

Programirana smrt B stanica Langerhansovih otočića u inzulin-neovisnoj šećernoj bolesti

Rumora, Lada; Hadžija, Mirko; Pape-Medvidović, Edita; Pavlić-Renar, Ivana; Metelko, Željko; Juretić, Dubravka; Slijepčević, Milivoj

Source / Izvornik: **Biochemia Medica, 1997, 7, 45 - 51**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:809809>

Rights / Prava: [In copyright](#) / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



UDK 612.349.7/575.1

Izvorni znanstveni članak
Original Scientific Paper

PROGRAMIRANA SMRT B STANICA LANGERHANSOVIH OTOČIĆA U INZULIN-NEOVISNOJ ŠEĆERNOJ BOLESTI

Lada Rumora¹, Mirko Hadžija², Edita Pape-Medvidović³, Ivana Pavlić-Renar³,
Željko Metelko³, Dubravka Juretić¹, Milivoj Slijepčević²

¹Zavod za medicinsku biokemijsku i hematologiju Farmaceutsko-biocemski fakultet, Zagreb

- ²Institut "Ruder Bošković", Zagreb - ³Klinika "Vuk Vrhovac", Zagreb.

SAŽETAK – Koncentracija polipeptida amilina povišena je u B stanica Langerhansovih otočića pacijenata s inzulin-neovisnom šećernom bolesti. Ispitali smo sposobnost hiperglikemičnih i hiperinzulinemičnih seruma dijabetičara da izazovu neželjene promjene B stanica otočića zdravih štakora, koje uzrokuju apoptozu. Izolirani otočići štakora inkubirani sa serumima dijabetičara pokazali su smanjenu vrijabilnost B stanica, te morfološke promjene karakteristične za apoptozu. Došlo je i do fragmentacije molekule DNA u B stanicama Langerhansovih otočića, što je karakteristika apoptotičkih procesa. DNA bi mogla poslužiti kao rani pokazatelj programirane smrti stanice.

UVOD

Amilin, peptid od 37 aminokiselina, izlučuje se zajedno s inzulinom iz B stanica Langerhansovih otočića i djeluje na brojna tkiva od metaboličkog interesa (1,2).

U primarnoj strukturi amilina primjećene su velike razlike vezane uz vrstu, ali su N- i C-krajevi molekule potpuno konzervirani. Kod humanog se amilina između aminokiselina 20 i 29 formiraju β -nabранe ploče koje su odgovorne za snažnu tendenciju vlastite agregacije i stvaranja netopivih struktura nazvanih amiloidni materijal gušterice (1,3).

Istraživanja su pokazala da se nakon kratke stimulacije izoliranih B stanica, neagregiranih otočića i gušterača štakora glukozom ili argininom amilin i inzulin izlučuju kod približno konstantnog molarnog omjera: lučenje amilina je samo od 2 do 5% od količine otpuštenog inzulina (3). No, nakon produžene stimulacije glukozom, kao i kod modela u kojih su životinje rezistentne na djelovanje inzulina (slično inzulin-neovisnoj šećernoj bolesti), taj se omjer povećava u korist amilina (3).

Lorenzo i suradnici su izložili stanice Langerhansovih otočića odraslih štakora u kulturi humanom amilinu, što je rezultiralo degeneracijom čak $97 \pm 1\%$ stanica (4).

U našim smo ispitivanjima htjeli utvrditi da li će hiperglikemični i hiperinzulinemični serumi pacijenata s inzulin-neovisnom šećernom bolesti izazvati neželjene promjene B stanica Langerhansovih otočića zdravih štakora, koje uzrokuju apoptozu.

MATERIJALI I METODE

Izolacija gušterače

Da bi se u kasnijim postupcima izolacije i odvajanja od masnog tkiva i limfnih čvorova što lakše uočila, gušterača se boja otopinom neutralnog crvenila. Tim se postupkom selektivno intenzivnije oboje Langerhansovi otočići, a to znatno olakšava vađenje otočića iz suspenzije probavljenog tkiva gušterače.

Inkubacija s otopinom kolagenaze i izolacija Langerhansovih otočića

Inkubacijom sasjeckanih komadića gušterače u zagrijanoj (37°C) otopini kolagenaze probavlja se vezivo kojim je isprepleteno egzokrino tkivo gušterače, a većina Langerhansovih otočića zbog membrane ostaje neko vrijeme cjelovitā. U svrhu održavanja stabilnog pH koristi se $0.065 \text{ mmol/L HEPES}$ pufer. Izolacija otočića izvedena je po modificiranoj metodi Lacya i Kostianovskog (5). Otočići su skupljani automatskom pipetom pod stereomikroskopom.

Određivanje vijabilnosti Langerhansovih otočića

Pročišćeni otočići se pohranjuju u posebnom inkubatoru ($5\% \text{ CO}_2$, 95% zraka) kroz jedan sat na 37°C . Nakon toga se drže na sobnoj temperaturi kroz 48 sati. Otočićima koji su inkubirani u mediju RPMI 1640 u koji je dodan hiperglikemični i hiperinzulinemični serum pacijenata s inzulin-neovisnom šećernom bolesti u koncentracijama 1, 5, 10 i 20%, te otočićima inkubiranim u normalnom humanom serumu (koncentracije 1, 5, 10 i 20%), dodali smo radnu otopinu fluorescein diacetata, koji selektivno oboji

žive stanice, i propidijevog jodida (selektivno boja oštećene i mrtve stanice). Pod fluorescentnim smo mikroskopom pratili broj stanica otočića s promjenama karakterističnim za apoptozu u odnosu na ukupan broj stanica (izraženo postotkom).

Izolacija DNA iz otočića

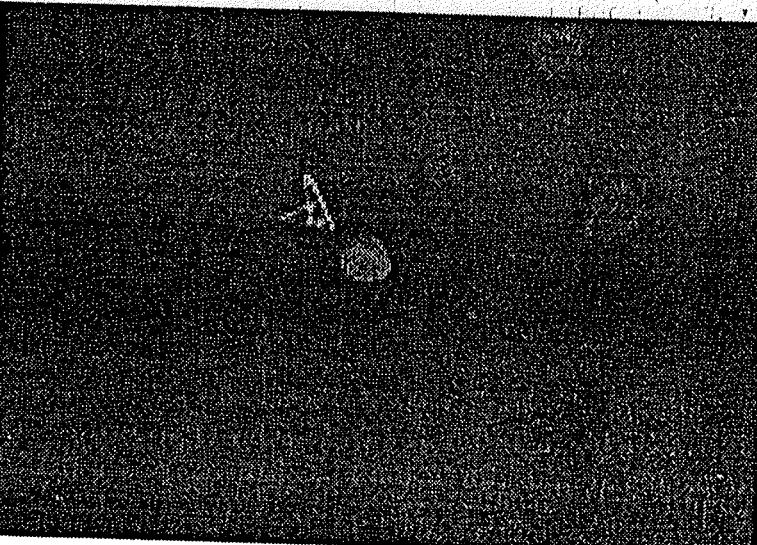
Iz uzorka (otočići nakon inkubacije sa serumima) smo, metodom koju smo sami razvili, izolirali DNA. Podatke o koncentraciji DNA dobili smo nakon spektrofotometrijskog mjerenaapsorbancije uzorka na 260 nm, a podatke o čistoći izolirane DNA doznali smo iz stupnja čistoće (omjer apsorbancija na 260 nm i 280 nm).

Elektroforeza DNA izolirane iz otočića

Elektroforezu DNA proveli smo na 1%-tnom TAE agaroznom gelu uz jakost struje 65 mA. Gelove smo bojali oko 30 minuta u radnoj otopini etidijevog bromida ($1 \mu\text{g/mL}$). Nakon odbojavanja u destiliranoj vodi, gelove smo analizirali pod izvorom UV-svetla i fotografirali ih.

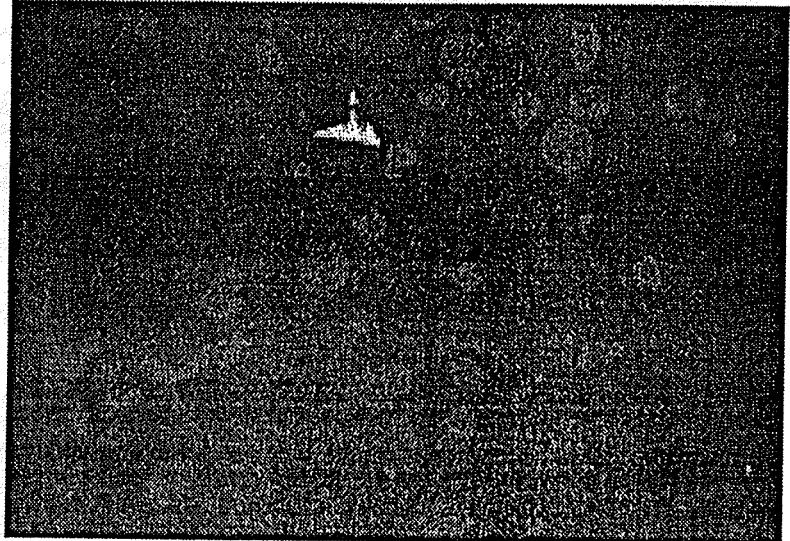
REZULTATI RADA

Inkubacija otočića s normalnim humanim serumima dodanim u koncentracijama od 1, 5, 10 i 20% u medij RPMI 1640 nije imala nikakav utjecaj na cjevitost B stanica niti njihovih jezgara. Osim toga, dodatak hiperinzulinemičnih i hiperglikemičnih serumu pacijenata s inzulin-neovisnom šećernom bolesti u koncentracijama od 1,5 i 10% također nije uzrokovao nikakve vidljive promjene u otočićima, ali smo u uzorcima u kojima je



Slika 1. – Fluorescentna mikroskopijska B stanica otočića štakora nakon inkubacije s 20%-tnim hiperglikemičnim i hiperinzulinemičnim serumima pacijenata s inzulinneovisnom šećernom bolesti. Vidljivo je "pupanje" membrane

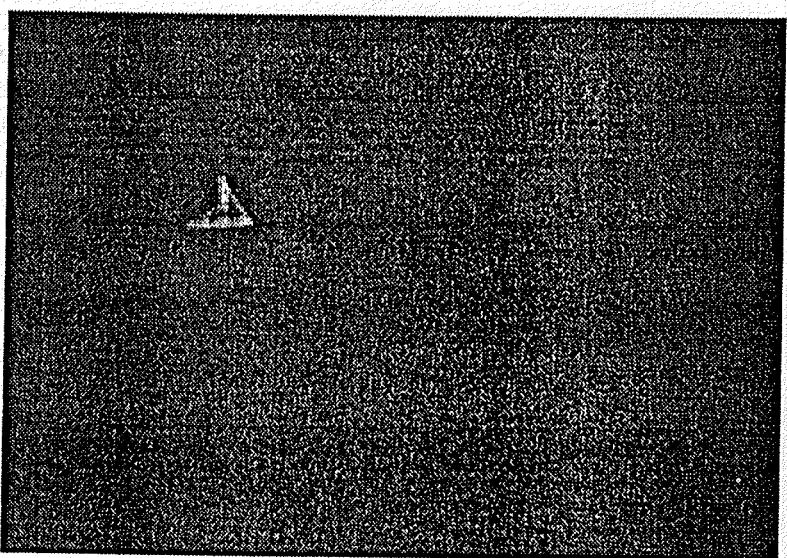
Slika 2. – Fluorescentna mikroskopija B stanica otočića štakora nakon inkubacije s 20%tnim hiperglikemičnim i hiperinzuline-mičnim serumima pacijenata s inzulin-neovisnom šećernom bolesti. Vidljiva je kondenzacija kromatina

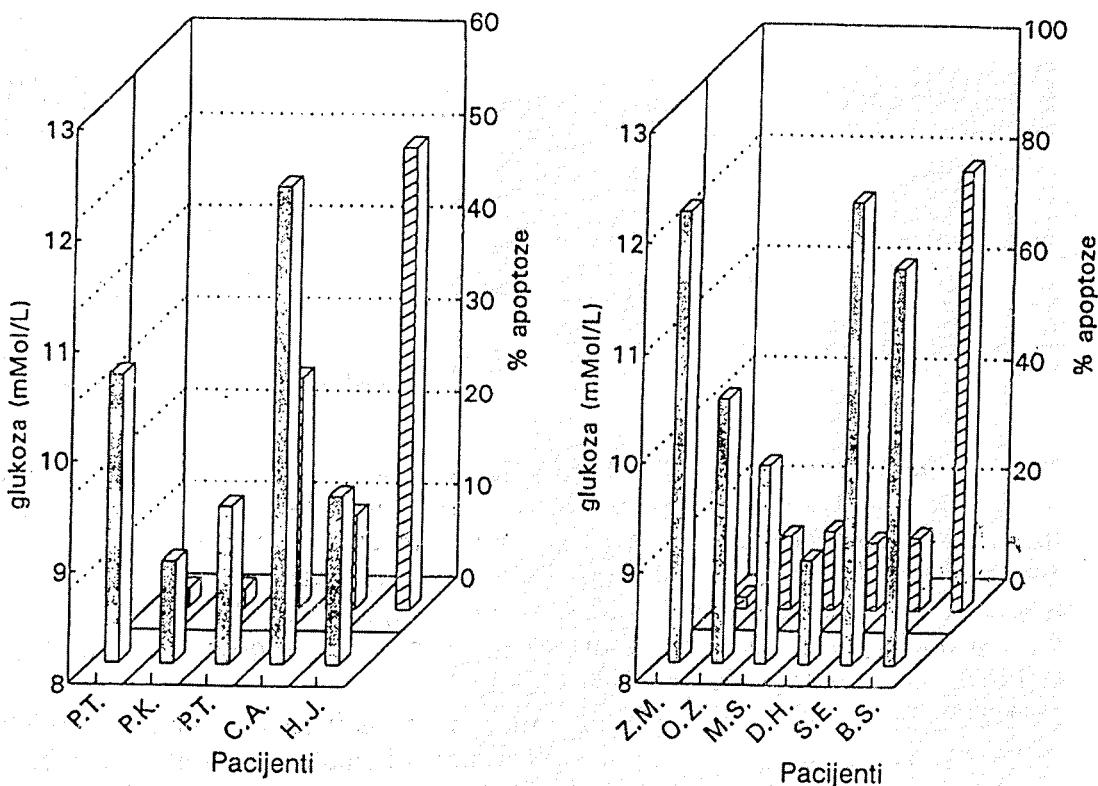


serum dodan u koncentraciji od 20% zapazili promjene koje su karakteristične za proces apoptoze. Pod fluorescentnim smo mikroskopom najprije uočili "pupanje" membrane B stanica Langerhansovih otočića štakora, tj. nastajanje "mjeđuričaste" površine prepoznatljive u prvoj fazi programirane smrti stanice (prikazano na slici 1). Uskoro smo mogli primijetiti i kondenzaciju kromatina koja je tipična za drugu fazu procesa apoptoze (Slika 2), a zatim i fragmentaciju jezgre (Slika 3).

No, opazili smo da hiperglikemični i hiperinzulinemični serumi različitih pacijenata s inzulin-neovisnom šećernom bolesti imaju i različitu sposobnost induciranja apoptoze o njihovim razinama glukoze u krvi (prikazano na Slikama 4a i 4b). Dok pojedini serumi, iako dodani u koncentraciji od 20%, koja je dovoljna da izazove opisane promjene, uopće ne izazivaju apoptozu,

Slika 3. – Fluorescentna mikroskopija B stanica otočića štakora nakon inkubacije s 20%tnim hiperglikemičnim i hiperinzuline-mičnim serumima pacijenata s inzulin-neovisnom šećernom bolesti. Vidljiva je fragmentacija jezgre





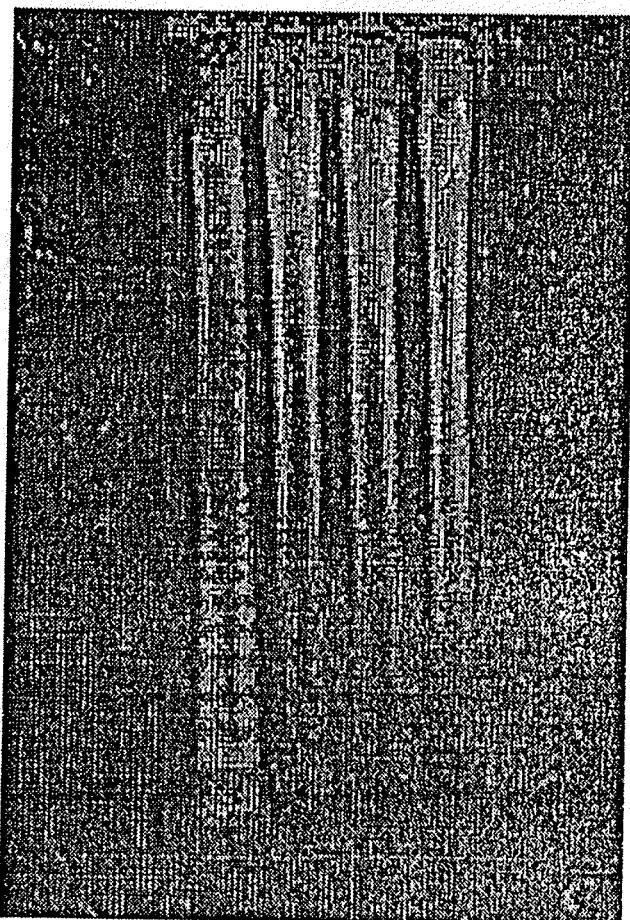
Slika 4a i 4b – Hiperglikemični i hiperinzulinemični serumi pacijenata s inzulin-neovisnom šećernom bolesti u različitom postotku izazivaju apoptozu B stanica otočića štakora. Razlike ne ovise o razinama glukoze

serumi nekih drugih pacijenata u visokom postotku (čak i do 80%) izazivaju smrt B stanica Langerhansovih otočića. Većina je seruma povećavala udio mrtvih stanica za 8-14% što se vidi iz rezultata prikazanih u Tablici 1.

Tablica 1. – Utjecaj seruma pacijenata s inzulin-neovisnom šećernom bolesti na apoptozu B stanica otočića štakora. Broj apoptotičkih stanica izražen je postotkom u odnosu na ukupan broj stanica otočića

Pacijent	Inzulin (mU/L)	Glukoza (mmol/L)	Apoptoza (%)
P.T.	>70	10.6	1-2
P.K.	>70	8.9	1-2
P.T.	>70	9.4	16-25
C.A.	>70	12.3	8-10
H.J.	>70	9.5	45-50
Z.M.	>70	12.1	1-2
O.Z.	>70	10.4	9-13
M.S.	>70	9.8	12-14
D.Z.H.	>70	8.9	10-12
S.E.	>70	12.2	12-13
B.S.	>70	11.6	75-80

Nakon provedene elektroforeze DNA, izolirane iz otočića nakon inkubacije sa serumima dijabetičara, opazili smo da je došlo do fragmentacije molekule DNA, što je karakteristika apoptotičkih procesa (prikazano na Slici 5). U kontrolnim uzorcima nismo opazili takve promjene, tj. molekula DNA je ostala cjelevita.



Slika 5. – Analiza fragmenta DNA nakon elektroforeze na 1%-tnom agaroznom gelu i bojanja s etidijevim bromidom. DNA je izolirana iz otočića štakora inkubiranih 48 sati u prisutnosti hiperglikemičnih i hiperinzulinemičnih seruma pacijenata s inzulin-neovisnom šećernom bolesti. U svaku je "udubinu" dodano 20 mg DNA

ZAKLJUČAK

Ovo je istraživanje pokazalo da hiperglikemični i hiperinzulinemični serumi pacijenata s inzulin-neovisnom šećernom bolesti izazivaju, nakon 48-satne inkubacije, određene morfološke promjene na stanicama Langerhansovih otočića štakora ("pupanje" membrane, kondenzacija kromatina i fragmentacija jezgre). Najznačajnije promjene odvijale su se kod uzoraka inkubiranih s dijabetičkim serumima dodanim u koncentraciji pd 20%, dok niže koncentracije dijabetičnih serum (1, 5 i 10%), kao i normalni humani serumi (dodani u koncentracijama od 1, 5, 10 i 20%), nisu inducirali vidljive promjene na B stanicama otočića. Uočene promjene na otočićima su istovjetne onima već opisanim u literaturi za apoptotične stanice, te možemo zaključiti da B stanice ne umiru procesom nekroze, već apoptoze.

Da se doista radi o umiranju stanica procesom apoptoze potvrdili smo i elektroforezom DNA izoliranom iz otočića nakon inkubacije sa serumima. Analizom gelova opazili smo karakteristične "ljestve" samo u uzorcima kultiviranim s 20%-tним dijabetičnim serumima. Fragmentacija DNA bi mogla poslužiti kao rani pokazatelj smrти B stanica otočića.

Uočili smo i da serumi pacijenata s inzulin-neovisnom šećernom bolesti imaju različitu sposobnost izazivanja apoptoze (od samo nekoliko postotaka, pa čak do 80%). Pošto čak ni pri povišenim koncentracijama glukoza i inzulin ne djeluju na Langerhanske otočice u kulturi tkiva, uočeni bi se apoptotički efekt mogao, zbog nekih već objavljenih istraživanja, pripisati amilinu, tj. toksičnost ispitivanih serumi se razlikuje vjerojatno zbog njihovih različitih koncentracija amilina. Da bi se to i potvrdilo, daljnja bi ispitivanja trebala obuhvatiti određivanje koncentracija amilina u serumima dijabetičnih pacijenata.

Posterski rad izložen na 2. hrvatskom kongresu medicinskih biokemičara (Pula, 25-28. 09. 1996.) nagradio je pokrovitelj Kongresa Farmaceutsko-biokemijski fakultet uz novčanu potporu tutke FRANK ANALAB Zagreb.

APOPTOSIS OF LANGERHANS ISLETS B CELLS IN TYPE II DIABETES MELLITUS

SUMMARY – Polypeptide amylin is elevated in pancreatic B cells of patients with type II diabetes mellitus. We have investigated the ability of diabetic sera with hyperinsulinemia and hyperglycaemia to cause DNA fragmentation and apoptosis. Isolated rat Langerhans islets incubated with diabetic sera have shown reduced viability of B cells and morphological characteristic of apoptotic process. DNA fragmentation in islet β -cells was also demonstrated. These findings identify DNA as an early target of programmed cell death.

LITERATURA

1. Pape-Medvidović E, Hadžija M; Beta-cell apoptosis as a result of amylin toxicity; *Diabet. Croatica* 24 (1), 3-11 (1995).
2. Sacks D. B; Amylin - a glucoregulatory hormone involved in the pathogenesis of diabetes mellitus?; *Clin. Chem.* 42 (4), 496-497 (1996).
3. Hoppener J. W, Verbeek J. S, de Koning E. J, Oosterwijk C, van Hulst K. L, VisserVerwooy H. J, Hofhuis F. M, van Gaalen S, Berebds M. J, Hackeng W. H, et al; Chronic overproduction of islet amyloid polypeptide/amylin in transgenic mice; lysosomal localisation of human islet amyloid polypeptide and lack of marked hyperglycaemia or hyperinsulinaemia; *Diabetologia* 36 (12), 1258-1265 (1993).
4. Lorenzo A, Razzaboni B, Weir G. C, Yankner B. A; Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus; *Nature* 368, 756-760 (1994).
5. Lacy P. E, Kostianovsky; Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas; *Diabetes* 30, 35-39 (1967).