμφανίζονται οι πρόδρομοι των ενδοκρινών κυττάρων σαν κύτταρα που εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα Ngn3 ο οποίος είναι απόλυτα απαραίτητος για τη δημιουργία της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος. Τα Ngn3+ κύτταρα είναι λίγα στα αρχικά στάδια του αναπτυσσόμενου οργάνου, αυξάνονται δραματικά στο μέσο της εμβρυϊκής ανάπτυξης και τελικά σχεδόν εξαφανίζονται πριν την γέννηση. Καθώς τα πρόδρομα κύτταρα του ενδοκρινούς παγκρέατος διαφοροποιούνται, καταστέλλουν την έκφραση του Ngn3, μεταναστεύουν έξω από το επιθήλιο και σχηματίζουν πρωτογενή νησίδια. Είναι σημαντικό να σημειώσουμε ότι το φάσμα της ενδοκρινούς διαφοροποίησης αλλάζει κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης με τα α κύτταρα να παράγονται νωρίς, ενώ οι άλλοι ενδοκρινείς κυτταρικοί τύποι, των β κυττάρων συμπεριλαμβανομένων, παράγονται σε μεγάλους αριθμούς αρκετά αργότερα. Μεγάλοι αριθμοί β κυττάρων παράγονται ταυτόχρονα με τα κύτταρα των αγωγών κατά τη διάρκεια της λεγόμενης δευτερογενούς μετάβασης του παγκρέατος. Τα παραγόμενα ενδοκρινή κύτταρα δεν διαιρούνται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης αλλά λίγο πριν την γέννηση εμφανίζουν πολύ χαμηλούς ρυθμούς διαίρεσης οι οποίοι διατηρούνται και στον ενήλικο. Γενετικές μελέτες κυρίως στον ποντικό έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη ενός μεγάλου αριθμού μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στο καθορισμό της μοίρας των ενδοκρινών κυττάρων και στο καθορισμό των αλληλεπιδράσεων τους. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1 κάποιοι χρησιμοποιούνται αποκλειστικά στη δημιουργία ενός τύπου κυττάρων ενώ άλλοι εμπλέκονται στη δημιουργία περισσότερων. Εξάλλου, κάποιοι μεταγραφικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στα αρχικά στάδια προσδιορισμού καταστέλλονται και ενεργοποιούνται ξανά στα ώριμα κύτταρα. Έχει ενδιαφέρον να σημειώσουμε ότι τα περισσότερα από τα γονίδια που έχουν ενοχοποιηθεί στον διαβήτη που εμφανίζεται με ενηλικίωση των νέων (maturity onset diabetes of the young - MODY) ανήκουν σε αυτή την τελευταία κατηγορία. Αυτός ο τύπος διαβήτη είναι μονογονιδιακός και προκύπτει από δυσλειτουργία των ώριμων β-κυττάρων και όχι από αντίσταση στη γλυκόζη. Πέρα από ορισμένες σημειακές μεταλλάξεις της γλυκοκινάσης (GCK; MODY2) που επίσης συνδέονται με αυτή τη μορφή διαβήτη όλες οι άλλες σημειακές μεταλλάξεις βρίσκονται στα γονίδια μεταγραφικών παραγόντων HNF4A (MODY1), HNF1A (MODY3), PDX1 (MODY4), HNF1B (MODY5), NEUROD (MODY6) που εμπλέκονται στην οντογένεση του παγκρέατος τόσο σε πρώιμα στάδια όσο και στα ώριμα β-κύτταρα.



Σχήμα 1. Τα στάδια της ανάπτυξης του παγκρέατος. (Α) Κάθετη διατομή στη περιοχή του πρωτογενούς πεπτικού σωλήνα όπου θα δημιουργηθεί το πάγκρεας. (Β) Κάθετη διατομή στη περιοχή της ραχιαίας φύτρας του αναπτυσσόμενου παγκρέατος. (Γ) Τομή του αναπτυσσόμενου λοβού. (Δ) Ενδοκρινή κύτταρα μεταναστεύουν έξω από το παγκρεατικό επιθήλιο προκειμένου να δημιουργήσουν τα πρωτογενή νησίδια. (Ε) Τα κύτταρα του ώριμου παγκρέατος. αο αορτή, ντ νωτοχορδή, μεσ μεσέγχυμα.



Σχήμα 1. Τα στάδια της ανάπτυξης του παγκρέατος. (Α) Κάθετη διατομή στη περιοχή του πρωτογενούς πεπτικού σωλήνα όπου θα δημιουργηθεί το πάγκρεας. (Β) Κάθετη διατομή στη περιοχή της ραχιαίας φύτρας του αναπτυσσόμενου παγκρέατος. (Γ) Τομή του αναπτυσσόμενου λοβού. (Δ) Ενδοκρινή κύτταρα μεταναστεύουν έξω από το παγκρεατικό επιθήλιο προκειμένου να δημιουργήσουν τα πρωτογενή νησίδια. (Ε) Τα κύτταρα του ώριμου παγκρέατος. αο αορτή, ντ νωτοχορδή, μεσ μεσέγχυμα.

Νέοι ορίζοντες στην μεταμόσχευση παγκρεατκών νησιδίων

Η διαπίστωση ότι τα ενδοκρινή κύτταρα προέρχονται από επιθήλιο παρόμοιο με

αυτό των αγωγών δημιούργησε την ελπίδα ότι τα κύτταρα των αγωγών θα μπορούσαν να καθοδηγηθούν προκειμένου να δημιουργήσουν ενδοκρινή κύτταρα που θα αποκαθιστούσαν την έλλειψη β κυττάρων στο διαβήτη. Επιπλέον η ανίχνευση κυττάρων στους αγωγούς με πρότυπο έκφρασης παρόμοιο με αυτό πολλών ενήλικων βλαστικών κυττάρων σε άλλους ιστούς δημιούργησε την υπόνοια ότι παγκρεατικά βλαστικά κύτταρα υπάρχουν και εντοπίζονται στο επιθήλιο των αγωγών. Πράγματι πολύ πρόσφατες έρευνες στον ποντικό έδειξαν ότι κύτταρα του ενήλικου επιθηλίου μπορούν να διεγερθούν και να παράγουν ενδοκρινή κύτταρα συμπεριλαμβανομένων και των β κυττάρων (Zhou et al, 2008; Xu et al, 2008). Πιθανή μεταφορά αυτών των ευρημάτων στον άνθρωπο θα μπορούσε να δημιουργήσει καινοτόμες θεραπείες.

Η δημιουργία παγκρεατικών νησιδίων από εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (ΕΒΚ) αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση. Τα ΕΒΚ είναι κύτταρα που προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα των βλαστοκύστεων των σπονδυλωτών εμβρύων. Είναι ικανά να διαφοροποιηθούν σε όλους τους ιστούς του εμβρύου και μπορούν να διατηρήσουν αυτήν την ιδιότητα μακροχρόνια ακόμη και σε καλλιέργειες. Επιπλέον, έχουν την ικανότητα να ανταποκρίνονται κατάλληλα σε σήματα όπως αυτά που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης, ώστε να διαφοροποιηθούν σε ένα εύρος εξειδικευμένων κυττάρων συμπεριλαμβανομένων και των παγκρεατικών νησιδίων. Για το λόγο αυτό, οι αναπτυξιακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στον προσδιορισμό κάθε ιστού κατά την εμβρυική ανάπτυξη, παρέχουν χρήσιμες ενδείξεις για την in vitro διαφοροποίηση των ΕΒΚ προς συγκεκριμένες κατευθύνσεις. Η διαφοροποίηση εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων σε παγκρεατικά νησίδια είναι εφικτή, όμως πολλά τεχνικά εμπόδια περιορίζουν την αποτελεσματικότητα της διαφοροποίησης και την ποιότητα των κυττάρων που παράγονται. Η διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων προς ινσουλινοπαραγωγά μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά εάν μιμηθούμε όσο πιο πιστά γίνεται τους in vivo μηχανισμούς που οδηγούν στη δημιουργία αυτών των κυττάρων κατά την ανάπτυξη του εμβρύου. Πρόσφατες ερευνητικές εργασίες περιγράφουν σημαντική πρόοδο προς αυτή την κατεύθυνση. Μία από αυτές (Serafimidis et al, 2008) ακολούθησε την γενετική τροποποίηση ΕΒΚ ποντικού ώστε να υπάρχει δυνατότητα επαγωγής της έκφρασης του Ngn3 σε οποιοδήποτε στάδιο της διαφοροποίησης και ανέπτυξε ένα πρωτόκολλο πολλαπλών σταδίων το οποίο προσομοιάζει την σταδιακή διαφοροποίηση βλαστοκυττάρων σε παγκρεατικά νησίδια όπως συμβαίνει κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Στο κατάλληλο στάδιο της διαφοροποίησης ενεργοποιήθηκε η έκφραση του Ngn3 για περιορισμένο χρονικό διάστημα και στη συνέχεια τα κύτταρα αφέθηκαν να ωριμάσουν. Στο τέλος της διαδικασίας είχαν δημιουργηθεί κυτταρικές δομές που προσομοίαζαν παγκρεατικά νησίδια. Αυτές οι κυτταρικές δομές περιείχαν κύτταρα που παρήγαγαν γλυκαγόνη, σωματοστατίνη αλλά και ινσουλίνη. Πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι τα κύτταρα είχαν την

δυνατότητα να ανιχνεύσουν ψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο και να ανταποκριθούν εκκρίνοντας ινσουλίνη. Σε μια άλλη εργασία (Kroon et al, 2008) ανθρώπινα ΕΒΚ διαφοροποιήθηκαν χρησιμοποιώντας, σε διαδοχικά βήματα, κατάλληλα εξωκυττάρια σήματα σε κύτταρα πού έμοιαζαν με κύτταρα παγκρεατικού ενδοδέρματος. Στη συνέχεια αυτά τα κύτταρα μεταμοσχεύτηκαν σε ποντικούς προκειμένου να ωριμάσουν in vivo. Τα μεταμοσχευμένα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν σε κύτταρα του ενδοκρινούς παγκρέατος, συμπεριλαμβανομένων β-κυττάρων που έφεραν όλα τα χαρακτηριστικά λειτουργικότητας. Στη συνέχεια οι ερευνητές χρησιμοποιώντας κατάλληλο φάρμακο καταστρέψανε επιλεκτικά τα ενδογενή β-κύτταρα των ποντικών αλλά όχι τα μεταμοσχευμένα κύτταρα. Ποντικοί που δεν είχαν δεχθεί μόσχευμα εμφάνισαν διαβήτη πολύ γρήγορα. Αντίθετα, τα μοσχεύματα προστάτευσαν από την ανάπτυξη διαβήτη τα ζώα που ήταν δέκτες του μοσχεύματος για τουλάχιστον τρεις μήνες. Αφαίρεση του μοσχεύματος είχε σαν αποτέλεσμα την άμεση ανάπτυξη διαβήτη αποδεικνύοντας ότι η προστασία κατά του διαβήτη προερχόταν από τα ωριμασμένα μεταμοσχευμένα κύτταρα. Αυτά τα αποτελέσματα προκαλούν αισιοδοξία ότι κυτταρικές θεραπείες υποκατάστασης με βάση ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα έχουν σοβαρές προοπτικές να περάσουν στη κλινική πράξη.

Βιβλιογραφία

Andralojc KM, Mercalli A, Nowak KW, Albarello L, Calcagno R, Luzi L, Bonifacio E, Doglioni C, Piemonti L. Ghrelin-producing epsilon cells in the developing and adult human pancreas. Diabetologia. 2008

Bernardo AS, H-H Cho C, Mason S, Docherty HM, Pedersen RA, Vallier L, Docherty K. Biphasic induction of Pdx1 in mouse and human embryonic stem cells can mimic development of pancreatic {beta} cells. Stem Cells. 2008 Dec 4.

Kerem M, Salman B, Ozsoy S, Pasaoglu H, Bedirli A, Haziroglu R, Yilmaz TU. Exogenous Ghrelin Enhances Endocrine and Exocrine Regeneration in Pancreatectomized Rats. J Gastrointest Surg. 2008 Dec 11

Kitsou-Mylona I, Burns CJ, Squires PE, Persaud SJ, Jones PM. A role for the extracellular calcium-sensing receptor in cell-cell communication in pancreatic islets of langerhans. Cell Physiol Biochem. 2008;22:557-566

Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazer S, Young H, Richardson M, Smart NG, Cunningham J, Agulnick AD, D'Amour KA, Carpenter MK, Baetge EE. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. Nat Biotechnol. 2008;26:443-448

Leung KK, Suen PM, Lau TK, Ko WH, Yao KM, Leung PS. PDZ-Domain Containing-2 (PDZD2) Drives the Maturity of Human Fetal Pancreatic Progenitor-Derived Islet-Like Cell Clusters with Functional Responsiveness against Membrane Depolarization. Stem Cells Dev. 2008 Dec 1.

Manisha A M; Pradeep Bhaskar P; Saroj S G. Pancreatic Islets Are Very Poor in Rectifying Oxidative DNA Damage. Pancreas. 38:23-29, 2009.

Oliver-Krasinski JM, Stoffers DA. On the origin of the beta cell. Genes Dev. 2008;22:1998-2021

Reers C, Erbel S, Esposito I, Schmied B, Buechler M, Nawroth P, Ritzel R. Impaired islet turnover in

human donor pancreata with aging. Eur J Endocrinol. 2008 Nov 12.

I. Serafimidis, I. Rakatzi, V. Episkopou, M. Gouti and A. Gavalas. Novel Effectors of Directed and ngn3 Mediated Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells into Endocrine Pancreas Progenitors (2008). Stem Cells 26, 3-16. Epub 2007 Oct 11.

Wen JH, Chen YY, Song SJ, Ding J, Gao Y, Hu QK, Feng RP, Liu YZ, Ren GC, Zhang CY, Hong TP, Gao X, Li LS. Paired box 6 (PAX6) regulates glucose metabolism via proinsulin processing mediated by prohormone convertase 1/3 (PC1/3). Diabetologia. 2008 Nov 26.

Xu X, D'Hoker J, Stangé G, Bonné S, De Leu N, Xiao X, Van de Casteele M, Mellitzer G, Ling Z, Pipeleers D, Bouwens L, Scharfmann R, Gradwohl G, Heimberg H. Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. Cell. 2008 Jan 25;132(2):197-207.

Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. Nature. 2008 Oct 2;455(7213):627-32. Epub 2008 Aug 27.