

UDK 612.349.7/575.1

Izvorni znanstveni članak  
Original Scientific Paper

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

*Lada Rumora<sup>1</sup>, Mirko Hadžija<sup>2</sup>, Edita Pape-Medvidović<sup>3</sup>, Ivana Pavlić-Renar<sup>3</sup>,  
Željko Metelko<sup>3</sup>, Dubravka Juretić<sup>1</sup>, Milivoj Slijepčević<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb  
- <sup>2</sup>Institut "Ruder Bošković", Zagreb - <sup>3</sup>Klinika "Vuk Vrhovac", Zagreb.

*SAŽETAK* - Koncentracija polipeptida amilina povišena je u B stanicama Langerhansovih otočića pacijenata s inzulins-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 vijabilnost 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  $\beta$ -nabrane ploče koje su odgovorne za snažnu tendenciju vlastite agregacije i stvaranja netopivih struktura nazvanih amiloidni materijal gušterače (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 serum 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 ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) otopini kolagenaze probavlja se vezivo kojim je isprepletano egzokrinno tkivo gušterače, a većina Langerhansovih otočića zbog membrane ostaje neko vrijeme cjelovita. 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  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 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

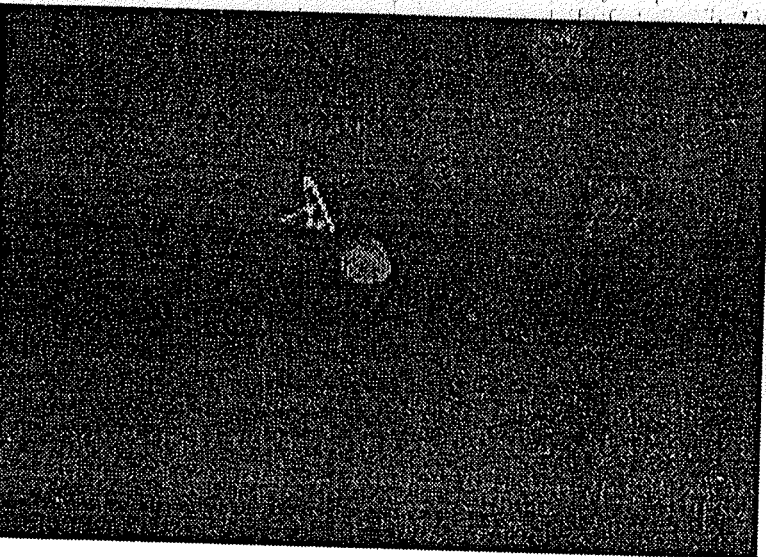
Iz uzoraka (otočići nakon inkubacije sa serumima) smo, metodom koju smo sami razvili, izolirali DNA. Podatke o koncentraciji DNA dobili smo nakon spektrofotometrijskog mjerenja apsorbancije uzorka na 260 nm, a podatke o čistoći izolirane DNA doznali smo iz stupnja čistoće (omjer apsorbancija na 260 nm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

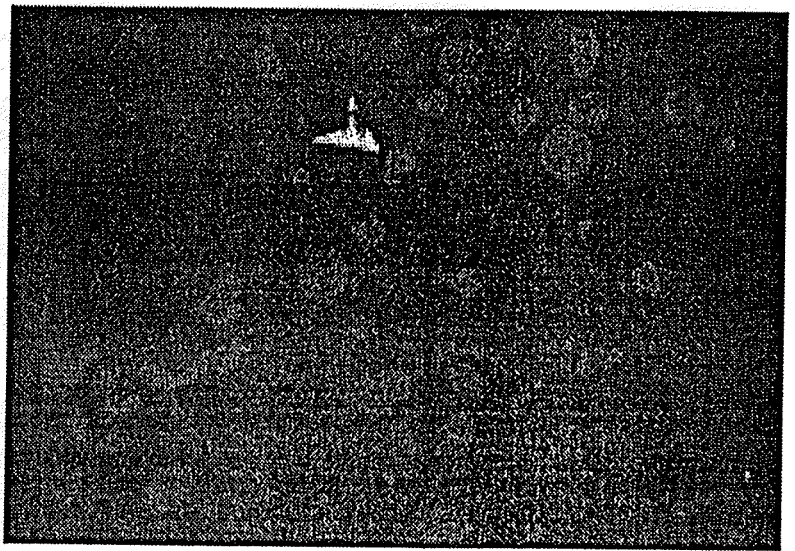
## REZULTATI RADA

Inkubacija otočića s normalnim humanim serumima dodanim u koncentracijama od 1, 5, 10 i 20% u medij RPMI 1640 nije imala nikakav utjecaj na cjelovitost B stanica niti njihovih jezgara. Osim toga, dodatak hiperinzulinemičnih i hiperglikemičnih seruma 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 mikroskopija B stanica otočića štakora nakon inkubacije s 20%-tnim hiperglikemičnim i hiperinzulinemičnim serumima pacijenata s inzulinneovisnom šećernom bolesti. Vidljivo je "pupanje" membrane

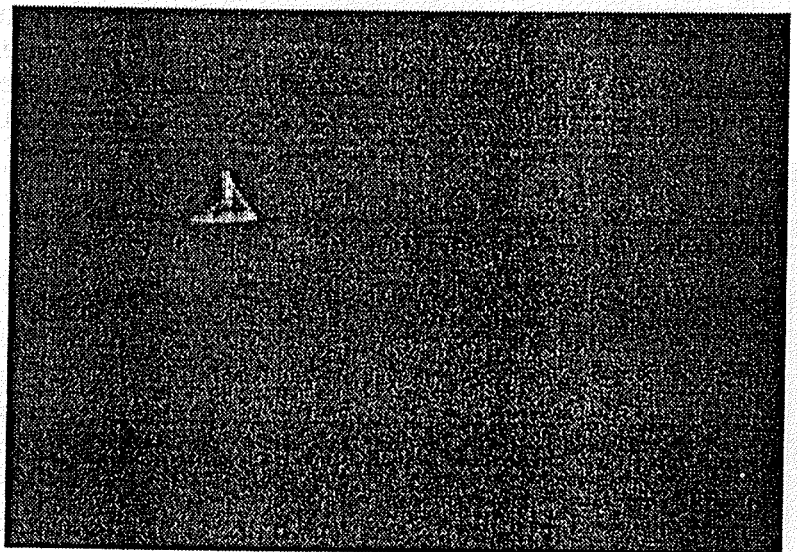
Slika 2. - *Fluorescentna mikroskopija B stanica otočića štakora nakon inkubacije s 20%-tnim hiperglikemičnim i hiperinzulinemičnim serumima pacijenata s inzulineovisnom šećernom bolesti. Vidljiva je kondenzacija kromatina*

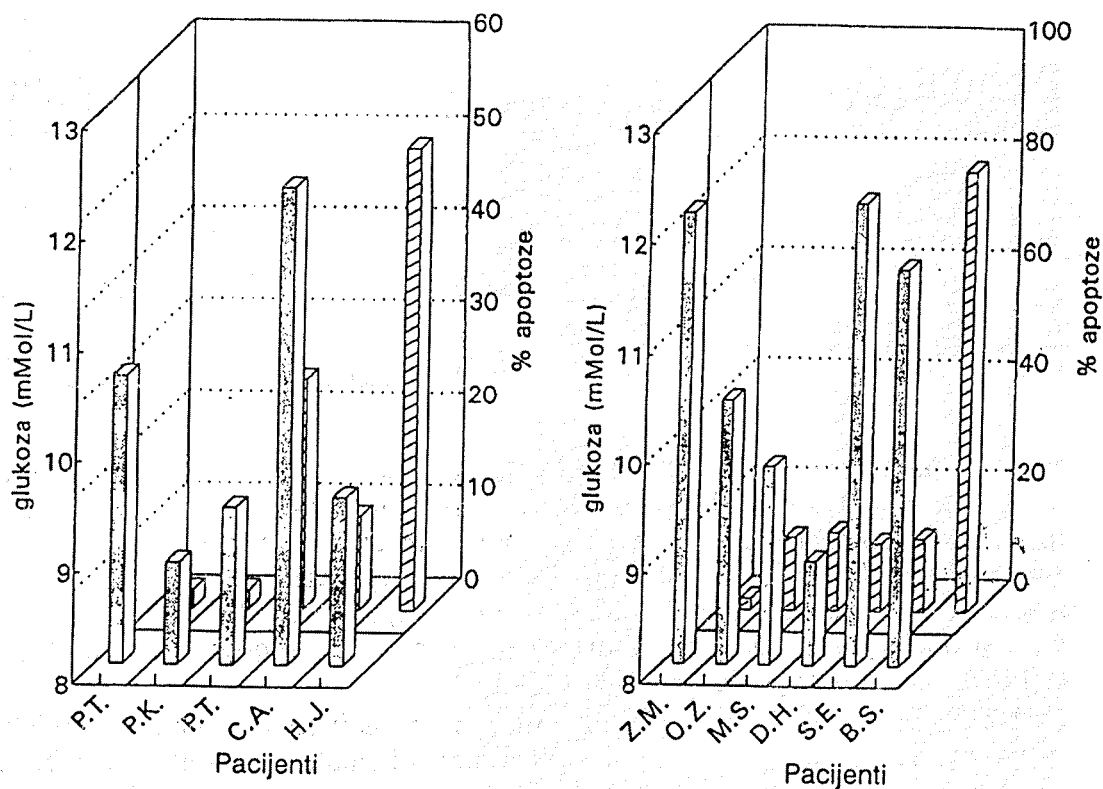


serum dodan u koncentraciji od 20% zapazili promjene koje su karakteristične za proces apoptoze. Pod fluorescentnim smo mikroskopom najprije uočili "pupanje" membrane B stanica Langerhansovih otočića štakora, tj. nastajanje "mjehuričaste" površine prepoznatljive u prvoj fazi programirane smrti stanice (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 inzulineovisnom 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 hiperinzulinemičnim serumima pacijenata s inzulineovisnom šećernom bolesti. Vidljiva je fragmentacija jezgre*





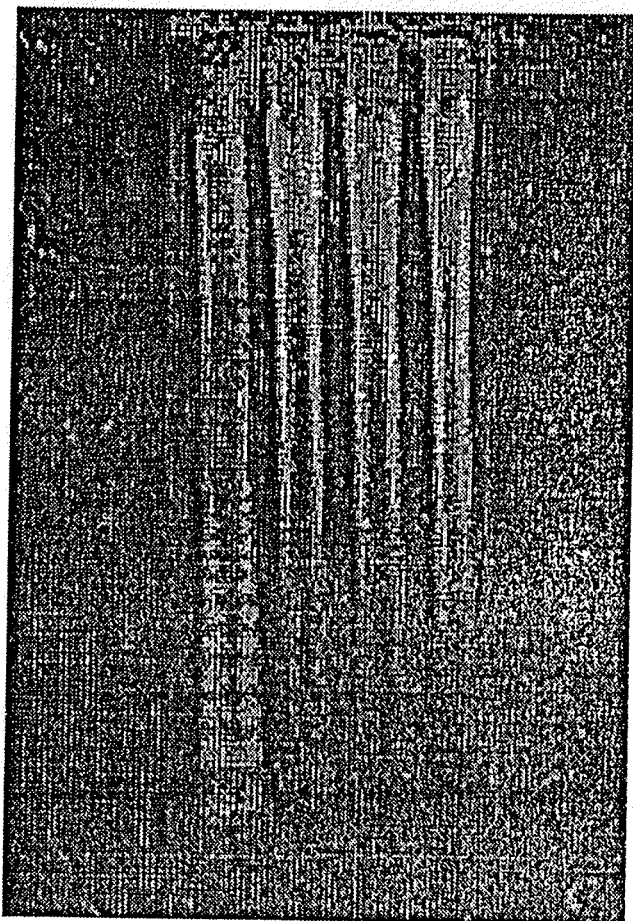
Slika 4a i 4b - Hiperглиkemični i hiperinzulinemični serumi pacijenata s inzulins-neovisnom šećernom bolesti u različitim postotku izazivaju apoptozu B stanica otočića štakora. Razlike ne ovise o razinama glukoze

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 inzulins-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 (%)
PT.	>70	10.6	1-2
PK.	>70	8.9	1-2
PT.	>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.Ž.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 cjelovita.



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 dijabetičnim serumima dodanim u koncentraciji pd 20%, dok niže koncentracije dijabetičnih seruma (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%-tnim dijabetičnim serumima. Fragmentacija DNA bi mogla poslužiti kao rani pokazatelj smrti 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 Langerhansove otočiće u kulturi tkiva, uočeni bi se apoptotički efekt mogao, zbog nekih već objavljenih istraživanja, pripisati amilinu, tj. toksičnost ispitivanih seruma 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 turtke 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  $\beta$ -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, VisserVernooy H. J, Hofhinis 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).