

**Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Fizjologii i Biochemii Zwierząt
Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt
Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu
we współpracy z Włoskim Instytutem Naukowym
San Raffaele Scientific Institute w Mediolanie**

Karolina Maria de Groot-Andrałójć

**KOMÓRKI SYNTETYZUJĄCE GHRELINĘ W WYSPACH TRZUSTKI W
ROZWOJU PŁODOWYM CZŁOWIEKA ORAZ EKSPRESJA W NICH
CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH REGULUJĄCYCH
RÓŻNICOWANIE KOMÓREK WYSP**

Promotor: prof. dr hab. Krzysztof W. Nowak

**Badania do niniejszej rozprawy doktorskiej były finansowane ze środków finansowych
6. Programu Ramowego Unii Europejskiej (HPMT-CT-2001-00329),
w ramach stypendium Marie Curie.**

Poznań, 2013

Podziękowania

Autor pracy pragnie podziękować:

*Promotorowi,
za opiekę merytoryczną i zaangażowanie,
dzięki któremu możliwe było ukończenie tej pracy.*

*Pracownikom Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii UMP w Poznaniu,
za życzliwość, inspirację i niezwykłą atmosferę pracy.*

*Pracownikom Włoskiego Instytutu Naukowego San Raffaele,
Zakładu Beta-cell Biology, w Mediolanie,
za cenne uwagi i sugestie, oraz możliwość realizowania badań ujętych w tej pracy.*

*Pracownikom Katedry Fizjologii i Biochemii Zwierząt UP w Poznaniu,
za umożliwienie realizacji pracy doktorskiej oraz wszelkie wsparcie.*

*Mojej Rodzinie,
za cierpliwość i wytrwałość oraz wiarę w moje możliwości nawet wtedy,
kiedy sama w nie wątpiłam.*

*Theunowi i Elence,
za Wiarę, Nadzieję i Miłość.*

Część wyników ujętych w niniejszej rozprawie opublikowano:

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* 52:486–493, 2009.

1.	INDEKS SKRÓTÓW.....	7
2.	WSTĘP.....	10
2.1.	Trzustka – narząd o wydzielaniu endokrynowym i egzokrynowym.....	10
2.1.1.	Anatomia trzustki człowieka.....	11
2.1.2.	Zarys budowy histologicznej trzustki.....	12
2.1.3.	Ewolucja trzustki.....	13
2.1.4.	Hormony trzustki.....	15
2.1.4.1.	Insulina.....	15
2.1.4.2.	Glukagon.....	16
2.1.4.3.	Somatostatyna i polipeptyd trzustkowy.....	16
2.1.4.4.	Ghrelina.....	17
2.2.	Morfogeneza trzustki.....	17
2.2.1.	Rola czynników transkrypcyjnych w morfogenezie trzustki.....	18
2.2.2.	Regeneracja trzustki.....	19
2.2.3.	Różnicowanie się komórek trzustki z endodermy nietrzustkowej.....	20
2.2.4.	Różnicowanie się komórek trzustki z embrionalnych, prekursorowych komórek pluripotencjalnych (polihormonalne).....	21
2.3.	Ghrelina – historia i funkcje biologiczne.....	21
2.3.1.	Historia ghreliny.....	21
2.3.2.	Funkcje biologiczne.....	22
2.4.	Dystrybucja komórek ghrelino-immunopozytywnych.....	24
2.4.1.	Komórki ghrelino-immunopozytywne w rozwoju płodowym.....	24
2.4.2.	Komórki ghrelino-immunopozytywne w dojrzałym organizmie.....	24
3.	CEL PRACY.....	26
4.	MATERIAŁY I METODY.....	27
4.1.	Materiały.....	27
4.1.1.	Izolowane wyspy Langerhansa trzustki człowieka.....	27
4.1.2.	Materiał histologiczny.....	27
4.1.2.1.	Trzustka w rozwoju.....	27
4.1.2.2.	Trzustka człowieka dorosłego.....	28
4.1.3.	Przeciwciała.....	28
4.1.4.	Gotowe zestawy do oznaczeń immunohistochemicznych.....	30
4.1.5.	Bufory, płyny i ich skład.....	30

4.1.6.	Aparatura.....	32
4.2.	Metody.....	33
4.2.1.	Izolacja wysp Langerhansa od dawców i procedury towarzyszące.....	33
4.2.1.1.	Izolacja wysp Langerhansa trzustki człowieka.....	33
4.2.1.2.	Barwienie Ditizonem.....	34
4.2.2.	Biologia molekularna.....	35
4.2.2.1.	Projektowanie starterów do reakcji PCR.....	35
4.2.2.1.1.	Startery dla preproghreliny.....	35
4.2.2.2.	Badanie ekspresji preproghreliny w izolowanych wyspach Langerhansa trzustki.....	37
4.2.2.2.1.	Izolacja mRNA z wysp Langerhansa trzustki człowieka.....	37
4.2.2.2.2.	Kontrola ilościowa oraz jakościowa wyizolowanego RNA wysp Langerhansa.....	38
4.2.2.2.2.1.	Rozdział elektroforetyczny RNA.....	39
4.2.2.2.2.2.	Pomiar stężenia RNA	40
4.2.2.2.3.	Trawienie RNA DNAzą.....	41
4.2.2.2.4.	Reakcja odwrotnej transkrypcji RT – synteza cDNA.....	41
4.2.2.2.5.	Reakcja łańcuchowa polimerazy PCR.....	43
4.2.2.2.6.	Elektroforeza produktów reakcji PCR w żelu agarozowym.....	44
4.2.3.	Histologia.....	44
4.2.3.1.	Ocena prawidłowości rozwojowych płodów.....	44
4.2.3.2.	Utrwalenie materiału i przygotowanie skrawków histologicznych.....	45
4.2.3.3.	Przygotowanie macierzy tkankowej (TMA).....	46
4.2.3.4.	Immunohistochemia.....	48
4.2.3.4.1.	Przygotowania wstępne.....	48
4.2.3.4.1.1.	Deparafinizacja i uwodnienie tkanek.....	48
4.2.3.4.1.2.	Blokowanie endogennej aktywności enzymatycznej.....	48
4.2.3.4.1.3.	Blokowanie miejsc niespecyficznie wiążących antygeny.....	49
4.2.3.4.2.	Immunohistochemiczna metoda barwienia tkanek LSAB (Labeled StreptAvidin Biotin) – barwienie pojedyncze.....	49
4.2.3.4.3.	Immunohistochemiczna metoda barwienia tkanek LSAB (Labeled StreptAvidin Biotin) – barwienie podwójne.....	51
4.2.3.4.4.	Podbarwianie hematoksyliną.....	52

4.2.3.4.5.	Odwodnienie tkanek i procedury kończące.....	52
4.2.3.4.6.	Reakcje kontrolne.....	52
4.2.3.5.	Immunofluorescencja.....	53
4.2.3.5.1.	Metoda podwójnej immunofluorescencji pośredniej.....	54
4.2.3.6.	Analiza ilościowa otrzymanych barwień immunohistochemicznych..	54
4.2.3.6.1.	Częstość występowania, powierzchnia wyspy i względna masa komórek immunopozytywnych w trzustce człowieka dorosłego...	55
4.2.3.6.2.	Analiza ilościowa trzustek w trakcie rozwoju.....	55
4.2.3.6.2.1.	Rozmiary wysp w trakcie rozwoju.....	55
4.2.3.6.2.2.	Liczba komórek immunoreaktywnych w przekroju wyspy w trakcie rozwoju.....	56
4.2.3.7.	Analiza jakościowa otrzymanych barwień immunohistochemicznych i immunofluorescencyjnych.....	57
4.2.3.8.	Analiza statystyczna wyników.....	57
5.	WYNIKI.....	58
5.1.	Identyfikacja komórek GHREL-ip w trzustce człowieka dorosłego (wyspy Langerhansa).....	58
5.1.1.	Ekspresja ppGHREL w izolowanych wyspach Langerhansa trzustki.....	58
5.1.2.	Komórki GHREL-ip jako komórki endokrynne – analiza immunofluorescencyjna wysp trzustki człowieka dorosłego.....	59
5.1.3.	Komórki GHREL-ip piątym typem komórek endokrynnych wyspy.....	60
5.1.4.	Lokalizacja komórek GHREL-ip w trzustce.....	62
5.1.5.	Częstość występowania, frakcja objętości i frakcja masy komórek GHREL-ip w trzustce człowieka dorosłego.....	64
5.2.	Cytologiczne aspekty rozwoju wysp Langerhansa człowieka w okresie płodowym.....	66
5.2.1.	Ogólny rozwój wysp Langerhansa – analiza jakościowa i ilościowa.....	66
5.2.1.1.	Analiza jakościowa – immunohistochemiczna.....	67
5.2.1.2.	Analiza ilościowa.....	69
5.2.2.	Identyfikacja poszczególnych typów komórek endokrynnych.....	72
5.2.2.1.	Identyfikacja komórek GLUK-ip.....	74
5.2.2.2.	Identyfikacja komórek INS-ip.....	74
5.2.2.3.	Identyfikacja komórek GHREL-ip.....	76

5.2.2.3.1.	Komórki GHREL-ip w wyspie.....	76
5.2.2.3.2.	Komórki GHREL-ip poza wyspą.....	78
5.2.3.	Dynamika zmian liczby komórek endokrynych wysp trzustki.....	79
5.2.3.1.	Analiza liczby komórek INS-ip.....	80
5.2.3.2.	Analiza liczby komórek GLUK-ip.....	81
5.2.3.3.	Analiza liczby komórek GHREL-ip.....	82
5.2.4.	Badanie koekspresji głównych hormonów wyspy w trakcie rozwoju.....	83
5.2.4.1.	GHREL i insulina.....	83
5.2.4.2.	GHREL i glukagon.....	84
5.2.4.3.	GHREL i pozostałe hormony trzustki.....	85
5.3.	Badanie koekspresji GHREL z czynnikami transkrypcyjnymi kluczowymi w rozwoju trzustki człowieka: Isl1, Nkx2-2, Nkx6-1, Pax6.....	87
6.	DYSKUSJA.....	89
7.	WNIOSKI.....	93
8.	STRESZCZENIE.....	94
9.	SUMMARY.....	96
10.	PIŚMIENNICTWO.....	98
11.	SPIS TABEL.....	110
12.	SPIS RYCIN.....	111
13.	ANEKS.....	114

1. INDEKS SKRÓTÓW

- ABC (Avidin-Biotin Complex) – kompleks awidyna-biotyna
- ACTH (Adrenocorticotrophic hormone) – hormon adrenokortykotropowy
- Arx (aristaless related homeobox) – czynnik transkrypcyjny definiujący komórki endokrynne trzustki
- BSA (Bovine Serum Albumine) – surowica bydlęca
- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) – algorytm służący do porównywania sekwencji aminokwasowych
- BMI (body mass index) – wskaźnik masy ciała
- CRL (Crown-Rump Length) – odległość ciemieniowo-siedzeniowa
- DAB (3,3'-Diaminobenzidine) – chromogen używany w IHC
- DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol) – barwnik fluorescencyjny wizualizujący DNA
- DMSO (Dimethyl sulfoxide) – dimetylosulfotlenek
- DEPC (Diethylpyrocarbonate) – pirowęglan dietylu
- FBS (Fetal Bovine Serum) – płodowa surowica bydlęca
- FITC (fluorescein isothiocyanate) – izotiocyanian fluoresceiny
- GH (growth hormone) – hormon wzrostu
- GHREL – ghrelina
- GHREL-ip – komórki immunopoztywne dla ghreliny
- GHRH (growth hormone releasing hormone) – somatoliberyna
- GHS (growth hormone secretagogues) – związki uwalniające hormon wzrostu
- GHS-R (growth hormone secretagogue receptor) – receptor dla związków uwalniających hormon wzrostu
- GHS-R1a (growth hormone secretagogue receptor 1a) – receptor ghreliny, podtyp 1a
- GLUK-ip – komórki immunopoztywne dla glukagonu
- HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) – bufor stosowany w hodowlach komórkowych
- Hes1 (hairy and enhancer of split-1) – czynnik transkrypcyjny białek które hamują transkrypcję
- HRP (HorseRadish Peroxidase) - peroksydaza chrzanowa
- IgG - immunoglobuliny
- IHC (immunohistochemistry) – immunohistochemia
- IMF (immunofluorescence) – immunofluorescencja
- INS-ip – komórki immunopoztywne dla insuliny

- Ipf1 (insulin promoter factor 1) – czynnik transkrypcyjny definiujący komórki endokrynne trzustki
- Isl1 (Insulin gene enhancer protein) – czynnik transkrypcyjny definiujący komórki endokrynne trzustki
- Komórki α – komórki alfa, syntetyzujące glukagon
- Komórki β – komórki beta, syntetyzujące insulinę
- Komórki δ – komórki delta, syntetyzujące somatostatynę
- Komórki ϵ – komórki epsilon, syntetyzujące ghrelinę
- Komórki PP – komórki syntetyzujące polipeptyd trzustkowy
- MafA (V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A) – czynnik transkrypcyjny definiujący komórki endokrynne trzustki
- MafB (V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A) – czynnik transkrypcyjny definiujący komórki endokrynne trzustki
- MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) – bufor analogiczny do buforu MES
- Neurod1 (Neurogenic differentiation 1) – czynnik transkrypcyjny definiujący komórki endokrynne trzustki
- NGS (Normal Goat Serum) – surowica kozia
- Ngn3 (Neurogenin-3) – czynnik transkrypcyjny endokrynych komórek progenitorowych
- Nkx2-2 (NK2 homeobox 2) – czynnik transkrypcyjny definiujący komórki endokrynne trzustki
- Nkx6-1 (NK6 homeobox 1) – czynnik transkrypcyjny definiujący komórki endokrynne trzustki
- PBS (Phosphate buffered saline) – roztwór soli fizjologicznej
- PCR (Polymerase Chain Reaction) – reakcja łańcuchowa polimerazy
- Pax4 (Paired box protein 4) – czynnik transkrypcyjny definiujący komórki endokrynne trzustki
- Pax6 (Paired box protein 6) – czynnik transkrypcyjny definiujący komórki endokrynne trzustki
- Pdx1 (Pancreatic and duodenal homeobox 1) – czynnik transkrypcyjny specyficzny dla trzustki i komórek β
- PP – polipeptyd trzustkowy
- ppGHREL – gen preproghreliny
- PP-ip – komórki immunopozytywne dla polipeptydu trzustkowego
- Ptf1a/p48 (Pancreas transcription factor 1 subunit alpha) – czynnik transkrypcyjny

specyficzny dla trzustki

pz – pary zasad

RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) – medium do hodowli komórek

SS-ip – komórki immunopoztywne dla somatostatyny

SST – somatostatyna

SYP-ip – komórki immunopoztywne dla synaptofizyny

SYP – synaptofizyna

TRITC (tetramethyl rhodamine) – izotiocyjanian tetrametylorodaminy

TMA (tissue microarray) – macierz tkankowa

2. WSTĘP

Poznanie mechanizmów rozwojowych trzustki człowieka jest ogromnym wyzwaniem dla naukowców. W szczególności zrozumienie procesów różnicowania się komórek endokrynych znajduje się aktualnie w obrębie bardzo intensywnych badań, głównie ze względu na wzrastającą liczbę zachorowań na choroby z grupy niewydolności metabolicznych, z których cukrzyca stanowi najpoważniejsze zagrożenie dla życia, tak ze względu na częstość występowania, jak i przebieg choroby, oraz komplikacje związane z jej rozwojem. Przyszłość leczenia chorych na cukrzycę zależy między innymi od postępu, jaki dokona się w rozwoju alternatywnych źródeł pozyskiwania komórek beta i/lub wysp trzustkowych, oraz strategii ich transplantacji. Również, agresywnie rozwijające się nowotwory trzustki koncentrują uwagę naukowców wokół biologii wysp Langerhansa trzustki oraz czynników transkrypcyjnych istotnych w różnicowaniu się komórek wysp. Kluczowym hormonem odgrywającym zasadniczą rolę w metabolizmie węglowodanów jest insulina, której synteza i wydzielanie zachodzi jedynie w komórkach β endokrynej części trzustki. Poza dokładnie poznanymi czterema głównymi typami komórek składających się na wyspę Langerhansa trzustki (komórki insulinowe, glukagonowe, somatostatynowe oraz wydzielające polipeptyd trzustkowy) – niedawno opisany został piąty typ komórek - komórki ϵ wydzielające ghrelinę (GHREL).

Prezentowana praca jest w głównej mierze analizą histologiczną unikatowego materiału tkanek płodowych człowieka i opisem dynamicznych zmian zachodzących podczas rozwoju trzustki, ze szczególnym uwzględnieniem zmiennej liczby komórek GHREL-ip, ich profilu transkrypcyjnego oraz relacji ilościowych w stosunku do pozostałych komórek wysp Langerhansa trzustki.

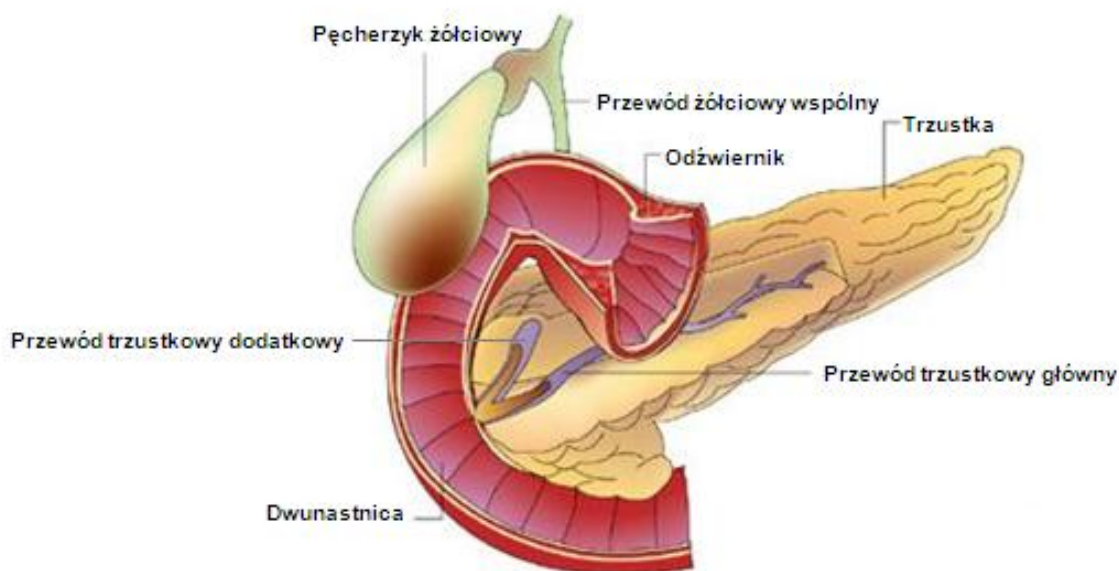
2.1. Trzustka – narząd o wydzielaniu endokrynowym i egzokrynowym

Trzustka jest organem podwójnego wydzielania. W gruczole zewnątrzwydzielniczym znajduje się rozproszony gruczoł wewnątrzwydzielniczy (Ostrowski 1995, str. 674). Część egzokrynną o strukturze pęcherzykowej, stanowi główną masę trzustki, w której produkowane są enzymy trawienne uwalniane przewodami trzustkowymi do dwunastnicy. Część endokrynną, stanowiącą niecałe 3% ogólnej masy trzustki, ma głównie formę zgrupowań komórek o określonej strukturze i funkcji (Ostrowski 1995, str. 674). Zgrupowania te nazwane są wyspami Langerhansa trzustki.

2.1.1. Anatomia trzustki człowieka

Dojrzałą trzustkę tworzą głównie komórki egzokrynne. Zaledwie 2 – 3% to komórki endokrynne, które zebrane są w skupiska komórek o określonej strukturze. Komórki endokrynne w dorosłym organie opisane zostały po raz pierwszy przez Paula Langerhansa (1869 rok) i nazwane zostały wyspami Langerhansa trzustki. Ponadto komórki endokrynne występują również w formie pojedynczych komórek, rozrzuconych przypadkowo w egzokrynej części trzustki (Lucini i wsp., 1988). W pełni wykształcony organ składa się z trzech części: głowy (*caput pancreatis*), trzonu (*corpus pancreatis*) i ogona (*cauda pancreatis*) (Ryc.1). Pomiedzy głową a trzonem trzustki znajduje się cieśń – niewielkie, ale widoczne przewężenie trzustki. Anatomiczna lokalizacja trzustki podyktowana jest bezpośrednio jej istotnym wpływem na procesy trawienne. Głowa trzustki objęta jest pętlą dwunastnicy, ogon opiera się o śledzionę, a cała trzustka przylega do przedniej ściany żołądka (Ostrowski 1995, str. 674) (Ryc.1).

Trzustka leży pozaotrzewnowo, choć na przedniej i dolnej powierzchni okryta jest otrzewną. Ma budowę zrazikową, z niewielką ilością luźnej tkanki łącznej właściwej, pomiędzy zrazikami. Zarówno na powierzchni, jak i w mięszu trzustki występują liczne skupienia tkanki tłuszczowej (Ostrowski 1995, str. 674).



Ryc.1 Anatomia trzustki (źródło: Bardeesy i wsp., 2002).

Trzustkę penetrują dwa przewody, których zadaniem jest odprowadzenie soku trzustkowego do dwunastnicy. Pierwszy z nich, *ductus pancreaticus*, zwany jest również przewodem trzustkowym głównym (*Wirsünga*), (Ryc.1). Uchodzi on na brodawce dwunastniczej większej

(brodawka Vatera), najczęściej łącząc się tam z drogami żółciowymi w przewód żółciowy wspólny. Drugi przewód trzustkowy – dodatkowy (*ductus pancreaticus accessorius*) zwany przewodem trzustkowym Santoriniego (Ryc.1). Oba uchodzą najczęściej obok siebie w obrębie wspomnianej wcześniej brodawki dwunastnicy (Ostrowski 1995, str. 674). Trzustkę unaczynniają trzy tętnice średniego kalibru. Są to: tętnica śledzionowa pochodząca od pnia trzewnego oraz dwa typy tętnicy trzustkowo-dwunastniczej (górna i dolna). Unerwienie przywspółczulne pochodzi od nerwu błędnego, natomiast współczulne ze splotu współczulnego.

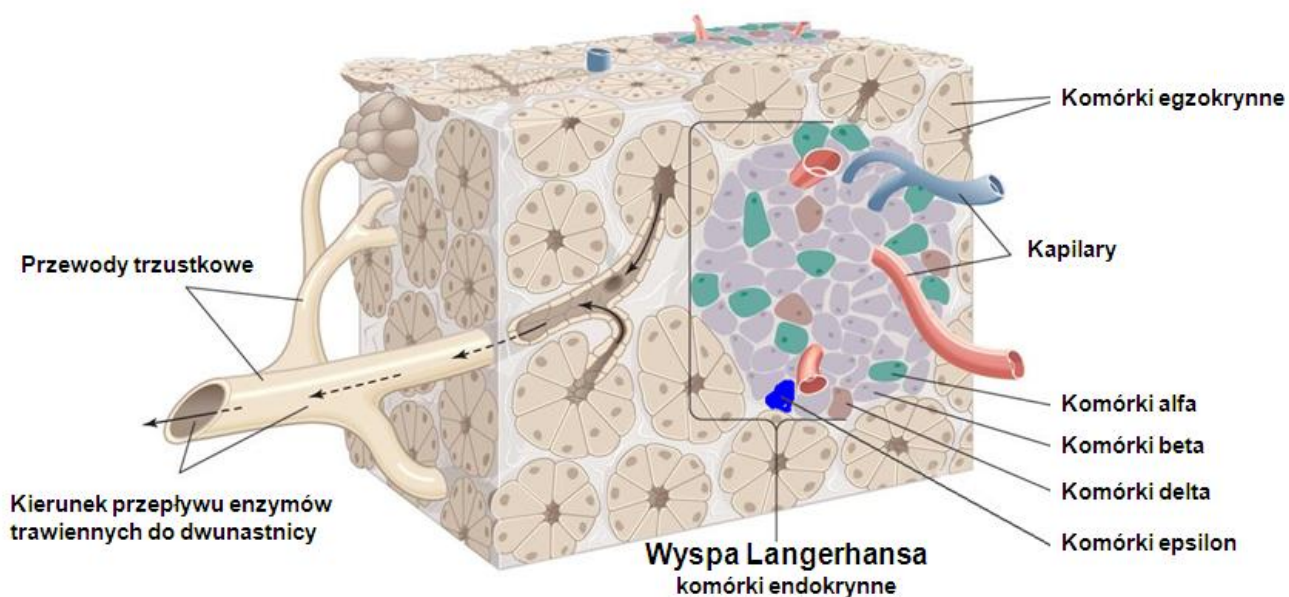
2.1.2. Zarys budowy histologicznej trzustki

Histologicznie, w obrębie trzustki wyróżnić można dwa elementy o charakterze: zewnątrz- i wewnątrzwydzielniczym. Część zewnątrzwydzielniczą tworzą komórki pęcherzykowe zebrane w pęcherzyki i zraziki trzustki, produkujące enzymy trawienne. Część wewnątrzwydzielniczą tworzą wyspy Langerhansa trzustki. Szacuje się że w dorosłym organie znajduje się około 1-2 milionów wysp Langerhansa, przy czym na poszczególną wyspę przypada około 1-3 tysięcy komórek (Bilous i Donnelly 2010, str. 22).

Endokrynną część trzustki, zebrana w drobne skupienia komórek dokrewnych, syntetyzuje i uwalnia cztery główne typy hormonów: glukagon, insulinę, somatostatynę oraz polipeptyd trzustkowy, których główną rolą jest utrzymanie odpowiedniego poziomu krążącej we krwi glukozy (Guyton i Hall 2005, str. 961). Hormony te wydzielane są przez cztery główne rodzaje komórek, odpowiednio: α , β , δ i PP (Edlund, 2001; Brissova i wsp., 2005; Cabrera i wsp., 2006). Hormon GHREL, wydzielany jest przez nowy typ komórek, komórki ϵ (Wierup i wsp., 2002; Prado i wsp. 2004), (Ryc.2). Stanowią one piąty typ komórek, choć fakt ten był do niedawna kwestią kontrowersyjną, jako że ekspresję GHREL opisywano również tak w komórkach α (Date i wsp., 2002), jak i β trzustki (Volante i wsp., 2002a).

Komórki β wydzielające insulinę, występują w wyspie w największych ilościach. U gryzoni zebrane są głównie w środkowej części wyspy i stanowią około 60% wszystkich jej komórek. Komórki α wydzielające glukagon, zlokalizowane są na obwodzie wyspy i stanowią do 25% komórek wyspy. Komórki δ wydzielające somatostatynę znajdują się również na obrzeżu wyspy i występują rzadziej niż poprzednie typy, stanowiąc około 10% komórek (Guyton i Hall 2005, str. 961). Czwarty typ komórek stanowią komórki PP (0,2-2%) wydzielające polipeptyd trzustkowy (Ostrowski 1995, str. 677). Piąty typ komórek, komórki wydzielające GHREL, występują

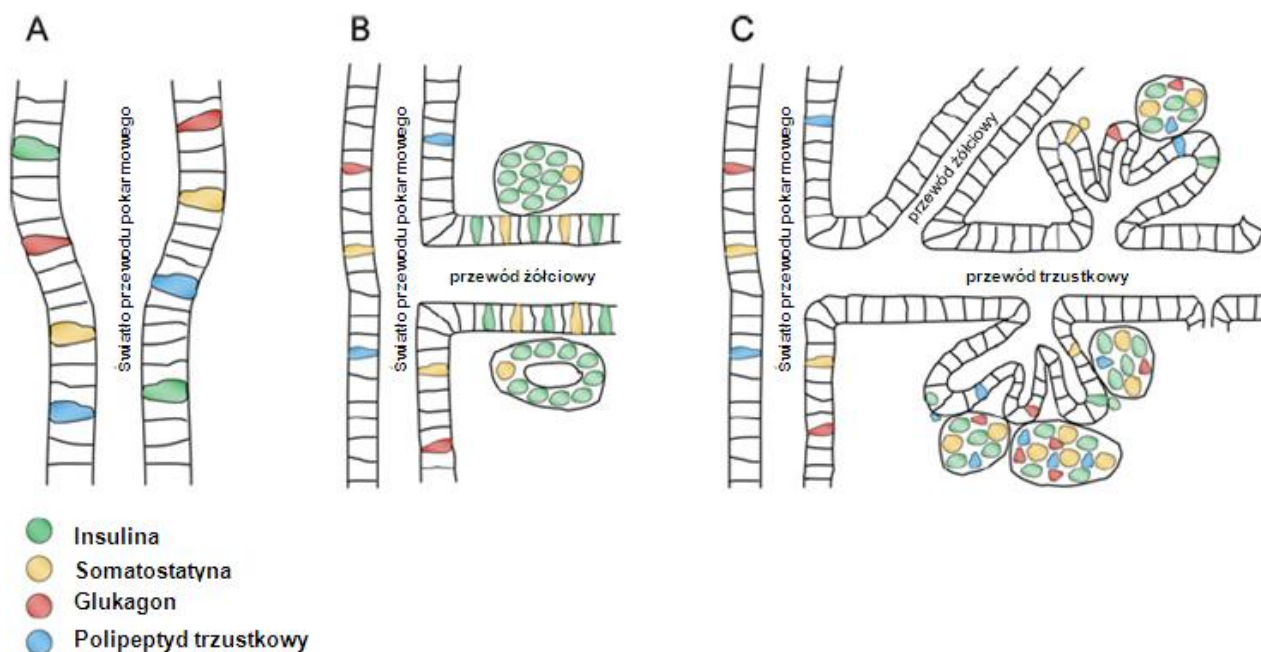
najczęściej na obrzeżu wysp, stanowiąc najmniej liczną grupę komórek endokrynych w pełni wykształconym organie trzustki (Wierup i wsp., 2002).



Ryc.2 Budowa histologiczna trzustki (źródło: Encyclopedia Britannica www.britannica.com [data dostępu 09.01.2013]).

2.1.3. Ewolucja trzustki

W 1980 roku, morfologiczne oraz immunohistochemiczne badania porównawcze umożliwiły bardzo szczegółową rekonstrukcję ewolucji trzustki (Falkmer 1985, str. 17–52), (Falkmer, 1993; Slack, 1995). Trzustka, jako organ podwójnego wydzielania (egzo- i endokrynnego), specyficzna jest dla kręgowców. U owadów, jedynym źródłem hormonów regulujących metabolizm są komórki neurosekrecyjne mózgu (El-Salhy i wsp., 1983), podczas gdy bezkręgowce posiadają już przewód pokarmowy usiany różnymi rodzajami komórek egzo- i endokrynych. Komórki endokryne są rozsiane i nie tworzą zgrupowań funkcjonalnych (Ryc.3.A), (Reinecke, 1981). Kręgowce, czyli płazy, gady, ptaki oraz ssaki charakteryzuje zbliżona anatomia trzustki (Wessells i Cohen, 1967; Pictet i wsp., 1972; Slack, 1995; Maake i wsp., 1998; Kelly i Melton, 2000; Afelik i wsp., 2004).



Ryc.3 Ewolucja wysp trzustkowych (źródło: Falkmer, 1985). (A) U lancetnika (przedstrunowiec), cztery typy komórek endokrynych rozrzuconych jest w błonie śluzowej przewodu pokarmowego. Nie tworzą one zgrupowań. (B) U śluzic atlantyckich (bezzuchowce) komórki produkujące insulinę (99%) oraz somatostatynę (1%) wyrastają w postaci zgrupowań komórek ze ścian przewodu żółciowego, tworząc po raz pierwszy w ewolucji struktury przypominające wyspy. W błonie śluzowej przewodu pokarmowego brak jest komórek produkujących insulinę, podczas gdy znajdują się tam komórki produkujące somatostatynę, glukagon oraz polipeptyd trzustkowy. Komórki produkujące dwa ostatnie hormony znajdują się wyłącznie w śluzówce przewodu pokarmowego. (C) U rekinów oraz płaszczek (ryby chrzęstnoszkieletowe) pojawiają się zgrupowania komórek endokrynych wydzielające cztery główne hormony: insulinę, glukagon, somatostatynę oraz polipeptyd trzustkowy. Wszystkie komórki, poza tymi wydzielającymi insulinę można również znaleźć w błonie śluzowej przewodu pokarmowego. Część egzokryna trzustki tworzy się poprzez rozgałęzianie się i składanie przewodów trzustkowych.

Gatunki ryb różnią się znacznie tak pod względem złożoności jak i ilości struktur trzustkowych, co odzwierciedla poszczególne szczeble ewolucji (Ostberg i wsp., 1975, 1976; Youson i Al-Mahrouki, 1999; Field i wsp., 2003; Yee i wsp., 2005). Bardzo prymitywna trzustka obecna jest u śluzic atlantyckich (*Myxine glutinosa*); składa się ona ze zbiorowisk komórek ściśle związanych z przewodem żółciowym i w większości (blisko 99%) składających się z komórek produkujących insulinę. Komórki te nie występują już w błonie śluzowej przewodu pokarmowego

(Ryc.3.1B). Ten prosty organ endokryny nie posiada funkcji egzokryny. Prymitywna część egzokryna trzustki pojawia się u zrosłogłowych ryb chrzęstnoszkieletowych. Przewód trzustkowy kończy się bezpośrednio w świetle przewodu pokarmowego i połączony jest ze strukturą granulowaną złożoną z trzech różnych rodzajów komórek endokrynych produkujących: insulinę, STT oraz glukagon (Yui i Fujita, 1986). Podstawowa organizacja funkcjonalna trzustki u wyższych kręgowców najlepiej widoczna jest na przykładzie chrzęstnoszkieletowych ryb spodoustych, takich jak rekiny i płaszczki. Trzustka taka zawiera część endokryną składającą się z czterech głównych rodzajów komórek, jak i część egzokryną, wyodrębniającą się z przewodów trzustkowych (Ryc.3.1C) (El-Salhy, 1984). U ryb kostnoszkieletowych cztery rodzaje komórek endokrynych składają się na wyspę, tworząc ciało Brockmanna (wyspa prymitywna). Ewolucja komórek epsilon produkujących ghrelinę pozostaje jednak nadal nieznaną.

2.1.4. Hormony trzustki

2.1.4.1. Insulina

Jedynym miejscem wydzielania insuliny w organizmie ludzkim są komórki β trzustki (Ostrowski 1995, str. 674). Ten kluczowy hormon anaboliczny obniża stężenie glukozy we krwi – magazynując ją w postaci glikogenu, głównie w komórkach wątroby i komórkach mięśni. Wpływa istotnie nie tylko na metabolizm węglowodanów, lecz także białek oraz tłuszczów. Insulina była po raz pierwszy wyizolowana z trzustki przez Bantinga i Besta w 1921 roku (Murray, 1969). Odkrycie insuliny umożliwiło skuteczne leczenie cukrzycy, a Bantingowi przyniosło 2 lata później Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny (którą podzielił się ze swym młodszym kolegą, Bestem, niesłusznie pominiętym przez komitet przyznający nagrodę) (Guyton 2005, str. 961). Już w niespełna dwa lata po odkryciu i opisanu insuliny, dokonano pierwszej przemysłowej produkcji tego hormonu.

Niedobór insuliny prowadzi do wystąpienia zaburzeń gospodarki węglowodanowej, przede wszystkim cukrzycy. Stąd ogromne zainteresowanie biologią tak samych komórek β , jak i całą wyspą Langerhansa trzustki oraz wzajemnymi relacjami endokrynowymi odpowiedzialnymi za modulowanie sekrecji insuliny. Wiele uwagi poświęca się również alternatywnym źródłom pozyskiwania komórek produkujących jak i wydzielających insulinę. Poza dobrze rozpoznany i opisany w literaturze, antagonistycznym wpływem glukagonu oraz somatostatyny na uwalnianie hormonu komórek β , również GHREL odgrywa istotną rolę w tych procesach. W stężeniowo

zależnych dawkach hamuje (Peng i wsp., 2012), lub też stymuluje sekrecję insuliny (Lee i wsp., 2002).

2.1.4.2 Glukagon

Glukagon działa antagonistycznie w stosunku do insuliny. Powoduje rozkład glikogenu w wątrobie, zwiększając tym samym stężenie glukozy we krwi (Ostrowski 1995, str. 674). Sygnałem do produkcji glukagonu jest spadające, poniżej wartości granicznej, stężenie krążącej we krwi glukozy. Uwolniony w konsekwencji tego glukagon, poza przemianą glikogenu w glukozę stymuluje również sekrecję insuliny. Wzrastające poziomy insuliny oraz STT hamują syntezę oraz sekrecję glukagonu. Glukagon opisano po raz pierwszy w 1923 roku (Kimball i Murlin, 1923). Kimball i Murlin badali nowy hormon o właściwościach hiperglikemicznych już od 1920 roku. Za syntezę i sekrecję glukagonu w endokrynnej części trzustki odpowiedzialne są komórki α , które u gryzoni zlokalizowane są na obrzeżu wysp.

2.1.4.3. Somatostatyna i polipeptyd trzustkowy

SST wydzielana jest tak przez komórki δ wysp Langerhansa, jak i przez komórki przewodu pokarmowego oraz układu nerwowego. Jej głównym zadaniem jest hamowanie wydzielania somatotropiny przez przysadkę, oraz pepsyny i kwasu solnego przez żołądek. Działa również hamująco na sekrecję insuliny i glukagonu w wyspach trzustkowych (Ostrowski 1995, str. 674). Piąty podtyp receptora SST obecny jest w błonie komórkowej komórek β . SST wiążąc się ze swoim receptorem na powierzchni komórek insulinowych, hamuje sekrecję insuliny u gryzoni (Tzotsas i wsp., 2008). Również GHREL hamuje sekrecję SST z wysp trzustkowych myszy i szczura (Qader i wsp., 2008).

PP oddziałuje antagonistycznie w stosunku do SST na wydzielanie kwasu solnego przez żołądek. SST hamuje również sekrecję PP. Uwalnianie PP nasila się po przyjęciu posiłku. PP zmniejsza wydzielanie trzustkowe, hamuje kurczliwość pęcherzyka żółciowego i pobudza wydzielanie żołądkowe, a także opóźnia opróżnianie żołądka. Wpływa także na produkcję glikogenu przez wątrobę i odgrywa rolę w regulacji motoryki jelit. Przez pobudzenie układu współczulnego, zwiększa wydatek energetyczny. PP syntetyzowany i wydzielany jest przez

komórki PP wysp Langerhansa. Zlokalizowane są one głównie na obrzeżu wyspy i rozsiane są luźno w jej obszarze (Qader i wsp., 2008).

2.1.4.4. Ghrelina

GHREL to nowoodkryty hormon, którego działanie polega przede wszystkim na stymulacji wydzielania hormonu wzrostu oraz zwiększaniu łaknienia. GHREL syntetyzowana jest głównie przez komórki błony śluzowej żołądka (Sakata i wsp., 2002), oraz w komórkach endokrynej części trzustki (Date i wsp., 2002; Volante i wsp., 2002; Wierup i wsp., 2002). Stwierdzono również, że GHREL w niewielkich ilościach jest wytwarzana miejscowo w jądrze łukowatym podwzgórza (Korbonits i wsp., 1999). Szczegółowy opis historii odkrycia jak i jej funkcji biologicznych przedstawiony został w kolejnym rozdziale tejże pracy.

2.2. Morfogeneza trzustki

Morfogeneza i wzrost endokrynej części trzustki nie były jak dotąd szczegółowo prześledzone i opisane u człowieka, pomimo istotnego znaczenia tak ze względu na zrozumienie mechanizmów rozwojowych samego organu, jak i patogenezy wielu chorób, między innymi cukrzycy. Najlepiej poznany jest proces różnicowania się komórek endokrynych u zarodków myszy, choć i tak jest on nadal bardzo schematyczny i uproszczony (Bielańska-Osuchowska 2004, str.310). Badania na *bubalus bubalis* (buffalo) wykazały, że udział części endokrynej trzustki zmienia się wraz z rozwojem płodowym osobnika, wykazując niewielkie tendencje wzrostowe, natomiast zdecydowanie większy wzrost procentowego udziału w masie trzustki obserwuje się dla komponentu egzokrynnego (Lucini i wsp., 1988) w konsekwencji czego dorosłą trzustkę tworzy około 97% komórek egzokrynych i zaledwie 2-3% komórek endokrynych. Komórki endokryne w dorosłym organie opisane zostały po raz pierwszy przez Paula Langerhansa (1869 rok) i nazwane zostały wyspami Langerhansa trzustki.

Już w okresie rozwoju embrionalnego człowieka, z nabłonka endodermalnego dwunastnicy wyodrębnia się część zewnątrzwydzielnicza trzustki. Nabłonek ten wytwarza trzy zawiązki: zawiązek grzbietowy, oraz zawiązek brzuszny prawy i lewy (Pictet i wsp., 1972). Lewy zawiązek brzuszny zanika, a pozostałe na skutek zwrotów dwunastnicy mających miejsce podczas rozwoju jelit, zrastają się ze sobą. Dalej, w trakcie rozwoju, oba zawiązki wydłużają się w dwa przewody,

rozgałęziając się z czasem w liczne boczne odgałęzienia, które w dorosłym organie stanowią układ przewodów wyprowadzających trzustki. Na końcach rozgałęzień przewodów wyprowadzających formują się pęcherzyki wydzielnicze części egzokrynej trzustki (Ostrowski 1995, str. 676). Pochodzenie komórek endokrynych wysp trzustkowych nie zostało jak na razie ostatecznie dowiedzione. Sugeruje się, że wyspy powstają z nabłonka endodermalnego. Zgodnie z tą teorią, z drobnych przewodów trzustkowych już w trzecim miesiącu rozwoju, wyrastają pasma nabłonkowe w których centrum nie pojawia się światło – tworząc wyspy Langerhansa trzustki (Ostrowski 1995, str. 677). Najwcześniej w rozwoju ludzkiej trzustki pojawiają się komórki GLUK-ip, następnie komórki INS-ip (Stefan i wsp., 1983; Tornehave i wsp., 1993), SS-ip i PP-ip (Fuji, 1979). Komórki zawierające w swej cytoplazmie glukagon pojawiają się u myszy w grzbietowym pączku trzustkowym bardzo wcześnie, bo około 9,5 dnia po zapłodnieniu (Bielańska-Ostuchowska 2004, str. 310). Następnie, podczas łączenia się pączków brzusznych z pączkiem grzbietowym trzustki, w ścianie pierwotnych przewodów wyprowadzających pojawiają się komórki polihormonalne produkujące równocześnie glukagon i insulinę (Pin i wsp., 2001). Profile ekspresji genów podczas rozwoju trzustki człowieka opracowywane są na podstawie porównań z profilami ekspresji genów podczas rozwoju trzustki gryzoni.

2.2.1. Rola czynników transkrypcyjnych w morfogenezie trzustki

Cały szereg czynników transkrypcyjnych może służyć do zidentyfikowania komórek progenitorowych trzustki, na długo zanim ekspresja trzustkowych markerów różnicujących może być zaobserwowana (Edlund, 2002; Murtaugh i Melton, 2003; Jensen, 2004; Cerf i wsp., 2005; Habener i wsp., 2005). Precyzyjna kombinacja czynników transkrypcyjnych wydaje się być niezbędna w procesie specyfikacji komórek trzustkowych, jako że ekspresja niektórych z nich zachodzi również poza regionem trzustki. Szczególnie istotne są: Pdx1 oraz Ptf1a/p48. Utrata Pdx1 powoduje całkowitą agenezję trzustki (Ahlgren i wsp., 1996), podczas gdy nokaut czynnika transkrypcyjnego Ptf1a/p48 prowadzi do wybiórczej utraty części egzokrynej trzustki (Krapp i wsp., 1998). Podobnie, wyciszenie ekspresji Ptf1a/p48 u embrionów żaby oraz Danio pręgowatego hamuje ekspresję markerów części egzokrynej trzustki (Lin i wsp., 2004; Zecchin i wsp., 2004). Tak Pdx1 jak i Ptf1a/p48 wykazują koekspresję w trzustkowych komórkach progenitorowych (Kawaguchi i wsp., 2002); podczas gdy endodermalna ekspresja Ptf1a/p48 wydaje się być ograniczona do komórek trzustki, ekspresja Pdx1 obecna jest również w komórkach żołądka i dwunastnicy (Guz i wsp., 1995). Na późniejszych etapach rozwoju, Pdx1 zyskuje wyłączną specyficzność dla

komórek β , podczas gdy Ptf1a/p48 jest specyficzny dla komórek części egzokrynej trzustki (Krapp i wsp., 1996). Za wykształcenie się komórek endokrynych odpowiedzialny jest kluczowy czynnik transkrypcyjny Ngn3. Ekspresję Ngn3 obserwuje się w komórkach pro-endokrynych. Różnicowanie się jak i dojrzewanie endokrynych komórek progenitorowych w pełni funkcjonalne komórki endokryne, jest wynikiem ekspresji grupy kluczowych czynników transkrypcyjnych takich jak: Arx, Pax4, Ipf1, Nkx2-2, Nkx6-1, MafA, MafB, Neurod1, Pax6 oraz Isl1 (Edlund, 1998, 1999, 2002; Bonal i Herrera, 2008; Oliver-Krasinski i Stoffers, 2008).

2.2.2. Regeneracja trzustki

Trzustka człowieka dorosłego posiada ograniczoną możliwość regeneracji. Przy częściowej pankreatektomii, struktury przypominające wyspy różnicują się z nabłonka przewodów trzustkowych. Tak nowoformujące się wyspy przechodzą bardzo zbliżoną do embriogenezy formację w dojrzałe wyspy. Sugeruje to obecność multipotentnych komórek prekursorowych w trzustce człowieka dorosłego (Bonner-Weir i Sharma, 2002; Holland i wsp., 2004). Wyniki ostatnich badań sugerują, że to pierwotne komórki transkrybujące gen insuliny, mogą stanowić najważniejsze źródło komórek β u dorosłego człowieka (Dor i wsp., 2004). Nie wyklucza to istnienia małej populacji komórek pozytywnych dla insuliny, które służą jako multipotentny prekursor komórek β , posiadający znaczną zdolność proliferacyjną. Takie komórki prekursorowe wydają się być obecne tak w samych wyspach jak i w ścianach przewodów trzustkowych i mogą być źródłem nie tylko komórek endokrynych ale i nerwowych, co w warunkach *in vitro* potwierdził Seaberg i wsp., w 2004 roku (Seaberg i wsp., 2004). Nie jest to zaskakujące, jako że istnieje hipoteza iż komórki endokryne mogły pochodzić i wykształcić się z komórek neuroendokrynych mózgu. Oba rodzaje komórek posiadają wspólną grupę czynników transkrypcyjnych, takich jak neurogenina oraz Notch/Delta. Zgodnie z regeneracyjnymi procesami zachodzącymi w wątrobie człowieka dorosłego (Black i wsp., 2004), proliferacja zróżnicowanych komórek, oraz aktywacja rzadkich komórek prekursorowych multipotencjalnych może definiować dwie alternatywne ścieżki regeneracji trzustki człowieka dorosłego. Niestety, istnienie komórek macierzystych trzustki nie zostało jak dotąd udowodnione.

2.2.3. Różnicowanie się komórek trzustki z endodermy nietrzustkowej

W rozwoju embrionalnym, zawiązek brzuszny trzustki oraz wątroba pochodzą ze wspólnej populacji komórek prekursorowych. Ta bliska zależność pomiędzy wątrobowymi i trzustkowymi komórkami progenitorowymi potwierdzona jest również istnieniem przypadków, w których stwierdzono obecność komórek o charakterze trzustkowym w wątrobie. Uszkodzenie chemiczne wątroby, jak i nowotworzenie, było skorelowane z transdiferencjacją dorosłej wątroby w trzustkę (Rao i wsp., 1986; Lee i wsp., 1989). Jednakże, w tych przypadkach nie obserwowano tworzenia się pełnowartościowych komórek β , które muszą charakteryzować się sekrecją produkowanego przez nie hormonu, insuliny. Najnowsze wyniki doświadczeń mających na celu transdiferencjację wątroby w trzustkę, wskazują, że kluczowa jest strategia ektopowej ekspresji czynników transkrypcyjnych, istotnych w rozwoju trzustki. Dlatego tak ważne jest poznanie wszystkich tych czynników, jak i zależności pomiędzy nimi, podczas rozwoju trzustki człowieka. Udowodniono, że możliwa dzięki wprowadzeniu za pomocą adenowirusa, ekspresja genu *Pdx1* w dorosłej wątrobie zapoczątkowała u myszy ekspresję genów charakterystycznych tak dla egzo- jak i endokrynej części trzustki (Ferber i wsp., 2000; Ber i wsp., 2003; Kojima i wsp., 2003). Aktywna wersja *Pdx1* (*Pdx1*-VP16), która nie jest zależna od obecności innych kofaktorów, jest wystarczająca dla transformacji wątroby w trzustkę ektopową u transgenicznych embrionów *Xenopus* (Horb i wsp., 2003). Obserwowano różnicowanie się endodermalnych komórek *Pdx1*-pozytywnych poza regionem trzustki w trzustkę. Wymaga to ektopowej ekspresji drugiego istotnego czynnika transkrypcyjnego, *Ptf1a/p48*, który jest normalnie obecny w trzustkowych komórkach prekursorowych. Również utrata specyficznego czynnika transkrypcyjnego może prowadzić do transdiferencjacji endodermy nietrzustkowej w trzustkę. Wykazane to zostało poprzez indukcję ekspresji genów charakterystycznych dla trzustki w drogach żółciowych, gdzie inaktywowano *Hes1* embrionów myszy (Sumazaki i wsp., 2004). We wszystkich tych doświadczeniach należy jeszcze wykazać pochodzenie oraz tożsamość komórek, które różnicują się w komórki trzustki. Możliwym jest, że te endodermalne komórki prekursorowe o charakterze multipotentnym zlokalizowane są w różnych miejscach, tak poza, jak i w samej trzustce. Nie można jednak wykluczyć hipotezy, że komórki te powstają na drodze dedyferencjacji z istniejących już, wykształconych komórek (Jensen i wsp., 2005; Means i wsp., 2005).

2.2.4. Różnicowanie się komórek trzustki z embrionalnych, prekursorowych komórek pluripotencjalnych (polihormonalne)

Bardzo atrakcyjna zdaje się być metoda tworzenia komórek trzustki, szczególnie komórek β , wytwarzających i uwalniających insulinę, z komórek embrionalnych lub z dorosłych komórek macierzystych. Takie podejście mogłoby też służyć stworzeniu systemu *in vitro* w celach zrozumienia procesów różnicowania się ludzkich komórek trzustki w procesie morfogenezy. Dotychczas stworzono kilka protokołów opisujących wytworzenie *in vitro* komórek produkujących insulinę z macierzystych komórek embrionalnych myszy (Lumelsky i wsp., 2001; Hori i wsp., 2002; Kahan i wsp., 2003). Wyniki uzyskane przez Lumelsky i wsp., w 2001 roku zostały jednak zakwestionowane (Rajagopal i wsp., 2003), tak więc kryteria determinujące, na poziomie molekularnym, funkcjonalną komórkę β wytworzoną w warunkach *in vitro* wymagają sprecyzowania. Szczegółowa wiedza na poziomie molekularnym dotycząca mechanizmów, które determinują tworzenie się trzustki podczas rozwoju embrionalnego, powinny pomóc w zrekonstruowaniu właściwej kombinacji procesów regulacyjnych, obecnych w trakcie embriogenezy. Połączenie takiego podejścia z ektopową ekspresją czynników transkrypcyjnych Pax4 i Pdx1, istotnych w różnicowaniu się komórek beta trzustki, okazały się owocne w tworzeniu komórek o charakterze komórek β z embrionalnych komórek macierzystych myszy (Blyszczuk i wsp., 2003; Miyazaki i wsp., 2004). Dalszy postęp w tym kierunku może, w konsekwencji, umożliwić zdefiniowanie systemu hodowli komórek *in vitro*, gdzie kontrolowane różnicowanie się wybranych komórek trzustki będzie możliwe. Podsumowując – wiedza uzyskana z modeli różnicowania się komórek u ryb, żab, ptaków i myszy umożliwiła zdefiniowanie wspólnych, kluczowych czynników transkrypcyjnych istotnych w rozwoju multipotentnych komórek prekursorowych trzustki, na wczesnych etapach embriogenezy.

2.3. Ghrelina – historia i funkcje biologiczne

2.3.1. Historia ghreliny

Historia samej GHREL jest krótka, sięga zaledwie roku 1999, w którym Masayasu Kojima wraz z grupą naukowców z Instytutu Narodowego w Suita, w Japonii, zidentyfikował i opisał GHREL jako ligand GHS-R, (Kojima i wsp., 1999). Po uzyskaniu drogą syntetyczną w 1976 roku

analogów metylowanej enkefaliny (Bowers i wsp., 1981), Smith i współpracownicy sklonowali w 1996 roku receptor dla GHS, inny niż dla GHRH (Howard i wsp., 1996). Obecność GHS-R potwierdzono w różnych tkankach, wyróżniając podtypy: GHS-R1a, który znajduje się przede wszystkim w przysadce, tarczycy, trzustce, śledzionie i nadnerczach, a także GHS-R1b, który występuje w większości tkanek organizmu (Gananapavan i wsp., 2002). Nowy endogenny ligand działający przez GHS-R po raz pierwszy opisano w 1999 roku (Kojima i wsp., 1999). Od tego momentu rozpoczęto intensywne badania w kierunku poznania dokładnych funkcji biologicznych GHREL, oraz biologii i fizjologii komórek syntetyzujących i wydzielających tenże hormon. W dorosłym organizmie GHREL jest syntetyzowana głównie w komórkach X/A-podobnych żołądka (Kojima i wsp., 1999; Sakata i wsp., 2002). Ekspresję GHREL obserwowano również w takich tkankach jak: jelito cienkie, limfocyty, łożysko, płuca, nerki, mózg i gonady (Gualillo i wsp., 2003; Wei i wsp., 2005). Po raz pierwszy komórki GHREL-ip zostały opisane jako piąty typ komórek endokrynnej części trzustki w 2002 roku przez szwedzkiego naukowca Nilsa Wierupa. W świetle tych nowych odkryć – perspektywa zrozumienia złożonych procesów determinujących na poziomie transkrypcyjnym różnicowanie się poszczególnych typów komórek endokrynnej części trzustki w rozwoju, stała się jeszcze bardziej nagląca.

2.3.2. Funkcje biologiczne

Działanie GHREL polega przede wszystkim na stymulacji wydzielania GH, oraz zwiększaniu łaknienia. W regulacji wydzielania GH uczestniczy także wiele innych substancji nazywanych GH-wydzielające, które działają poprzez swoisty receptor GHS. GHREL jest endogennym ligandem receptora GHS (Kojima i wsp., 1999). Pełni ona w organizmie różnorakie funkcje. Poza podstawową jej rolę w regulacji procesów zapewniających zarówno krótko-, jak i długoterminową homeostazę energetyczną organizmu, wpływa również w istotny sposób na wzrost i budowę narządów wewnętrznych ludzi i zwierząt. Niektóre nowotwory wywodzące się z przewodu pokarmowego oraz komórek endokrynnych trzustki wykazują ekspresję mRNA GHREL, co może wskazywać na wzmożoną syntezę tego hormonu w ich obrębie, a przez to wpływ na procesy nowotworzenia.

GHREL to hormon peptydowy złożony z 28 reszt aminokwasowych, wśród których istotną funkcję spełnia zmodyfikowana hydrofobowym związkiem w pozycji trzeciej, seryna (Kojima i wsp., 1999). GHREL powstaje w procesie potranslacyjnej obróbki ppGHREL. W dorosłym organizmie GHREL wytwarzana jest głównie przez komórki wydzielnicze błony śluzowej żołądka

(Sakata i wsp., 2002). Żołądkowe komórki X/A znajdują się w gruczołach dna żołądka wydzielających kwas solny (Muccioli i wsp., 2002) i stanowią dość istotną część komórek endokrynych błony śluzowej narządu, bo aż 20% (Date i wsp., 2000). GHREL poza żołądkiem obecna jest m.in. w przysadce mózgowej, nerkach, płucach i łożysku. Stwierdzono również, że GHREL wytwarzana jest miejscowo, w niewielkich ilościach, w jądrze łukowatym podwzgórza (Korbonits i wsp., 1999), oraz w komórkach endokrynej części trzustki (Date i wsp., 2002; Volante i wsp., 2002; Wierup i wsp., 2002). Obecność GHS-R1a wykazano w komórkach wysp Langerhansa (Gnanapavan i wsp., 2002). GHREL przyczynia się w ten sposób do modulowania sekrecji hormonów trzustki a w szczególności do spadku wydzielania insuliny prowadząc w konsekwencji do hiperglikemii (Tong i wsp., 2010). Działanie to podkreśla znaczącą rolę GHREL w przemianach glukozy, jako hormonu scalającego hormonalną i metaboliczną odpowiedź na zmniejszone pobranie pokarmu poprzez stymulację wydzielania GH, połączonego ze spadkiem sekrecji insuliny oraz aktywacji mechanizmów dążących do zachowania stężenia glukozy podczas głodzenia. Do najważniejszych bowiem funkcji GHREL u dorosłych zwierząt (szczurów) należy zwiększenie apetytu, stymulacja sekrecji GH, oraz motoryki przewodu pokarmowego. U ludzi, koncentracje GHREL wzrastają przed posiłkami i spadają 30 – 90 minut po posiłku (Cummings i wsp., 2001; Cummings i wsp., 2002). Uczucie głodu jest również efektem działania GHREL, co nasuwa hipotezę o istotnej jej funkcji w inicjacji pobrania pokarmu (Cummings i wsp., 2004). U dorosłych, zewnętrzne podanie GHREL powoduje hiperglikemię i obniża stężenie glukozy w surowicy (Broglia i wsp., 2001). Obniżenie poziomów krążącej GHREL obserwowano u nowo zdiagnozowanych pacjentów z cukrzycą typu 1, zanim wymagali oni jeszcze podania egzogennej insuliny. Efekt ten może być jednak efektem hiperglikemii (Soriano-Guillen i wsp., 2004a). Podane przykłady podkreślają bardzo bliską zależność GHREL z metabolizmem glukozy tak u dorosłych jak i w życiu płodowym. Stężenie GHREL we krwi jest podwyższone u pacjentów cierpiących na anoreksję (Misra i wsp., 2004) a obniżone u osób otyłych (Soriano-Guillen i wsp., 2004b). Wskaźnik masy ciała BMI, jest skorelowany negatywnie ze stężeniem GHREL we krwi (Wathmore i wsp., 2003; Bunt i wsp., 2003). Powrót do normalnej wagi ciała u osób cierpiących na anoreksję jak i spadek masy ciała u osób otyłych powodują normalizację poziomów GHREL we krwi (Soriano-Guillen i wsp., 2004b).

Wpływ GHREL na przyrost masy ciała oraz sekrecję płodowego GH pozostaje niewiadomy. GHREL mogłaby potencjalnie uczestniczyć w pozytywnym balansie energetycznym u płodu. Poziomy krążącej GHREL stale wzrastają podczas 2 pierwszych lat życia (Soriano-Guillen i wsp., 2004a). Następnie poziomy te spadają w późnym dzieciństwie i u osób dorosłych (Whatmore i wsp., 2003), bez wyraźnych różnic związanych z płcią (Bunt i wsp., 2003). Badania *in vitro*

wykazały pozytywny wpływ GHREL na proliferację komórek β trzustki oraz ich przeżywalność (Granata i wsp., 2007). Poza wpływem na uwalnianie hormonu wzrostu, GHREL pobudza też wydzielanie ACTH, kortykosteronu i prolaktyny (Broglio i wsp., 2003).

2.4. Dystrybucja komórek ghrelino-immunopozytywnych

2.4.1. Komórki ghrelino-immunopoztywne w rozwoju płodowym

W 20. tygodniu rozwoju płodowego zidentyfikowano w próbkach krwi pępowinowej stężenia GHREL podobne do stężeń w krwi osób dorosłych (Cortelazzi i wsp., 2003). Jednoznaczne źródło płodowej GHREL nie jest do końca znane. Dowiedziono, że komórki GHREL-ip obecne są w tarczycy płodów. Co ciekawe, nie ma ich w pełni wykształconym organie u osób dorosłych (Volante i wsp., 2003). Komórki wydzielające GHREL zidentyfikowano również w błonie śluzowej żołądka, ścianach jelita, płucach oraz trzustce płodu ludzkiego (Volante i wsp., 2002; Wierup i wsp., 2002). Istotna jest jednak obserwacja, że komórek GHREL-ip zlokalizowanych w żołądku jest zdecydowanie mniej niż tych, obecnych w trzustce (Wierup i wsp., 2002). Jest to sytuacja zupełnie odwrotna do tej, obserwowanej u człowieka dorosłego, gdzie komórki GHREL-ip zlokalizowane są przede wszystkim w żołądku (Wierup i wsp., 2002). W swej przełomowej pracy z 2002 roku, Wierup i współpracownicy opisali obecność znacznej liczby komórek GHREL-ip w trzustce płodów (Wierup i wsp., 2002). W 22. tygodniu rozwoju wewnątrzmacicznego komórki GHREL-ip stanowiły 11% wszystkich komórek endokrynnej części trzustki. Formowały one z czasem zbity pierścień okalający wyspę. Pojedyncze komórki GHREL-ip obecne były również w nabłonku przewodów trzustkowych (Wierup i wsp., 2002). Dowodzi to potencjalnie istotnej roli tego hormonu w regulacji procesów wzrostu i różnicowania w okresie rozwoju płodowego.

2.4.2. Komórki ghrelino-immunopoztywne w dojrzałym organizmie

W dorosłym organizmie komórki GHREL-ip zlokalizowane są głównie w żołądku, ale obecne są również w wielu innych tkankach i narządach, takich jak łożysko, jądra, nerki, przysadka, wyspy trzustki, okrężnica, tarczyca, limfocyty, mózg, płuca, jajniki (Lely van der i wsp., 2004; Date i wsp., 2002; Wierup i wsp., 2002; Gualillo i wsp., 2001; Mori i wsp., 2000; Popovic i wsp., 2003;

Tena-Sempere i wsp., 2002; Korbonits i wsp., 2001; Date i wsp., 2000; Volante i wsp., 2002; Hattori i wsp., 2001; Lu i wsp., 2002; Gaytan i wsp., 2003; Caminos i wsp., 2003; Kozakowski i wsp., 2004).

Obecność komórek GHREL-ip w pełni wykształconej trzustce została potwierdzona, jednak liczba komórek przypadających na wyspę była zdecydowanie niższa w porównaniu z wyspami płodowymi (Wierup i wsp., 2002). W niektórych wyspach nie opisano obecności komórek GHREL-ip. Blisko 1% komórek endokrynych w wyspach osób dorosłych wykazywała pozytywną reakcję immunohistochemiczną dla GHREL. Również w nabłonku przewodów trzustkowych, w części egzokrynej trzustki jak i w bliskości komórek nerwowych trzustki zlokalizowano pojedyncze komórki GHREL-ip (Wierup i wsp., 2002).

3. CEL PRACY

Podczas gdy mechanizmy specyfikacji oraz wzajemnych zależności pomiędzy czterema typami komórek endokrynych trzustki (α , β , δ oraz PP) są dobrze poznane, tak w organizmie dorosłym jak i podczas rozwoju płodowego, mechanizm różnicowania się i funkcji piątego typu komórek aparatu wyspowego, komórek ϵ w organizmie ludzkim jest niezgłębiony.

Celem prezentowanej pracy było zweryfikowanie hipotezy dotyczącej ontogenetycznej jak i morfogenetycznej odrębności komórek ϵ w stosunku do pozostałych komórek aparatu wyspowego ludzkiej trzustki. Cel ten realizowano poprzez:

- i. stwierdzenie w których komórkach wysp trzustki wytwarzana jest GHREL,
- ii. poszukiwanie liczby i rozmieszczenia komórek wykazujących pozytywną reakcję immunohistochemiczną dla GHREL w trakcie rozwoju płodowego oraz w pełni wykształconym organie, oraz porównanie ich z komórkami pozytywnymi dla głównych hormonów trzustki,
- iii. poszukiwanie ewentualnej kolokalizacji GHREL z hormonami trzustki w trakcie rozwoju płodowego oraz w pełni wykształconym organie,
- iv. poszukiwanie czynników transkrypcyjnych warunkujących odróżnicowanie komórek produkujących GHREL w trakcie rozwoju płodowego.

4. MATERIAŁY I METODY

4.1. MATERIAŁY

4.1.1. Izolowane wyspy Langerhansa trzustki człowieka

Wyspy izolowano z trzustek osób zakwalifikowanych jako dawcy wysp do przeszczepu, w celach transplantacji chorym na cukrzycę typu I-szego pacjentom. Każdorazowo określano masę całego narządu. Część wyizolowanego materiału przeznaczano na doświadczenia *in vitro*, celem weryfikacji założonych hipotez badawczych. Po izolacji, wyspy inkubowano w medium RPMI (10% FBS, PenStrep, Glutamina), w standarowych warunkach (37°C, 5% CO₂), przez noc. Następnego dnia reprezentatywną próbę wysp badano pod względem ich fizjologii (barwienie Ditizonem) i morfologii. Funkcjonalne wyspy rozdzielano według potrzeb.

4.1.2. Materiał histologiczny

Materiał histologiczny stanowiły wyłącznie tkanki ludzkie. W przeprowadzonych doświadczeniach wykorzystano trzustki płodowe znajdujące się na różnych etapach rozwoju, odwodnione i zatopione w parafinie. Do badań włączono również trzustkę z autopsji noworodka oraz trzustki pacjentów zakwalifikowanych jako dawcy wysp do przeszczepu. Zgodę na użycie tkanek w celach eksperymentalnych wydała lokalna komisja etyczna szpitala San Raffaele w Mediolanie. Badania zostały również zatwierdzone przez Lokalną Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, dnia 15 maja 2008 roku (Aneks).

4.1.2.1. Trzustka w rozwoju

Materiał do prezentowanych badań stanowiły preparaty (bloczki parafinowe) pochodzące w całości z kolekcji Katedry Anatomii Patologicznej (Dipartimento di Anatomia Patologica) szpitala San Raffaele w Mediolanie (Włochy), uzyskane dzięki współpracy nawiązanej w ramach odbytego

w szpitalu, stypendium naukowemu Marie Curie Fellowship. Materiał stanowiły pojedyncze trzustki płodów pochodzących ze spontanicznych aborcji, pomiędzy 13. a 39. tygodniem rozwoju. Spośród 256. tkanek płodowych zdeponowanych w latach 1988-2001 w zbiorach Katedry Anatomii Patologicznej szpitala San Raffaele, przebadano 57 tkanek, celem wykluczenia materiału z genetycznymi oraz pozagenetycznymi anomaliami rozwojowymi, aneuploidii jak również szerokopojętych wad rozwojowych płodu. Ostatecznie grupę badawczą stanowiły trzustki 24. płodów pomiędzy 13. a 39. tygodniem rozwoju, prezentujące doskonałe parametry jakościowe materiału histologicznego. Zostały one wstępnie poddane standardowemu barwieniu histologicznemu, celem sprawdzenia jakości pobranego materiału. Dodatkowo, materiał do prezentowanych badań stanowiła trzustka noworodka z autopsji.

4.1.2.2. Trzustka człowieka dorosłego

Trzustki osób dorosłych pochodziły od 32. pacjentów (20 mężczyzn i 12 kobiet) zakwalifikowanych jako dawcy organu (izolowane wyspy Langerhansa trzustki) do przeszczepu pacjentom z cukrzycą typu I-szego. Rutynowo, od dawców trzustek pobiera się skrawki histologiczne organu w celu oceny jakościowej materiału. Pobrane skrawki pochodziły zawsze z trzonu trzustki. Wiek dawców wynosił 48 ± 13 lat, a ich BMI $25,2 \pm 3,3$ kg/m². Stosunek M/F wynosił 5/3.

4.1.3. Przeciwciała

W większości zastosowano przeciwciała poliklonalne należące do klasy IgG. Przeciwciała te charakteryzują się dużym powinowactwem funkcjonalnym do antygeny (awidnością). Powinowactwo to jest wynikiem wiązania cząsteczki antygeny przez kilka przeciwciał rozpoznających różne jego epitopy, w wyniku czego powstają wielkocząsteczkowe kompleksy immunologiczne (Zabel 1999, str.15). Użyte podczas oznaczeń immunohistochemicznych przeciwciała pierwszo- i drugorzędowe oraz wykorzystane odczynniki zestawiono w tabelach prezentowanych poniżej (Tab.1, Tab.2).

Tab.1 Wykaz stosowanych przeciwciał pierwszorzędowych.

Antygen	Kod	Wyhodowane na	Stosowane rozcieńczenie	Źródło
GHREL	SC-10368	koza	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Insulina	A0564	świnka morska	1:100	Dako, Carpinteria, CA, USA
Glukagon	4030-01	królik	1:4	Linco Research, Inc.
SST	A566	królik	1:600	Dako, Carpinteria, CA, USA
PP	7100-0659	królik	1:400	Gentaur, Kampenhout, Belgium
SYP	ab14692	królik	1:1200	Abcam plc, Cambridge, UK
Pax6	AB5409	królik	1:1500	Chemicon International Inc.
Isl1	39.4D5	mysz	1:200	Columbia Univ., New York, USA
Nkx2-2	SC-25404	królik	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Nkx6-1	SC-15030	koza	1:150	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Tab.2 Wykaz stosowanych przeciwciał i odczynników drugorzędowych.

Przeciwciało	Kod	Stosowane rozcieńczenie	Źródło
Anti-goat, -mouse, -rabbit biotynylated MultiLink	E0453	1:100	DakoCytomation Denmark A/S
Mouse anti-goat IgM monoclonal antibody	SA1-25917	1:200	ABR-Affinity Bioreagents, Temaricerca, Bologna, IT
Fozfataza alkaliczna skoniugowana ze streptawidyną	ab64271	1:600	Abcam plc, Cambridge, UK
Anti-goat FITC	705-096-147	1:400	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
Anti-goat TRITC	705-026-147	1:400	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
Anti-rabbit FITC	711-096-152	1:400	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
Anti-rabbit TRITC	711-026-152	1:400	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
Anti-mouse FITC	715-096-150	1:400	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
Anti-mouse TRITC	715-026-150	1:400	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA

Przeciwciała przetrzymywano według zaleceń producenta, w większości stężenia podstawowe (1:1) zamrożone w temperaturze -20°C, natomiast robocze w 4°C w lodówce (nie dłużej niż 7 dni). Dodatkowo drugorzędowe przeciwciała immunofluorescencyjne zabezpieczano przed światłem folią aluminiową.

4.1.4. Gotowe zestawy do oznaczeń immunohistochemicznych

Stosowano dwa zestawy do oznaczeń immunohistochemicznych. Do barwień prostych (pojedynczych) używano zestawu firmy Biogenex, składającego się z biotynylowanego kompleksu rozpoznającego przeciwciała myszy, królika i świnki morskiej (Biotinylated Complex Super Enhancer; Biogenex, San Ramon, CA, USA) oraz enzymu związanego z awidyną (Super Sensitive; Biogenex San Ramon, CA, USA). Reakcję immunohistochemiczną wizualizowano za pomocą 3,3'-diaminobenzydyny jako chromogenu (kod: K3468; Dako North America, Carpinteria, CA, USA) dającego brązową reakcję barwną. Wszystkie preparaty podbarwiano hematoksyliną (kod: 51275; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany).

Podwójną immunohistochemię (barwienia złożone) wykonywano przy użyciu zestawu stosowanego do barwień prostych (chromogen brązowy) oraz zestawu VectorRed (chromogen czerwony), (Vector Red Substrate Kit; kod: SK-5100; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Immunohistochemia podwójna możliwa była do przeprowadzenia jedynie w przypadku, kiedy oznaczane były białka wykazujące zróżnicowaną lokalizację w obrębie komórki. W prezentowanej pracy oznaczano czynnik transkrypcyjny (zlokalizowany w jądrze komórkowym), oraz GHREL (lokalizacja cytoplazmatyczna). Tylko przy spełnieniu powyższych założeń możliwe było prześledzenie ewentualnej koekspresji wymienionych białek metodami IHC.

4.1.5. Bufory, płyny i ich skład

Do przeprowadzania poszczególnych procedur tak immunohistochemicznych jak i immunofluorescencyjnych niezbędne było użycie różnego rodzaju buforów oraz płynów, których skład podano poniżej.

PŁYN BOUINA – UTRWALACZ

- 15 ml nasyconego wodnego roztworu kwasu pikrynowego (ok. 1,17g w 100 ml)
- 5 ml formaliny (38% formaldehyd)
- 1 ml kwasu octowego lodowatego

Pobrane wycinki utrwalono poprzez zanurzenie w płynie Bouina, w temperaturze pokojowej przez noc lub kilka dni. Płyn ten znajduje szerokie zastosowanie w przypadku peptydów i amin biogennych w komórkach dokrewnych lub nowotworowych oraz białek wewnątrzkomórkowych. Z utrwalonych w ten sposób wycinków, odwodnionych i zatopionych w parafinie, przygotowywane są następnie skrawki parafinowe (Zabel 1999 str. 20, 24).

BUFOR CYTRYNIANOWY (pH 6) – gotowanie tkanek w kwaśnym buforze cytrynianowym ma na celu odsłonięcie epitopów i odzyskanie antygenowości.

- dwuwodny sodek cytratu (cytrynian tri-sodu dwuwodny) $C_2H_5O_7Na_3 \times 2 H_2O$ (2,94 g)
- 1 ml Tween 20 (0,1 %)
- woda destylowana H_2O (1000 ml)

BUFOR Tris-EDTA (pH 9) – gotowanie tkanek w zasadowym buforze Tris-EDTA ma na celu odsłonięcie epitopów i odzyskanie antygenowości.

- Tris Base 1,21 g
- EDTA 0,37 g
- 1 ml Tween 20 (0,1 %)
- Woda destylowana H_2O (1000 ml)

BUFOR FOSFORANOWY PBS (pH 7,4) – bufor ten jest podstawowym buforem służącym do przemywania preparatów pomiędzy kolejnymi etapami inkubacji w immunohistochemii.

- chlorek sodu NaCl 8 g
- chlorek potasu KCl 2 g
- sodowy wodofosforan Na_2HPO_4 1,4 g
- potasowy fosforan KH_2PO_4 0,27 g
- 1 ml Tween 20 (0,1 %)
- woda destylowana H_2O (1000 ml)

BUFOR BLOKUJĄCY (BSA mix) – roztwór blokujący na bazie surowicy bydlęcej (Bovine serum albumin blocking solution, frakcja V). Służy do zablokowania niespecyficznego miejsca wiązania przeciwciał w badanym materiale. Po przygotowaniu bufor przechowywany może być w temperaturze 4°C przez okres do 6 miesięcy.

- NGS 2 g
- BSA (stabilizator) 1 g
- żelatyna (gelatin from cold water fish skin) 0,1 g
- Triton X-100 (wzmacniacz penetracji) 0,1 g
- azydek sodu (konserwant) 0,05 g
- 0,05% Tween 20 (detergent)
- 0,01 M PBS (pH 7,2) 100 ml

BUFOR DO ROZCIEŃCZANIA PRZECIWCIAŁ (IHC) – bufor może być przechowywany w temperaturze 4°C przez okres do 6 miesięcy. Nie należy go stosować do rozcieńczania przeciwciał skoniugowanych z peroksydazą, ponieważ składniki buforu są jej inhibitorem.

- BSA (stabilizator) 1 g
- żelatyna (gelatin from cold water fish skin) 0,1 g
- azydek sodu (konserwant) 0,05 g
- 0,01 M PBS (pH 7,2) 100 ml

MEDIUM DO ROZCIEŃCZANIA PRZECIWCIAŁ (IMF)

Do rozcieńczania przeciwciał stosowanych w immunofluorescencji używano 2% roztworu żelatyny (gelatin from cold water fish skin, Sigma).

MEDIUM DO BLOKOWANIA AUTOFLUORESCENCJI (IMF)

Do blokowania autofluorescencji tkanek stosowano roztwór glicyny (15mM), oraz żelatyny 0,2%.

4.1.6. Aparatura

Błoczki parafinowe krojono na mikrotomie firmy Microm HM 340E. Wszystkie etapy procedur IHC oraz IMF przeprowadzano w komorze wilgotnościowej (Linegal Chemicals Sp. Z o.o. ROTH) w celu utrzymania stałej wilgotności otoczenia w którym znajdowały

się oznaczane skrawki. Kuwety i pojemniki typu Hellendahl służyły do przemywania i zmieniania medium inkubacyjnego. Do odważania odczynników (waga laboratoryjna – Analytical AC 210P (Sartorius, Niemcy) i przygotowywania buforów używano mieszadła magnetycznego z podgrzewaczem IKA (IKA-WERKE, Niemcy) oraz pHmetru CP-411 (Elmetron, Zabrze-Grzybowice, Polska). W celu analizy wyników IHC wykorzystano mikroskop optyczny odwrócony – Axiovert 25 (ZEISS, Niemcy) z oprogramowaniem AxioVision Rel.4.4. Do obserwacji tkanek wybarwionych IMF użyto mikroskopu konfokalnego LSM 510 Meta (ZEISS, Niemcy) lub mikroskopu Leica DM5000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) z wbudowaną kamerą i aparatem cyfrowym (Evolution MP; Leica). Zdjęcia analizowano przy użyciu oprogramowania firmy Leica IM50 Image Manager.

4.2. METODY

4.2.1. Izolacja wysp Langerhansa od dawców i procedury towarzyszące

4.2.1.1. Izolacja wysp Langerhansa trzustki człowieka

Metoda izolacji wysp Langerhansa z trzustki człowieka opiera się na Protokole Edmonton - udoskonalonym przez grupę naukowców z kanadyjskiego Uniwersytetu Alberta w Edmonton. Procedura polega na pobraniu od dawców pośmiertnych trzustek i w jak najszybszym czasie – izolacji z nich wysp Langerhansa w celu transplantacji pacjentom z cukrzycą typu I-szego. Trzustka po pobraniu umieszczana jest bezpośrednio w środowisku zimnym (na lodzie). Usuwane są resztki dwunastnicy, śledziona, tłuszcz okołotrzewny i naczynia tak, aby nie naruszyć delikatnej torebki trzustki. Głowa trzustki oddzielona zostaje od jej trzonu. Kateter umieszczony zostaje w przewodzie trzustkowym w celu sperfundowania organu (oddzielnie głowy i trzonu z ogonem) roztworem zawierającym enzym kolagenazę (typ NB1, Sigma) w ilości 3ml na gram trzustki. Pierwsza perfuzja powinna być wykonana przy ciśnieniu 80 mm Hg. Przefiltrowanym przesączem perfunduje się trzustkę jeszcze dwukrotnie przy wyższym ciśnieniu wynoszącym 180 mm Hg. Z tak przygotowanego organu usuwa się jeszcze pozostałości tkanek niesperfundowanych i rozpoczyna 15 min. trawienie. Trzustkę umieszcza się w specjalnie do tego celu skonstruowanej komorze, zaopatrzonej w mieszalniki oraz systemy pomiaru temperatury i ciśnienia. Do komory wkłada się

dodatkowo 6 – 9 kulek, mających ułatwić rozdrobnienie masy trawiennej i uwolnienie wysp z części egzokrynnej. Wewnątrz komory umieszcza się filtr o szerokości porów 500 μm . Trawienie przeprowadza się w temperaturze 37°C. Co 4 min. pobiera się 2-3 ml próbkę mieszaniny trawiennej, dla sprawdzenia jakości trawienia (barwienie Ditizonem, analiza w mikroskopie świetlnym). Kiedy wyspy są dostatecznie oczyszczone z otaczających ją tkanek, trawienie przerywa się, gwałtownie oziębiając mieszaninę. Całość umieszcza się w pojemnikach na 250 ml, z których każdy zawiera po 20 ml ludzkiej surowicy, celem zablokowania dalszego trawienia kolagenazą. Tak przygotowaną mieszaninę wiruje się w 4°C, przez 1 min., z przyspieszeniem 100-150 x G, po usunięciu supernatantu pozostałość przemywa się dwukrotnie w ten sam sposób roztworem HBSS i przetrzymuje w 4°C przez 45-60 minut (tak zwane zimne trawienie). Uwolnione wyspy wraz z elementami części egzokrynnej rozdziela się w gradiencie stężeń (Euro-Ficoll) wirując bez przyspieszenia i z wyłączoną opcją hamowania ultrawirówki. Oczyszczoną w ten sposób frakcję wysp poddaje się analizie jakościowej w ten sposób, że pobiera się 50 μl próbki z każdych 30 ml otrzymanych po wirowaniu z Ficollem i inkubuje z Ditizonem dla oznaczenia jakości materiału.

4.2.1.2. Barwienie Ditizonem

W celu określenia prawidłowej fizjologii wysp oraz odróżnienia ich od komórek części egzokrynnej, wyspy poddano inkubacji z Ditizonem (D5130 Sigma). Barwienie to umożliwia przede wszystkim sprawdzenie funkcjonalności wysp, czyli ich zdolności syntezy insuliny. Ditizon ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-NH-NH-C(S)-N=N-C}_6\text{H}_5$) jest związkiem organicznym, stosowanym do wykrywania, oddzielania i oznaczania jonów wielu metali (między innymi cynku), z którymi tworzy barwne kompleksy. Reprezentatywną próbkę 100 wysp poddano 30 min. inkubacji z roztworem Ditizonu, przygotowanego przez rozpuszczenie 50mg Ditizonu w 50ml rozpuszczalnika (10ml DMSO + 40ml PBSx1). Wyspy syntetyzujące insulinę, czyli w pełni funkcjonalne, barwią się po inkubacji z Ditizonem na czerwono. Wybarwione wyspy trzustkowe liczone pod mikroskopem świetlnym odwróconym (Nicon Eclipse TS100) przy powiększeniu mikroskopu 100x i obliczano procentowy udział funkcjonalnych wysp w próbce. Do dalszych badań pobierano jedynie materiał, zawartość którego 80-90% stanowiły wyspy syntetyzujące insulinę.

4.2.2. Biologia molekularna

4.2.2.1. Projektowanie starterów do reakcji PCR

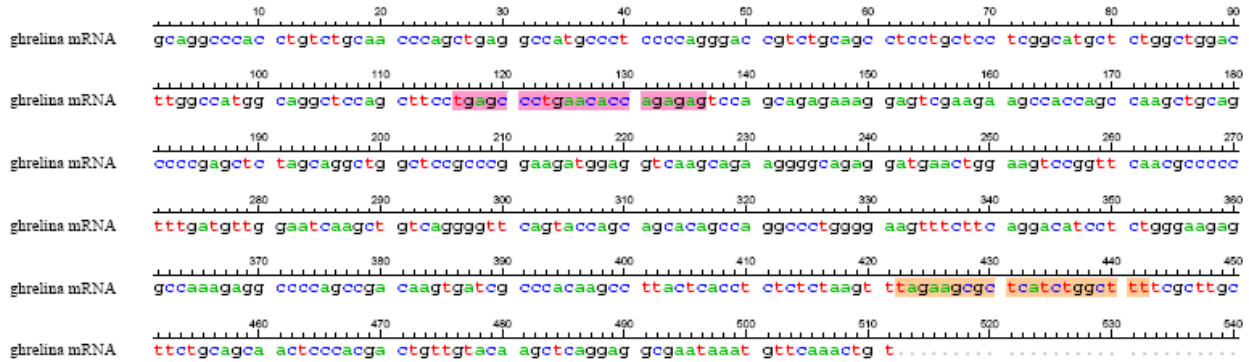
4.2.2.1.1. Startery dla preproghreliny

W celu uniknięcia amplifikacji genomowego DNA startery dla ppGHREL zaprojektowano tak, aby hybrydowały z matrycą w dwóch różnych eksonach (Ryc.4). Ponadto wzięto pod uwagę możliwość powstania struktur drugorzędowych takich jak dimery czy „spinki do włosów”, które mogłyby niekorzystnie wpłynąć na przebieg reakcji PCR.

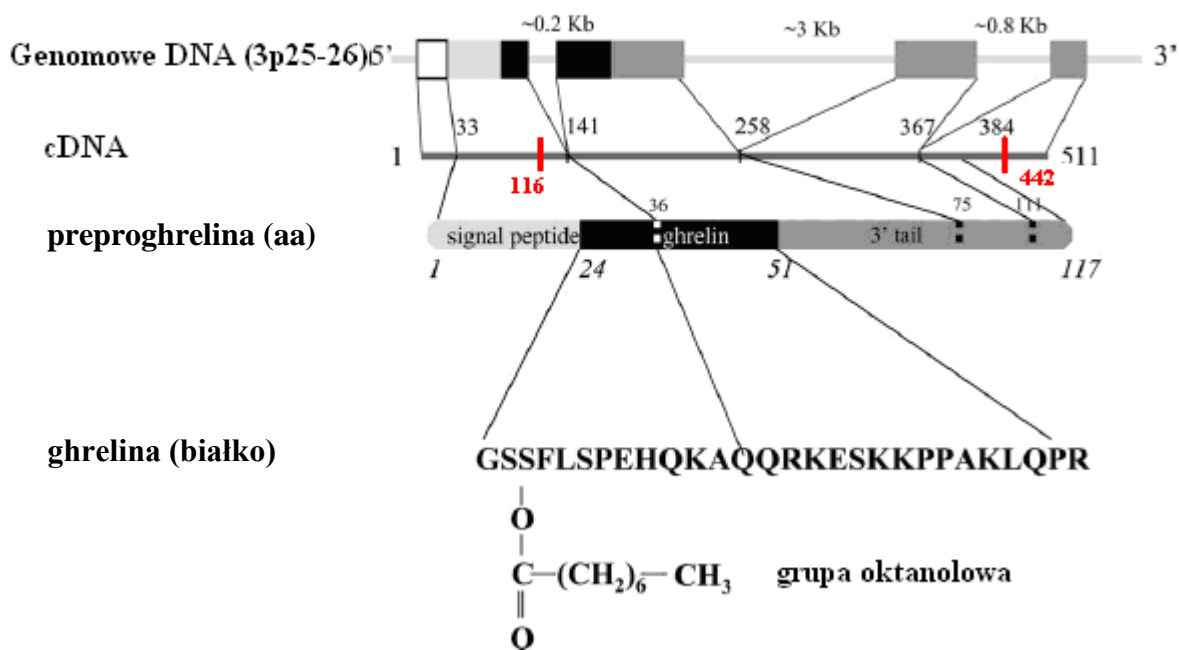
Oba startery ppGHREL zostały zaprojektowane z wykorzystaniem sekwencji nukleotydów mRNA dla ludzkiej preproghreliny (Ryc.5) z GenBank (AB029434), dostępnej na stronach bazy NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed). Startery te projektowano przy użyciu wersji demonstracyjnej programu internetowego Primer 3.0 dostępnego na stronie www.frodo.wi.mit.edu. Specyficzność zaprojektowanej pary starterów sprawdzano wyszukując sekwencje komplementarne przy pomocy programu BLASTN (nucleotide-nucleotide BLAST), zawężając przeszukiwany obszar do ludzkiego genomu. Dla opisywanych par starterów znaleziono 100% homologię wyłącznie w obrębie sekwencji kodujących spodziewany produkt. Startery zostały zsyntetyzowane w laboratoriach Invotrogen Italy. Zamówione zostały drogą mailową przy użyciu serwisu: Invitrogen Custom Primer Email Ordering Template (euoprim@invitrogen.com).

Tab.3 Startery wykorzystane w reakcjach PCR.

Starter	orientacja	sekwencja	długość	Produkt PCR
GHREL	sensowna	5'TGAGCCCTGAACACCAGAGAG3'	21pz	326pz
GHREL	antysensowna	5'AAAGCCAGATGAGCGCTTCTA3'	21pz	



Ryc.4 Kompletna sekwencja kodująca mRNA ppGHREL człowieka. Kolorem zaznaczone są startery skonstruowane tak, aby znalazły się na dwóch różnych eksonach (na różowo starter o orientacji sensownej, kolorem pomarańczowym wyróżniono starter o orientacji antysensownej).



Ryc.5 Struktura ppGHREL i białka GHREL człowieka. Gen ppGHREL składa się z 4 eksonów rozdzielonych trzema intronami, kodując u ludzi cDNA o długości 511 pz. Na czerwono oznaczono orientacyjne miejsca doczepienia się starterów amplifikujących produkt mRNA o długości 326pz. W aminokwasowym łańcuchu preproghreliny (117aa) na N-końcu znajduje się peptyd sygnałowy. Na C-końcu łańcucha aminokwasowego znajduje się ogon, usuwany przez enzymy proteolityczne. Dojrzały peptyd GHREL zbudowany z 28 aminokwasów, acylowany jest przy trzeciej serynie (na podstawie Korbonits i wsp., 2004b).

4.2.2.2. Badanie ekspresji preproghreliny w izolowanych wyspach Langerhansa trzustki

4.2.2.2.1. Izolacja mRNA z wysp Langerhansa trzustki człowieka

RNA z wysp Langerhansa trzustek dawców izolowano według protokołu dołączonego przez producenta (Invitrogen Life Technologies) do TRIzol LS reagent (nr katalogowy 15596-026) z optymalizacjami dotyczącymi głównie objętości poszczególnych odczynników, temperatury wirowań oraz czasów inkubacji. Środowiskiem, w którym prowadzono izolację, była komora laminarna uprzednio w tym celu przygotowana aby zmniejszyć ryzyko kontaminacji. Jej powierzchnię roboczą traktowano etanolem i odczynnikiem RNA-zap (firmy Ambion), a następnie poddano działaniu promieni ultrafioletowych (UV) przez okres 20 minut. Przed przystąpieniem do izolacji należało usunąć RNAlater w którym przechowywane były pobrane wyspy. W tym celu próbki trzykrotnie płukano w wodzie (trzykrotne wirowanie przy 5000 x g przez 5 min. w wirówce firmy Sigma). W trakcie całej procedury izolacyjnej używano wody wolnej od nukleaz (firmy Eppendorf). We wspomnianej metodzie wykorzystywany jest TRIzol LS Reagent (Total RNA Isolation Reagent for Liquid Samples, firmy GibcoBRL, nr katalogowy 10296). Wyspy homogenizowano za pomocą odczynnika TRIzol LS (0,75 ml TRIzol-u na 50-100 g tkanki) w homogenizatorze TISSUMIZER firmy Tekmar. Homogenat inkubowano przez 5 min. w temperaturze 20-30 °C, by pozwolić zdysocjować kompleksom nukleoproteinowym. W kolejnym etapie dodano 0,2 ml chloroformu (firmy Sigma) na każde 0,75 ml mieszaniny TRIzol-u, a następnie niezwłocznie i energicznie wytrząsano przez 15 sek., po czym inkubowano w temperaturze 15-30°C przez okres 15 min. Po inkubacji próbki wirowano różnicowo z maksymalnym przeciążeniem 12000 x g przez 15 min. w temperaturze 4°C. W trakcie wirowania dochodzi do rozdziału preparatu na trzy fazy: najniższą, czerwoną (fenolowo-chloroformową), interfazę i powierzchniową, bezbarwną fazę wodną zawierającą RNA. Faza wodna powinna stanowić w przybliżeniu 70% objętości TRIzol LS Reagent, użytego przy homogenizacji. Interfaza zawiera składniki organiczne takie jak: konserw. DNA czy białka i może zostać zatrzymana do ich późniejszej izolacji. Fazę wodną ostrożnie zbierano pipetą i przenoszono do probówek docelowych. W celu wytrącenia RNA dodawano 0,5 ml izopropanolu (firmy Sigma) na każde 0,75 ml TRIzol-u, ostrożnie mieszano i inkubowano w temperaturze 15 -30°C przez okres 10 min. Próbki poddano kolejnemu wirowaniu przy 12000 x g przez 13 min. w temperaturze 4°C. W wyniku wirowania otrzymano przezroczysto-biały osad RNA o konsystencji żelu oraz supernatant, który usunięto bardzo ostrożnie. Następnie RNA przemyto w 75% etanolu (w stosunku 1ml 75% etanolu na 0,75

ml TRIzol-u) wytrząsając (worteksując) tak, by osad oderwał się od dna probówki. Przeprowadzono ostatnie wirowanie (7500 x g, 10 min., 2-8°C), po czym wylano etanol i suszono osad przez max. 10 min. Istotne jest, by nie dopuścić do przesuszenia osadu. Tak izolowany materiał rozpuszczono w wodzie wolnej od nukleaz (używając w tym celu 40-100 µl w zależności od ilości RNA). Dla dobrego rozpuszczenia osadu uzyskany materiał inkubowano w temperaturze 57°C w termomikserze firmy Eppendorf. Po zakończeniu izolacji RNA, 15% materiału pobrano dla przeprowadzenia reakcji kontrolnych mających na celu ocenę jakości oraz ilości wyizolowanego materiału, a pozostałą część (85%) użyto w celach doświadczalnych lub zamrożono w -80°C celem konserwacji.

PROTOKÓŁ IZOLACJI RNA

1. Płukanie w wodzie (w celu pozbycia się *RNAlatera*) x 3.
2. Dodanie 750 µl TRIzol LS Reagent.
3. Homogenizacja.
4. Pozostawienie na 5 min. w TRIzol LS Reagent.
5. Dodanie chloroformu (0,2 ml chloroformu na każde 0,75 ml mieszaniny TRIzol-u).
6. Inkubacja (15 min.).
7. Wirowanie (15 min. przy 12000 RCF).
8. Przeniesienie fazy wodnej do nowych probówek.
9. Dodanie izopropanolu (0,5 ml izopropanolu na każde 0,75 ml TRIzol-u).
10. Inkubacja (10 min.).
11. Wirowanie (13 min. 12000 RCF).
12. Złanie supernatantu.
13. Dodanie 75% etanolu (1ml 75% etanolu na 0,75 ml TRIzol-u).
14. Wirowanie (10 min. przy 7500 RCF).
15. Złanie etanolu.
16. Suszenie (max. 10 min.).
17. Umieszczenie w termomikserze (10 min. w temperaturze 55-57 °C).
18. Kontrola jakościowo-ilościowa. Pomiar stężenia RNA w spektrofotometrze.

4.2.2.2. Kontrola ilościowa oraz jakościowa wyizolowanego RNA wysp Langerhansa

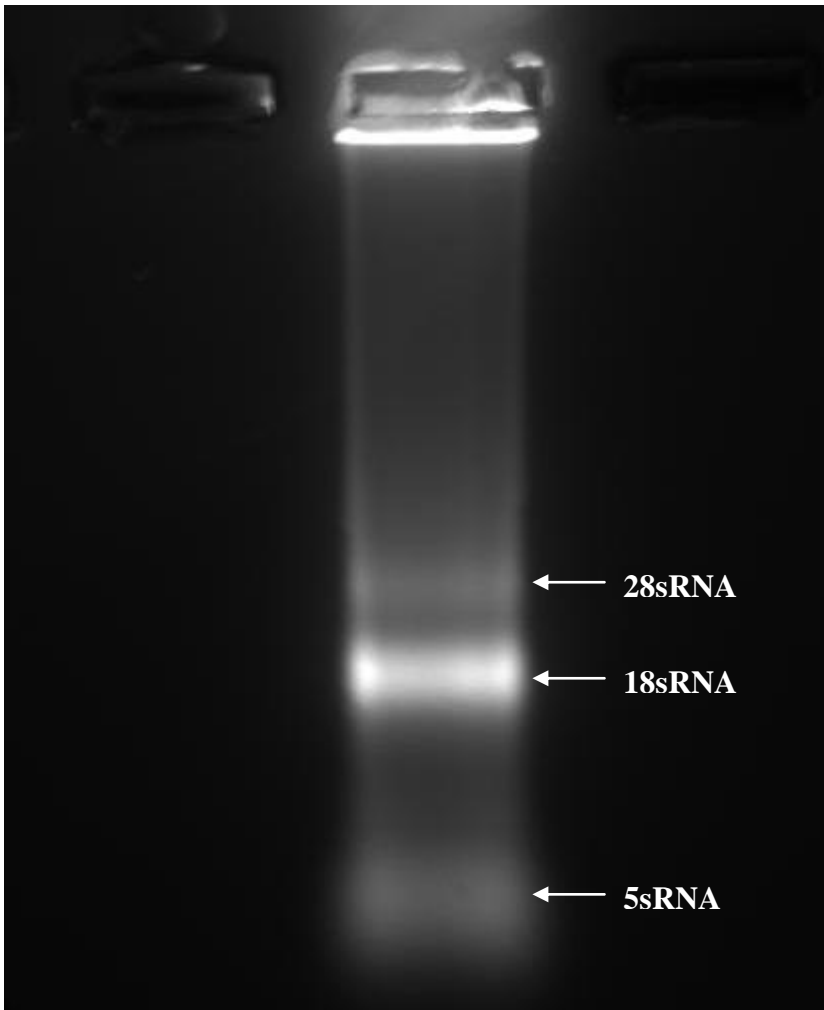
Każdorazowa izolacja RNA wymaga przeprowadzenia kontroli zanieczyszczenia produktu izolacji: białkami, rozpuszczalnikami organicznymi lub genomowym DNA. Słabej jakości RNA będzie skutkowało problemami podczas odwrotnej transkrypcji i może niekorzystnie wpływać na

jakość otrzymywanych wyników. Kontrole taką przeprowadza się dwójako: rozdzielając elektroforetycznie uzyskane RNA, oraz sprawdzając spektrofotometrycznie stężenie RNA.

4.2.2.2.1. Rozdział elektroforetyczny RNA

Rozdział elektroforetyczny RNA informuje w głównej mierze o zanieczyszczeniu próby genomowym DNA oraz o degradacji produktu ekstrakcji (RNA) – służy więc do oceny jakościowej produktu.

Rozdział elektroforetyczny fragmentów RNA prowadzono w specjalnym 1% żelu agarozowym, przygotowanym według protokołu Fourney'a z modyfikacjami Alosiego. Do 10 ml 10x MOPS, zmieszanego z 85 ml autoklawowanej wody DEPC dodano 1 g agarozy. Mieszaninę znajdującą się w sterylnym naczyniu (RNase-free) poddano gotowaniu w kuchence mikrofalowej a następnie schłodzono do około 50 °C. Następnie, pod wyciągiem, dodano 5ml 37% formaldehydu oraz 0,7 µl bromku etydyny, zmieszano i wylano na sterylną (Rnase-free) formę, do ostygnięcia (minimum 1 h przed nałożeniem próbek). Próba 10 µg RNA została zdenaturowana w 70°C przez 10 min. w obecności buforu obciążającego RNA zapobiegającego renaturacji (RNA Sample Loading Buffer – Sigma Aldrich) w ilości 1 µl buforu na każde 5 µl próby RNA. Po denaturacji dodatkowo do każdej próby dodano 2 µl bromku etydyny o stężeniu 10 mg/ml (Promega Corp., Madison, WI, USA). Następnie próby nałożono na przygotowany wcześniej żel agarozowy 1% zdenaturowany w obecności formaldehydu i buforu MOPS. Analizę żelu przeprowadzono przy użyciu aparatu Gel Logic 100 Imaging System (Estman Kodak Company, New Haven, CT, USA). Izolacja RNA z ludzkich wysp Langerhansa trzustki powiodła się. Otrzymano dobrej jakości RNA, frakcje wyizolowanego materiału zawierają 28sRNA, 18sRNA oraz 5sRNA (Ryc.6).



Ryc.6 Rozdział elektroforetyczny RNA wyizolowanego z wysp Langerhansa trzustki. Wykazano frakcje 28s, 18s i 5s RNA.

4.2.2.2.2. Pomiar stężenia RNA

W celu oceny ilościowej i jakościowej RNA (stężenie $\mu\text{g/ml}$, zanieczyszczenia) użyto spektrofotometru (Biophotometr firmy Eppendorf). Jako próby zerowej użyto wody wolnej od nukleaz. Pomiar prowadzono trzykrotnie dla każdej z prób w jednorazowych, plastikowych kuwetach (firmy Eppendorf). Przy długości fali 230 nm widoczna jest kontaminacja rozpuszczalnikami (fonolem, etanolem), TRIZol-em i pozostałymi odczynnikami użytymi do izolacji RNA, dlatego właściwy stosunek odczytów przy długościach fali 260/230 powinien wynosić od 1,7-2,0 (optymalnie 1,8). Kwasy nukleinowe (RNA i DNA), widoczne są tylko przy długości fali 260 nm, natomiast białka przy długości 280 nm. Stosunek absorpcji A_{260} do A_{280}

świadczy o zanieczyszczeniu RNA białkami a jego optymalna wartość, podobnie jak w przypadku stosunku absorpcji A_{260} do A_{230} , powinna mieścić się w zakresie 1,8-2,0 (Słomski, 2004). Do analizy wykorzystywano tylko próby, dla których stosunek wartości absorpcji A_{260}/A_{280} wynosił powyżej 1,7. Dla każdej próby RNA dokonywano trzykrotnego pomiaru. Po zakończeniu oceny, próby zamrażano w temperaturze -80°C .

W wyniku pomiaru stężenia RNA w spektrofotometrze stwierdzono, że końcowe stężenie produktu wyniosło 2145ng/ul. Dodatkowo analizy spektrofotometryczne prowadzone przy różnych długościach fali dowodzą, że wyizolowany materiał nie jest zanieczyszczony. Stosunek A_{260} do A_{230} wyniósł 1,75, co świadczyć może o braku kontaminacji próby rozpuszczalnikami organicznymi, natomiast stosunek A_{260} do A_{230} wyniósł 1,81, co dowodzi braku obecności białek w wyizolowanym materiale. Po zakończeniu izolacji RNA zamrożono w -80°C .

4.2.2.2.3. Trawienie RNA DNAzą

Uzyskane preparaty RNA dodatkowo trawiono DNAzą w celu usunięcia genomowego DNA. W tym celu użyto zestawu *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega, CA, USA). Do sterylnej probówki napipetowano 3 μl buforu RQ1 RNase-Free DNase (10x) oraz 3 μl DNAzy RQ1 RNase-Free DNase (stężenie 1 U/ μl). Następnie dodano 3 μg rozpuszczonego w wodzie RNA i całość uzupełniono wodą do 30 μl . Każdą próbę inkubowano przez 45 min. w 37°C . Następnie podniesiono temperaturę do 65°C oraz dodano 3 μl RQ1 DNase Stop Solution i inkubowano przez 10 min. przeprowadzając tym samym inaktywację DNAzy. Trawienie przeprowadzono opierając się na załączonym do zestawu protokole.

4.2.2.2.4. Reakcja odwrotnej transkrypcji RT – synteza cDNA

Reakcja ta jest prowadzona w celu uzyskania cDNA potrzebnego do reakcji PCR. Reakcja została przeprowadzona dwustopniowo przy pomocy zestawu ImProm II Reverse Transcription System (firmy Promega, CA, USA) w probówkach firmy eppendorf o objętości 200 μl . W skład zestawu wchodzi odwrotna transkryptaza ImProm II, dwa rodzaje starterów (startery oligo(dT)₁₅ syntetyzujące cDNA od końca 3' – hybrydują z końcami poliadenylowymi mRNA, oraz 6-nukleotydomowe startery losowe, które wiążą się z RNA na całej jego długości niespecyficznie), bufor reakcyjny dla ImProm II, dNTP (10 mM) – substraty reakcji, MgCl₂ (10 mM) – zwiększające

dokładność reakcji, RNasin (40 U/ μ l) – inhibitor nukleaz oraz woda wolna od nukleaz. Teoretycznie użycie obu rodzajów starterów nie jest wymagane, jednak podnosi ono specyficzność reakcji. W trakcie procedury posługiwano się załączonym do zestawu protokołem. Tabela nr 4 zawiera komponenty pierwszego etapu reakcji.

Tab.4 Komponenty pierwszego etapu reakcji odwrotnej transkrypcji.

składniki	stężenie
RNA	2 μ g
startery random heksamers	1 μ l (0,5 μ g/ml)
startery oligo(dT) ₁₅	1 μ l (0,5 μ g/ml)
woda wolna od nukleaz	do całkowitej objętości 5 μ l

Składniki pierwszego etapu reakcji odwrotnej transkrypcji (Tab.4) zostały wymieszane i odwirowane, następnie poddane denaturacji w temperaturze 65°C przez okres 5 min. i umieszczone na lodzie (1min.). W drugim etapie reakcji dodano pozostałe składniki niezbędne do syntezy DNA, które ujęte zostały w tabeli nr 5.

Tab.5 Komponenty drugiego etapu reakcji odwrotnej transkrypcji.

składniki	stężenie
5x bufor ImProm II	1 x
MgCl ₂ 25 mM	5 mM
nukleotydy (dNTP mixture) 10 mM	0,5 mM każdy nukleotyd
inhibitor rybonukleaz RNasin 40 U/ μ l	20 U
odwrotna transkryptaza ImProm II	1 μ l *
woda wolna od nukleaz	do końcowej objętości 15 μ l

* producent nie podał stężenia odwrotnej transkryptazy

Po dodaniu i dokładnym zmieszaniu składników drugiego etapu reakcji RT całkowita objętość mieszaniny w probówkach wynosiła 20 μ l. Następnie mieszaninę tę inkubowano trzykrotnie przy użyciu termocyklera (firmy Eppendorf) w następujących warunkach:

1. 5 min. w temperaturze 25°C (przyłączanie starterów)
2. 42 min. w temperaturze 60°C (umożliwia syntezę cDNA)
3. 15 min. w temperaturze 70°C (inaktywacja odwrotnej transkryptazy)

Po zakończeniu inkubacji próby schłodzono do temperatury 4°C a następnie zamrożono w temperaturze -20°C. Równocześnie wykonano dwie reakcje kontrolne wśród losowo wybranych prób:

- Kontrola RT+ (w opisanej powyżej procedurze zamiast RNA dodano wodę)
- Kontrola RT- (odwrotną transkryptazę zastąpiono wodą)

Pierwsza reakcja kontrolna służy monitorowaniu czystości odczynników, drugą wykonuje się w celu wykrycia zanieczyszczenia próby genomowym DNA, oraz dla sprawdzenia czy użyte w reakcji PCR startery zostały poprawnie zaprojektowane.

4.2.2.2.5. Reakcja łańcuchowa polimerazy PCR

W niniejszej pracy wykorzystano metodę ilościowej reakcji PCR. Metodę tę użyto w celu prześledzenia ekspresji ppGHREL w wyspach Langerhansa trzustki izolowanych od pacjentów. Do reakcji wprowadza się matrycowy DNA, trifosforany deoksyrybonukleozydów, startery (primery) oraz termostabilną polimerazę DNA (może nią być na przykład polimeraza *Taq* wyizolowana z bakterii *Thermus aquaticus* lub polimeraza *Pfu* z archeowców *Pyrococcus furiosus*. W wyższej temperaturze (zwykle około 95°C) pękają wiązania wodorowe i podwójna helisa DNA rozdziela się na dwa pojedyncze łańcuchy. W temperaturze niższej, ściśle określonej dla danej pary starterów (pomiędzy 45-60°C), startery przyłączają się do matrycy. Podwyższenie temperatury do około 72°C powoduje utworzenie się na matrycy, z przyłączonymi do niej starterami, kompleksu z polimerazą DNA, wskutek czego rozpoczyna się synteza nici komplementarnej do matrycy. W tabeli nr 6 przedstawiono skład mieszaniny reakcyjnej. Natomiast w tabeli nr 7 zestawiono kolejne etapy i parametry przeprowadzonej reakcji PCR.

Tab.6 Skład mieszaniny reakcyjnej.

Składniki	Stężenie na jedną reakcję
Bufor dla polimerazy 10 x	1 x
MgCl ₂ 25 mM	1,2 - 2 mM *
dNTPs 10 mM	0,25mM każdy nukleotyd
starter sensowny	30 – 50 pmoli *
starter antysensowny	30 – 50 pmoli *
polimeraza <i>Taq</i> 5 U/μl	1 U

matryca (cDNA)	około 200 ng (2 – 5 μ l) **
Woda wolna od nukleaz	do końcowej objętości 25 μ l

* stężenie w zależności od badanego genu

** w zależności od ilości RNA użytego w reakcji odwrotnej transkrypcji

Tab.7 Etapy i parametry reakcji PCR.

Etap reakcji PCR	GHREL	GHSR-1a	GHSR-1b
wstępna denaturacja	94°C – 2.30 min.	94°C – 2.30 min.	94°C – 2.30 min.
denaturacja	94°C – 45 sek.	94°C – 45 sek.	94°C – 45 sek.
przyłączanie starterów	50°C – 45 sek.	57°C – 45 sek.	57°C – 45 sek.
wydłużanie	72°C – 1.30 min.	72°C – 1 min.	72°C – 1 min.
końcowe wydłużanie	72°C – 10 min.	72°C – 11 min.	72°C – 1 min.
liczba cykli	35	35	35

4.2.2.2.6. Elektroforeza produktów reakcji PCR w żelu agarozowym

Rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA prowadzono w 2% żelu agarozowym, w buforze 1 x TAE, pod napięciem 2-5 V/cm². Do lekko ostudzonych żeli dodawano bromek etydyny, do końcowego stężenia 1 μ g/ml, celem uniknięcia parowania bromku etydyny, który jest związkiem bardzo toksycznym. Fragmenty DNA uwidaczniiano w świetle UV, o długości fali 260nm.

4.2.3. Histologia

4.2.3.1. Ocena prawidłowości rozwojowych płodów

Ponieważ materiał na którym prowadzone były badania pochodził ze spontanicznych aborcji, ważna była ocena prawidłowości rozwojowych włączonych w badania płodów oraz

dokładne oszacowanie wieku. Wiek płodu można wstępnie oszacować według wzoru: wiek (tygodnie) = CRL (cm) + 6,5 lub według tabel za Doublet (Doublet i wsp., 1997). Płody większe niż 200mm CRL, czyli od około 24-26. tygodnia rozwoju są już na tyle duże, że mogą być badane w ten sam sposób jak noworodki. Zarodki i płody pomiędzy 30-200 mm CRL (8-24. tydzień rozwoju) wymagają szczególnej uwagi przy ich ocenie. Współczynnik CRL ściśle koreluje z długością stopy płodów – dlatego często dokonuje się obu pomiarów jednocześnie (lub zamiennie, jeśli określenie CRL jest utrudnione lub nie jest możliwe). Bardzo ważna jest także ocena cech zewnętrznych płodu, takich jak: obecność linii papilarnych palców (10. tydzień), oddzielone powieki (25-28. tydzień), wygląd twarzy. Zweryfikowanie prawidłowości rozwojowych narządów wewnętrznych jest również bardzo wskazane.

4.2.3.2. Utrwalenie materiału i przygotowanie skrawków histologicznych

Powodzenie reakcji IHC zależy w pierwszej kolejności od właściwego przygotowania materiału. Musi on być pobrany w taki sposób, by została zachowana antygenowość tkanki, przy jednoczesnym nienaruszeniu jej struktury histologicznej (Zabel 1999, str. 13-29). Najogólniej więc celem utrwalenia i przygotowania tkanek do badań IHC jest zapobieganie autolizie i gniciu tkanek, niedopuszczenie do wypłukania lub przemieszczenia antygeny oraz zachowanie jego właściwości wiązania przeciwciał przy możliwie dobrym utrzymaniu ogólnej struktury tkanki. Utrwalanie zwiększa również odporność elementów komórkowych na obróbkę tkanki. Najbardziej rozpowszechnionym i stosowanym już od ponad 100 lat odczynnikiem utrwalającym jest formalina (40% roztwór formaldehydu w wodzie stosowany w rozcieńczeniu 1:9). Formalina zachowuje morfologię tkanek oraz większość epitopów wykrywanych w reakcjach IHC czy IMF, wpływa jednak niekorzystnie na strukturę kwasów nukleinowych. Podczas utrwalania może także dochodzić do zmian autolitycznych głębiej położonych tkanek, spowodowanych powolnością dyfuzji formaliny szczególnie w przypadku dużych wycinków (Werner i wsp., 2000). Dlatego cenny materiał histologiczny najczęściej utrwalą się w płynie Bouina, który doskonale nadaje się do tkanek miękkich i delikatnych (takich jak embriony i płody), a następnie zatapia w parafinie (środowisku hydrofobowym), które zapewnia bardzo dobre warunki utrwalające. Dzięki temu możliwe jest pocięcie tkanki na poszczególne skrawki za pomocą mikrotomu, co w efekcie daje powierzchnię tkanki, z doskonale zachowaną strukturą, która po deparafinizacji gotowa jest do oznaczeń, a końcowo szczegółowych analiz histochemicznych.

Do odwadniania tkanek użyto alkoholi, gdyż wykazują one duże powinowactwo do wody. W tym celu stosowano szereg alkoholu etylowego o wzrastającym stężeniu. Materiały utrwalone w płynie Bouina inkubowano kolejno w :

Alkohol etylowy 50% + węglan wapnia	24 h
Alkohol etylowy 70% + węglan	24 h
Alkohol etylowy 85%	24 h
Alkohol etylowy 96%	24 h
Alkohol absolutny	24 h
Alkohol absolutny	24 h
Alkohol absolutny + benzen	3 h
Benzen I	20 min.
Benzen II	20 min.
Benzen III	20 min.
Parafina trudnotopliwa	

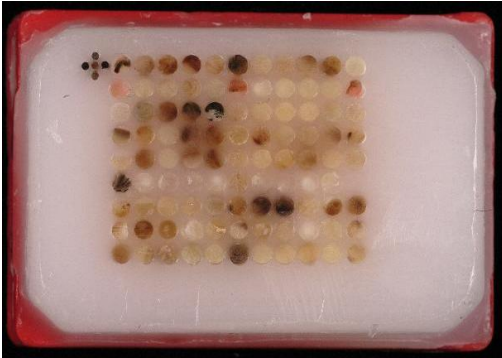
Benzen wypiera alkohol i jest jednocześnie rozpuszczalnikiem parafiny.

Odwodnione w ten sposób próby umieszczano w specjalnych formach i zalewano ciepłą, płynną parafiną, która po ostygnięciu zastygała w formie kostki (bloczek parafinowy). Bloczki parafinowe krojono przy użyciu mikrotomu firmy Microm HM 340E na 4-6µm skrawki histologiczne i umieszczano na mikroskopowych szkiełkach podstawowych sodowo-wapniowych Super Frost® Plus (Menzel-Glaser, Roth) o wymiarach 25×75×1.0 mm. Szkiełka te utrzymują skrawki siłami elektrostatycznymi, co zapobiega ich spadaniu lub odklejaniu się w czasie procedury IHC. Skrojone na mikrotomie skrawki umieszczano w łaźni wodnej (temp. 37-38°C) celem ich rozprostowania. Po około 2 min. swobodnego pływania, skrawki wyławiano na szkiełka i pozostawiano na noc do wyschnięcia.

4.2.3.3. Przygotowanie macierzy tkankowej (TMA)

TMA to bloczki parafinowe zawierające nawet do kilkuset wycinków różnych tkanek zebranych w jednym bloczku (Ryc.7). Zaletą tak przygotowanych preparatów parafinowych jest możliwość równoczesnego oznaczenia histochemicznego tkanek pochodzących od wielu pacjentów, oszczędność nakładanych odczynników i istotnie skrócony czas oznaczeń. Wykluczony

zostaje w ten sposób błąd metodyki związany z potencjalnymi różnicami, które mogą się pojawić podczas barwień wykonywanych w różnym czasie. Metoda przygotowania TMA była po raz pierwszy opisana w 1987 roku przez Wan, Fortunę i Furmańskiego (Wan i wsp., 1987).



Ryc.7 TMA przygotowany dla blisko 100 różnych tkanek, umieszczonych w jednym bloczku parafinowym (źródło: Wikipedia, www.wikipedia.org [data dostępu 09.01.2013]).

Przygotowanie TMA jest czynnością bardzo precyzyjną i wymaga wcześniejszej, niezwykle dokładnej analizy poszczególnych tkanek. Każdą tkankę bada się osobno, poddając ją barwieniu hematoksyliną, mającego na celu uwidocznienie struktury tkanki, zorientowanie się w jej topologii oraz wybranie reprezentatywnego do dalszych oznaczeń regionu. Następnie wybrany fragment tkanki wycięty zostaje z bloczka parafinowego i zatopiony ponownie w nowym bloczku, obok pozostałych, w ten sam sposób dobranych fragmentów tkanek. Powstający w ten sposób TMA musi być szczegółowo opisany. Każdorazowo tworzy się mapę dla ułożonych w jednym bloczku tkanek, której ogromną zaletą jest obiektywna analiza otrzymanych wyników barwień.

Analizowany w rozprawie materiał pochodził od 33. płodów, z których analizie poddanych zostało 24. Rozmieszczone były na dwóch szkiełkach: ASS 231 na którym znajdowało się 17 tkanek i ASS 232 na którym znajdowało się 7 tkanek płodowych znajdujących się na różnym etapie rozwoju. Regiony trzustki były reprezentatywne pod względem wielkości.

4.2.3.4. Immunohistochemia

4.2.3.4.1. Przygotowania wstępne

4.2.3.4.1.1. Deparafinizacja i uwodnienie tkanek

Zatopienie tkanek w środowisku hydrofobowym w parafinie powoduje, że prezentowane w tkance antygeny mogą być niedostępne dla immunoglobulin. Warunkiem powodzenia reakcji IHC jest całkowite lub częściowe usunięcie z tkanek środowiska, w którym zostały zatopione. Skrawki po ścięciu poddaje się procesowi deparafinizacji termicznej. Szkiełka umieszcza się w cieplarni na 40 min. w temp. 60° C celem usunięcia parafiny z okolic preparatu jak i z samego skrawka. Następnie skrawki umieszcza się na 30 min. w ksylenie, który, jako rozpuszczalnik organiczny, usuwa pozostałą parafinę z preparatów.

Po mechanicznej oraz chemicznej deparafinizacji, preparaty uwadnia się poprzez przeprowadzenie tkanek przez szereg alkoholi (alkohol etylowy) o malejących stężeniach 100%, 95%, 80%, 70% aż do wody destylowanej (w podanej kolejności). Skrawki umieszcza się na 2 min. pod bieżącą wodą w celu ostatecznego ich uwodnienia.

4.2.3.4.1.2. Blokowanie endogennej aktywności enzymatycznej

Istotną przyczyną powstania tak zwanego „tła” podczas barwień IHC, czyli wybarwiania się struktur nie zawierających poszukiwanego antygeny – jest obecność w badanej tkance endogennego enzymu o takiej samej aktywności, jaką ma enzym nakładany na przeciwciało drugorzędowe (np. peroksydaza chrzanowa lub fosfataza zasadowa), a którego zadaniem jest utlenienie używanego w IHC chromogenu do barwnego produktu. Aby zapobiec artefaktom należy zablokować ich aktywność (Zabel 1999, str. 62-63). Aktywność endogennej peroksydazy blokowano poprzez 10 min. inkubację skrawków z wodnym 3% roztworem H₂O₂.

4.2.3.4.1.3. Blokowanie miejsc niespecyficznie wiążących antygeny

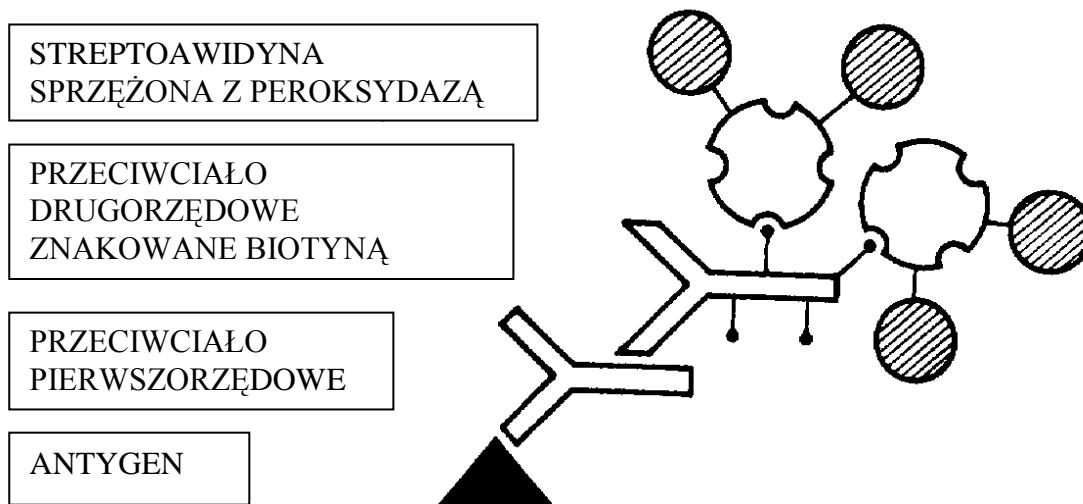
Komercyjnie dostępne przeciwciała pierwszorzędowe (w szczególności przeciwciała poliklonalne) mogą także w sposób niespecyficzny wiązać się z prezentowanymi w tkance antygenami. W wyniku reakcji IHC mogłyby się one uwidocznić na równi z poszukiwanym antygenem, fałszując wynik. W celu uniknięcia niespecyficzności stosuje się blokowanie surowicami, polegające na kilkunastominutowej inkubacji materiału tuż przed nałożeniem przeciwciał pierwszorzędowych z białkiem pochodzącym od innego gatunku zwierzęcia niż to, od którego uzyskano swoiste przeciwciała. Blokowanie miejsc niespecyficznie wiążących antygeny przeprowadzano poprzez inkubację tkanek z 3% BSA, lub mieszaniną surowic: bydlęcej i koziej w stężeniach 3% i 10%, lub opcjonalnie z BSA mix (skład podany w rozdziale 4.1.5.). Nie zaobserwowano negatywnego wpływu takich preinkubacji na zdolność łączenia się specyficznego przeciwciała pierwszorzędowego z poszukiwanym antygenem w badanych tkankach.

4.2.3.4.2. Immunohistochemiczna metoda barwienia tkanek LSAB (Labeled StreptAvidin Biotin) – barwienie pojedyncze

Najpopularniejszą metodą barwienia IHC jest standardowa metoda ABC, która najogólniej opiera się na wykorzystaniu specyficznego powinowactwa awidyny do biotyny (Ryc.8). Poniższy opis procedury IHC (LSAB) jest modyfikacją metody ABC gdzie awidynę zastąpiono streptoawidyną, mającą czterokrotnie większe powinowactwo do biotyny, wiążąc ją niekowalencyjnie. Streptoawidyna w odróżnieniu do awidyny nie łączy się niespecyficznie siłami elektrostatycznymi z ujemnie naładowanymi składnikami tkanek np. błoną komórkową (jej punkt izoelektryczny jest bliski obojętnemu, i wynosi 7 pH, w odróżnieniu do awidyny której punkt izoelektryczny wynosi 10 pH). Dodatkowo, streptoawidyna nie zawiera grup węglowodanowych, które obecne w awidynie mogą wpływać na wiązanie z niektórymi białkami tkanek, powodując zwiększenie ryzyka niespecyficznych wiązań. Wszystko to sprawia, że metoda LSAB jest blisko 10 razy czulsza w porównaniu ze standardową metodą barwienia immunohistochemicznego ABC.

Wykorzystano zestaw firmy Biogenex w którego skład wchodziły: biotynylowany kompleks przeciwciał drugorzędowych rozpoznający przeciwciała myszy, królika, i świnki morskiej oraz enzym HRP związany ze streptoawidyną. Reakcję IHC wizualizowano za pomocą 3,3'-diaminobenzydyny jako chromogenu dającego brązową reakcję barwną. Wszystkie preparaty

podbarwiano hematoksyliną. Dokładny opis i dane dotyczące pochodzenia odczynników znajdują się w podrozdziale 4.1.4.



Ryc.8 Schemat wykrywania antygeny za pomocą kompleksu streptoawidyna-peroksydazy (źródło: Zabel 1999, str. 142).

Zatopione w parafinie tkanki ścinano na skrawki o grubości 4-6 μm , nakładano na szkiełka podstawkowe pokryte poli-L-lizyną i suszono w temperaturze pokojowej przez 12h. Szkiełka z preparatami zostały następnie poddane deparafinizacji termicznej w 60°C , celem usunięcia nadmiaru parafiny z okolic tkanki jak i samego preparatu. Tak przygotowany materiał zdeparafinizowano 30 minutową inkubacją w ksylenie a następnie uwodniono w szeregu malejących stężeń alkoholi, do wody. Domeny antygenowe GHREL, glukagonu, SST, PP oraz SYP zostały udostępnione poprzez gotowanie tkanek w 0,01 mol/l buforze cytrynianowym o kwaśnym pH (pH 6.0) w cyklach 3 x 5 min. w kuchence mikrofalowej. Domeny antygenowe pozostałych białek: czynniki transkrypcyjne (Pax6, Nkx2-2, Nkx6-1, Isl1) oraz insulina, wymagały 30 min. gotowania w buforze TRIS-EDTA o pH zasadowym (pH 9.0). Skrawki, po ostudzeniu w temperaturze pokojowej, przemyto buforem fosforanowym (PBS pH 7.4) i poddano dwójakiemu blokowaniu. Najpierw blokowano endogenną aktywność peroksydazy poprzez inkubację z 3% H_2O_2 , przez 10 min. Następnie blokowano miejsca niespecyficznych wiązań surowicą obcogatunkową (10% BSA) przez kolejne 10 min. Tak przygotowane skrawki poddano godzinnej inkubacji ze specyficznym przeciwciałem pierwszorzędowym (Tab.1,Rozdz.4.1.3.). Następnie stosowano kolejno: 30 min. inkubację z przeciwciałem drugorzędowym skoniugowanym z biotyną, oraz 30 min. inkubację ze

streptoawidyną skoniugowaną z peroksydazą chrzanową. Po dokładnym odplukaniu odczynników na skrawki nałożono DAB dający, w wyniku reakcji enzymatycznej z peroksydazą, przy udziale H₂O₂, barwny produkt nierozpuszczalny w wodzie, oraz rozpuszczalnikach organicznych. Końcowo, preparaty podbarwiono hematoksyliną celem uwidocznienia struktury barwionej tkanki. Ostatecznie, skrawki odwodniono w szeregu wzrastających stężeń alkoholi, do ksylenu. Po naklejeniu szkiełek nakrywkowych, wybarwione preparaty analizowano w mikroskopie świetlnym.

4.2.3.4.3. Immunohistochemiczna metoda barwienia tkanek LSAB (Labeled StreptAvidin Biotin) – barwienie podwójne

Metoda podwójnego barwienia w IHC rozpoczyna się barwieniem pojedynczym, do momentu nałożenia pierwszego chromogenu DAB. Skrawków nie poddaje się wtedy odwodnieniu w celu utrwalenia, lecz kontynuuje się immunohistochemiczną lokalizację kolejnego białka. Po wybarwieniu pierwszego z dwóch interesujących nas peptydów, skrawki poddawane są ponownie procesowi udostępnienia determinant antygenowych dla drugiego przeciwciała pierwszorzędowego. Preparaty gotowano po raz kolejny w 0,01 mol/l buforze cytrynianowym o kwaśnym pH (pH 6.0) w cyklach 3 x 5 min. w kuchence mikrofalowej, lub w buforze TRIS-EDTA o pH zasadowym (pH 9.0), w zależności od specyfiki nakładanego przeciwciała. Blokowanie wodą utlenioną i surowicami obcogatunkowymi nie było na tym etapie stosowane. Skrawki inkubowane były z drugim, specyficznym przeciwciałem pierwszorzędowym przez godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie nakładano drugorzędowe przeciwciała biotynylowane na 30 min., po czym skrawki inkubowano ze streptoawidyną sprzężoną z fosfatazą alkaliczną, przez kolejne 30 min. Reakcję barwną wywołano przy użyciu zestawu Vector Red Substrate (code: SK-5100, Vector Laboratories, Inc.). Ostatecznie preparaty podbarwiono hematoksyliną celem uwidocznienia struktury barwionej tkanki. Ponieważ chromogen Vector Red wypłukiwany jest przez alkohol, reakcję zakończono na etapie uwodnionej tkanki, omijając etap dehydratacji w szeregu wzrastających stężeń alkoholi do ksylenu. Skrawki zabezpieczono i utrwalono specjalnym klejem odpowiednim dla roztworów wodnych, naklejając na preparaty szkiełka nakrywkowe. Chromogen nałożony w tym typie reakcji jako pierwszy – DAB, wybarwił struktury komórek na brązowo, natomiast Vector Red, na czerwono. Podwójną reakcję IHC analizowano następnie przy użyciu mikroskopu świetlnego.

4.2.3.4.4. Podbarwienie hematoksyliną

Hematoksylina to niebieski barwnik o charakterze zasadowym, otrzymywany z drewna *Haematoxylum campechianum*. Służy do wybarwiania kwasowych cząstek struktur białkowych, np. jąder komórkowych. Utleniona, przekształca się w hemateinę o głęboko niebiesko-purpurowym kolorze. Jest powszechnie używana do barwienia cytologicznego. Wybarwione na niebiesko jądra ułatwiają orientację w topologii narządu.

4.2.3.4.5. Odwodnienie tkanek i procedury kończące

Po przeprowadzeniu reakcji barwnych z chromogenami używanymi w IHC preparaty utrwała się poprzez ich odwodnienie w szeregu alkoholi o wzrastających stężeniach (70% - 80% - 95% - 100%). Następnie szkiełka zanurza się w rozpuszczalniku organicznym jakim jest ksylen i delikatnie nakleja się szkiełko nakrywkowe stosując w tym celu żywicę organiczną. Inaczej postępuje się w sytuacji, kiedy stosowany chromogen rozpuszczalny jest w substancjach organicznych. W takim przypadku rezygnuje się z odwodnienia tkanek w szeregu alkoholi o wzrastających stężeniach i przepłukane w wodzie destylowanej preparaty poddaje się bezpośrednio naklejeniu szkiełek nakrywkowych z użyciem kleju utrwalającego preparaty wilgotne. Ponieważ tak przygotowane preparaty mogą być przechowywane przez wiele lat, bez niebezpieczeństwa utraty barwnego produktu reakcji, ważne jest dokładne opisanie szkiełek z podaniem daty wykonanego barwienia i krótkiego opisu eksperymentu (rodzaj wizualizowanego antygeny oraz stężenie robocze użytego przeciwciała pierwszorzędowego).

4.2.3.4.6. Reakcje kontrolne

Równoległe z immunohistochemiczną lokalizacją danego antygeny przeprowadza się reakcje kontrolne, sprawdzające specyficzność i potwierdzające wiarygodność uzyskanych wyników. Polegają one na dokładnym powtórzeniu procedury IHC z ominięciem nałożenia swoistego przeciwciała pierwszorzędowego. W ten sposób można wykryć nieswoiste wiązanie przeciwciała drugorzędowego oraz pozostałych odczynników używanych kolejno. Oczekiwana reakcja potwierdzająca swoistość wiązania, to brak jakiegokolwiek reakcji barwnej. Zarówno w IHC jak i IMF, znany jest również drugi rodzaj reakcji kontrolnej. Jest to tak zwana reakcja adsorpcyjna.

Polega na uprzedniej inkubacji przeciwciała pierwszorzędowego z wyizolowanym i oczyszczonym antygenem (peptydem), przeciwko któremu przeciwciało jest skierowane. Procedura ta ma na celu wysycenie miejsc wiążących antygeny stosowanych przeciwciał i niedopuszczenie do ich związania z antygenami komórek analizowanego skrawka. Mieszaninę preinkubacyjną (specyficzne przeciwciało pierwszorzędowe i peptyd) inkubuje się z tkanką w której dany antygen jest obecny. Jeśli przeciwciało jest specyficzne tylko dla danego antygeny, to nie powinno się ono przyłączyć do żadnego miejsca w tkance. W takim wypadku reakcja kontrolna objawia się brakiem jakiegokolwiek reakcji barwnej. Natomiast jeśli przeciwciało nie jest w pełni specyficzne, to po dokończeniu całej procedury IHC otrzymamy produkty barwne reakcji, które informują o niespecyficzności użytego przeciwciała pierwszorzędowego.

4.2.3.5. Immunofluorescencja

IMF to metoda wizualizacji kompleksu antygen-przeciwciało z wykorzystaniem znacznika lub znaczników fluorescencyjnych. Wynik reakcji w postaci świecących kompleksów obserwujemy pod mikroskopem fluorescencyjnym. Wyróżnia się:

1. Immunofluorescencję bezpośrednią, w której znakowane fluorochromem przeciwciało pierwszorzędowe, bezpośrednio wiąże się z antygenem
2. Immunofluorescencję pośrednią, gdzie przeciwciało pierwszorzędowe skierowane jest przeciwko antygenowi A, natomiast przeciwciało drugorzędowe, skierowane jest przeciwko przeciwciału pierwszorzędowemu i wyznakowane jest fluorochromem.

Podwójną IMF pośrednią stosuje się w przypadku badania koekspresji dwóch różnych antygenów w tej samej komórce. W metodzie tej stosuje się dwa rodzaje przeciwciał pierwszorzędowych: jedno skierowane przeciwko antygenowi A, drugie natomiast przeciwko antygenowi B. Oba te przeciwciała muszą być wyhodowane na innych gatunkach zwierząt. Następnie przeprowadza się inkubację z przeciwciałami drugorzędowymi z których każde skierowane jest przeciwko odpowiedniemu przeciwciału pierwszorzędowemu i każde jest znakowane innym fluorochromem np. przeciwciało drugorzędowe skierowane przeciwko przeciwciału koziemu jest wyznakowane TRITC i wybarwia kompleks antygen-A-przeciwciało na czerwono. Drugi typ przeciwciała drugorzędowego jest skierowane przeciwko pierwszorzędowemu przeciwciału króliczemu i jest wyznakowane FITC, więc wybarwia miejsce występowania antygeny B na zielono.

4.2.3.5.1. Metoda podwójnej immunofluorescencji pośredniej

W pracy stosowano metodę podwójnej IMF pośredniej z zastosowaniem dwóch rodzajów fluorochromów, FITC który jest wzbudzany przez falę o długości 495 nm i emituje światło w zakresie koloru zielonego o długości fali 517 nm. Drugi fluorochrom TRITC jest wzbudzany przez falę o długości 550 nm i emituje światło z zakresu barwy czerwonej o długości 573 nm.

Metoda podwójnej IMF pośredniej prowadzona była początkowo jak standardowe barwienie IHC do momentu gotowania preparatów w buforach: cytrynianowym (pH 6) lub TRIS-EDTA (pH 9). Szkiełka po ostygnięciu w temperaturze pokojowej (20 min.) przemywano wodą destylowaną i poddawano 5 min. inkubacji z 15mM glicyną celem wyblokowania autofluorescencji tkanek i 0,2% żelatyną przez 20 min. Po trzykrotnym płukaniu tkanek w buforze PBS, preparaty inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi (1 h w temperaturze pokojowej lub przez noc w 4°C). Przeciwciała zmywano ze szkiełek 0,2% żelatyną, z którą następnie inkubowano skrawki przez 5 min. Po dokładnym przepłukaniu preparatów PBS-em, nałożone zostały drugorzędowe przeciwciała fluorescencyjne, które pozostawiono na 45 min. w ciemności w temperaturze pokojowej. Od tego momentu wszystkie manipulacje wykonywane przy szkiełkach przeprowadzane były w ciemności w celu ochrony użytych fluorochromów przez wyświeceniem. Następnie skrawki inkubowano z 0,2% żelatyną przez 3 min., po czym przemyto dokładnie PBS-em. W końcowym etapie procedury nałożono DAPI celem podbarwienia jąder komórkowych. Po 10 min. usunięto fluorochrom i dokładnie przemyto szkiełka, zakańczając procedurę w środowisku wodnym. Szkiełka nakrywkowe naklejono z użyciem kleju do preparatów wilgotnych i pozostawiono na noc do wyschnięcia. Tak przygotowane preparaty IMF, zawsze chronione przez ekspozycją na światło, analizowano i dokumentowano, po czym przechowywano w temperaturze -20°C.

4.2.3.6. Analiza ilościowa otrzymanych barwień immunohistochemicznych

Analizę ilościową wybarwionych preparatów przeprowadzono przy użyciu oprogramowania AxioVision Rel.4.4, zliczając liczbę immunoreaktywnych komórek (w odniesieniu do danej wyspy w której były one obecne) lub powierzchnię wybarwioną immunohistochemicznie (w odniesieniu do obserwowanego pola przy określonym powiększeniu).

4.2.3.6.1. Częstość występowania, powierzchnia wyspy i względna masa komórek immunopozytywnych w trzustce człowieka dorosłego

Częstość występowania komórek GHREL-ip obliczono analizując preparaty trzustek pochodzących od 32. dawców. Częstość występowania komórek immunopozytywnych w wyspie analizowano pod powiększeniem obiektywu 40x, określając liczbę komórek GHREL-ip widocznych na danym przekroju wyspy. Trzy preparaty z każdej trzustki (każdy z kilkoma przekrojami) badano przy użyciu mikroskopu świetlnego, studiując pięć przypadkowo wybranych pól przypadających na jeden preparat histologiczny. Zliczono całkowitą liczbę wysp widocznych w analizowanym polu mikroskopowym, oraz liczbę komórek GHREL-ip przypadających na daną wyspę w przekroju.

Frację objętości wyspy Langerhansa zajmowaną przez poszczególne komórki immunopozytywne kalkulowano wyliczając stosunek powierzchni komórek wykazujących daną reakcję IHC do powierzchni komórek niewybarwionych a znajdujących się w analizowanym polu preparatu. Analiza taka możliwa była dzięki zastosowaniu oprogramowania AxioVision Rel. 4.4.

Znając masy poszczególnych trzustek (przyjmując masę właściwą trzustki równą 1,000 g-cm) oraz wyliczywszy frakcję objętości komórek GHREL-ip oraz komórek beta w trzustce, możliwe było obliczenie względnej masy komórek immunopozytywnych w trzustce.

4.2.3.6.2. Analiza ilościowa trzustek w trakcie rozwoju

4.2.3.6.2.1. Rozmiary wysp w trakcie rozwoju

Za wielkość wysp przyjęto umownie ich średnicę, którą analizowano po uprzednim wybarwieniu IHC na SYP. W pierwszej kolejności wyliczono wielkość wysp jako średnią arytmetyczną liczoną z sumy długości (X) i szerokości (Y) analizowanej wyspy (Ryc.9). Średnicę wysp obliczano więc według wzoru:

$$\text{Średnica wyspy} = (X+Y)/2$$



Ryc.9 Wyspy Langerhansa trzustki wybarwione Ditzonem. Strzałkami oznaczono długość (X) oraz szerokość (Y) danej wyspy.

Następnie analizie poddano powierzchnię, zajmowaną przez wybarwione IHC komórki endokryne, którą wyrażono w mm^2 . Przy użyciu oprogramowania Axio Vision Rel. 4.4 wyznaczano powierzchnię immunoreaktywną dla danego hormonu danej wyspy. Analizowano pięć przypadkowo wybranych pól mikroskopowych preparatów z każdego tygodnia rozwoju trzustki (nie mniej niż 10 wysp przypadających na dany etap rozwoju). Wyniki uśredniono obliczając w ten sposób średnią powierzchnię wysp charakterystyczną dla danego etapu rozwoju.

4.2.3.6.2.2. Liczba komórek immunoreaktywnych w przekroju wyspy w trakcie rozwoju

Liczbę komórek immunoreaktywnych analizowano po uprzednim wybarwieniu preparatów przy użyciu specyficznego przeciwciała pierwszorzędowego skierowanego na interesujący nas antygen (insulina, GHREL, glukagon, PP, SST, SYP, czynnik transkrypcyjny). Analizowano je przy pomocy programu Axio Vision Rel. 4.4. W programie tym liczba komórek odnoszona jest do całkowitej liczby komórek na przekroju danej wyspy i wyrażana w procentach.

Liczba komórek danego typu odnoszona była do całkowitej liczby komórek danej wyspy widocznej na przekroju i wyrażona jako jej procent. Udział komórek danego typu obliczano z 5-11 wysp, z nie mniej niż 3 przypadkowo wybranych pól mikroskopowych i wyrażano jako średnią \pm SD.

4.2.3.7. Analiza jakościowa otrzymanych barwień immunohistochemicznych i immunofluorescencyjnych

Wyniki barwień IHC analizowano przy użyciu mikroskopu optycznego odwróconego – Axiovert 25 (ZEISS, Niemcy) z oprogramowaniem AxioVision Rel.4.4. Do obserwacji tkanek wybarwionych immunofluorescencyjnie używano mikroskopu konfokalnego LSM 510 Meta (ZEISS, Niemcy) lub mikroskopu Leica DM5000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) z wbudowaną kamerą i aparatem cyfrowym (Evolution MP; Leica). Zdjęcia analizowano przy użyciu oprogramowania firmy Leica IM50 Image Manager.

Każdy typ reakcji poprzedzony był reakcjami kontrolnymi, których celem było zweryfikowanie specyficzności używanych przeciwciał pierwszorzędowych. W tym celu przeciwciało pre-inkubowano przez 30 min. z odpowiadającym mu peptydem, po czym taki kompleks nałożono na tkankę. Następnie kontynuowano reakcję IHC/IMF według standardowego protokołu barwienia. W celu zweryfikowania specyficzności pozostałych składników reakcji IHC/IMF omijano inkubację z przeciwciałem pierwszorzędowym, inkubując tkankę jedynie z buforem PBS. Następnie kontynuowano reakcję IHC/IMF według standardowego protokołu barwienia.

4.2.3.8. Analiza statystyczna wyników

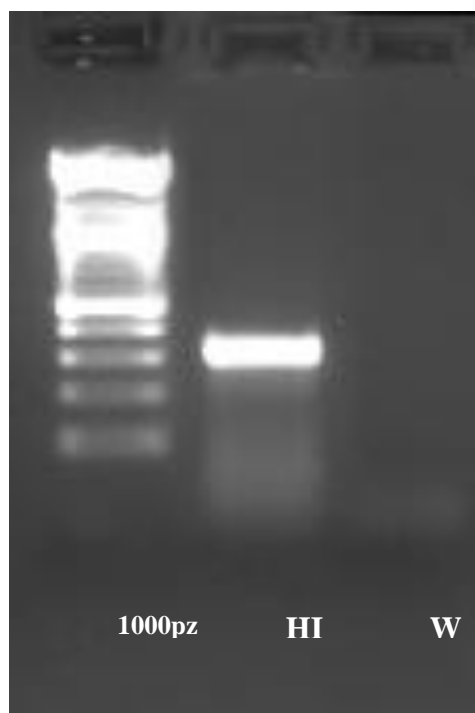
Analizę statystyczną wyników prowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA – testu Duncana, za pomocą programu SigmaStat 2.0 (StatSoft). Różnice pomiędzy średnimi na poziomie 5% ($p \leq 0,05$) uznane były za istotne, a na poziomie 1% ($p \leq 0,01$) za wysoce istotne. Wyniki przedstawione zostały jako średnie \pm błąd standardowy (SEM).

5. WYNIKI

5.1. Identyfikacja komórek GHREL-ip w trzustce człowieka dorosłego (wyspy Langerhansa)

5.1.1. Ekspresja ppGHREL w izolowanych wyspach Langerhansa trzustki

Ekspresję ppGHREL badano w izolowanych wyspach Langerhansa trzustki człowieka. Wyspy izolowano od pacjentów zakwalifikowanych jako dawcy wysp do przeszczepu, w celach transplantacji chorym na cukrzycę typu I-szego pacjentom, a część wyizolowanego materiału przeznaczono do celów doświadczalnych, dla zweryfikowania hipotezy o obecności ppGHREL w komórkach endokrynych wysp trzustkowych człowieka. Zastosowano parę starterów specyficznych dla mRNA ppGHREL. Zastosowana para starterów amplifikowała w reakcji PCR produkt o wielkości 326 pz. Wyniki analizy ekspresji *ppGHREL* w izolowanych wyspach trzustki człowieka przedstawiono na rycinie nr 10.

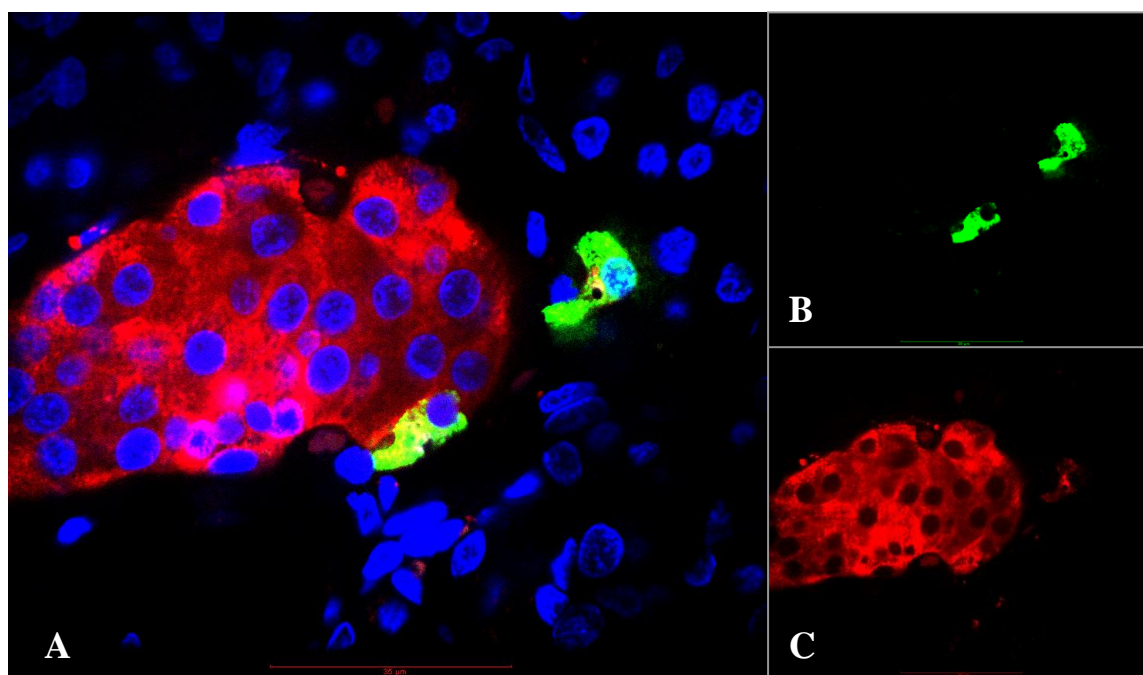


Ryc.10 Analiza ekspresji mRNA ppGHREL wykonana techniką PCR w izolowanych wyspach Langerhansa trzustki człowieka. 1000 pz (wzorzec wielkości markera), HI (Human Islets – izolowane wyspy), W (woda – kontrola).

Wyniki tych badań wykazały, że ppGHREL ulega ekspresji na poziomie mRNA w aparacie wyspowym trzustki człowieka dorosłego.

5.1.2. Komórki GHREL-ip jako komórki endokrynne – analiza immunofluorescencyjna wysp trzustki człowieka dorosłego

Doniesienia literaturowe, że komórki GHREL-ip stanowią oddzielną grupę, lub podgrupę endokrynej populacji komórek aparatu wyspowego wymagały rozpoczęcia badań histochemicznych od zweryfikowania hipotezy, iż komórki GHREL-ip są komórkami endokrynnymi. Dlatego też przeprowadzono badania IMF kolokalizacji GHREL z SYP w trzustce. SYP jest markerem komórek neuroendokrynych, w tym komórek wysp Langerhansa (Chejfec i wsp., 1987; Kalina i wsp., 1991). Przykładowy wynik podwójnego barwienia IMF przedstawia rycina nr 11.



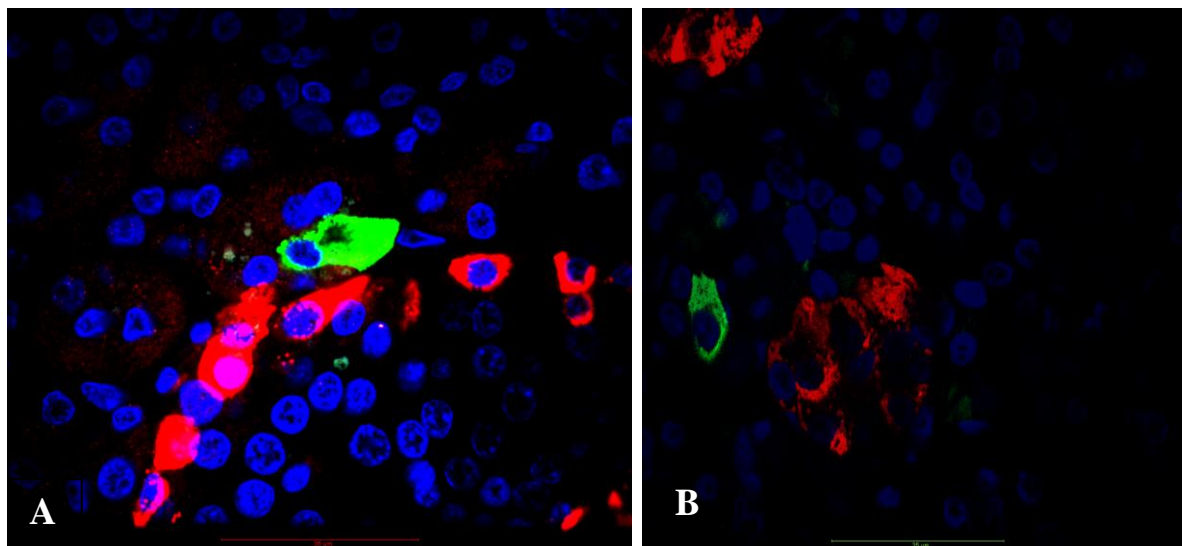
Ryc.11 Kolokalizacja GHREL (FITC – kolor zielony) i SYP (TRITC – kolor czerwony) w trzustce człowieka. A. nałożenie obrazów zebranych z 3 kanałów: FITC (GHREL), TRITC (SYP), DAPI (jądra komórkowe – kolor niebieski). B. Komórki GHREL-ip w wyspie. C. Komórki SYP-ip. Kolor żółty, wynikający z nałożenia się sygnałów obu fluorochromów, obrazuje koekspresję badanych peptydów. Powiększenie określone odcinkiem wynosi 35 μm .

Jak wykazały przeprowadzone badania, w trzustce człowieka dorosłego praktycznie wszystkie komórki wysp są komórkami SYP-ip. Poza wyspą występują tylko pojedyncze komórki SYP-ip, i to w najbliższym sąsiedztwie wysp. W przeciwieństwie do nich, komórki GHREL-ip są tylko nieliczne, przy czym występują one zarówno w obrębie wysp jak i w ich najbliższym sąsiedztwie. W przeprowadzonych badaniach wszystkie komórki GHREL-ip są również komórkami SYP-ip. Należy podkreślić, że zdecydowanie słabszą reakcję IMF na SYP obserwuje się w przypadku pojedynczych komórek znajdujących się poza wyspą.

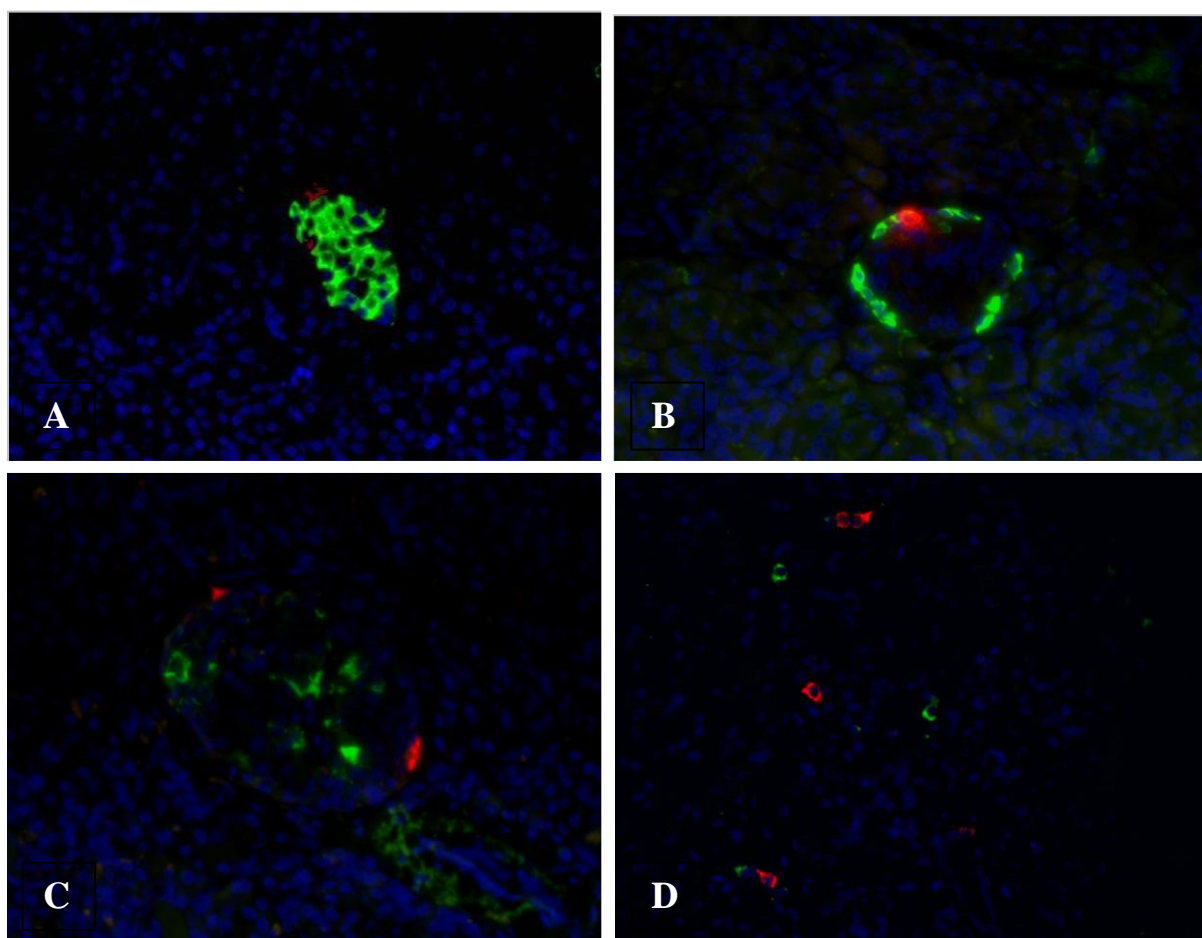
5.1.3. Komórki GHREL-ip piątym typem komórek endokrynych wyspy

Identyfikacja GHREL w wyspie Langerhansa trzustki była do niedawna kwestią sporną. W 2002 roku Volante i wsp. zlokalizowali GHREL w komórkach β trzustki człowieka wnioskując, że jej ekspresja zachodzi w komórkach syntetyzujących insulinę. W tym samym roku inna grupa wykazała kolokalizację GHREL z glukagonem w komórkach α trzustki (Date i wsp., 2002). Te sprzeczne doniesienia literaturowe, jak i najnowsze wyniki badań, jakoby komórki GHREL-ip wyznaczały nowy, piąty typ komórek w wykształconym aparacie endokrynym trzustki (Wierup i wsp., 2002) wymagały podjęcia prób zweryfikowania tej hipotezy na materiale objętym badaniami niniejszej pracy.

W tym celu przeprowadzono podwójne barwienia na preparatach trzustki osoby dorosłej. W pierwszej kolejności badano ewentualną koekspresję GHREL z insuliną (Ryc.12.A, 13.A) i glukagonem (Ryc.12.B, 13.B). Następnie wykonano dodatkowe doświadczenie mające na celu prześledzenie ewentualnej kolokalizacji GHREL z SST (Ryc.13.C) oraz PP (Ryc.13.D).



Ryc.12 Komórki GHREL-ip (FITC) wykazują brak koekspresji z: A. glukagonem (TRITC) i B. insuliną (TRITC). Powiększenie określone odcinkiem wynosi 35 µm.



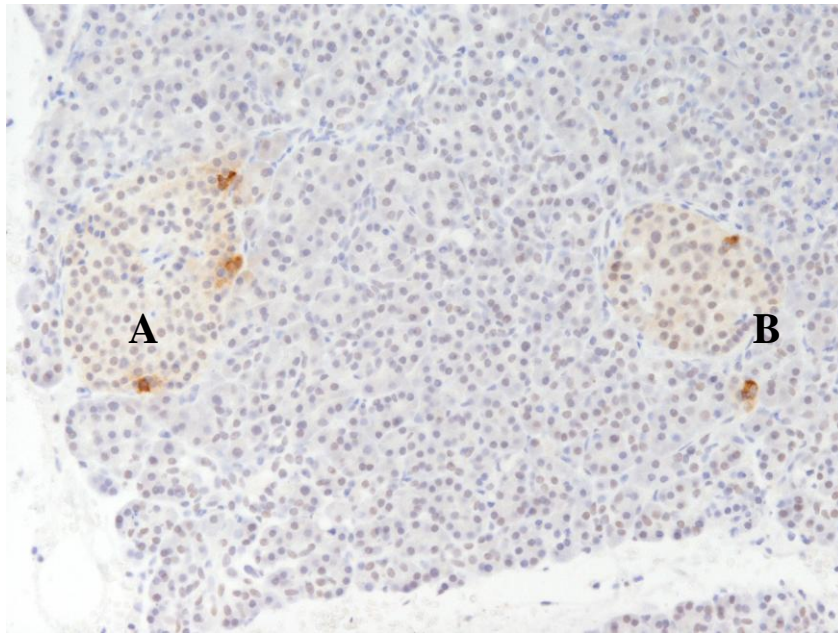
Ryc.13 Immunofluorescencyjna lokalizacja GHREL (TRITC) z: A. insuliną (FITC), B. glukagonem (FITC), C. SST (FITC) oraz D. PP (FITC) w wyspie człowieka dorosłego. Kolor niebieski (DAPI). Powiększenie obiektywu x 20.

Nie obserwuje się koekspresji GHREL z żadnym z czterech głównych hormonów trzustki (Ryc.13). Komórki INS-ip zlokalizowane są wewnątrz wysp. Otoczone są one pozostałymi typami komórek endokrynych, w tym także komórkami GHREL-ip, które zlokalizowane są zazwyczaj na obrzeżu wyspy. Komórki GLUK-ip zajmują, podobnie jak komórki ϵ , peryferyjną część wyspy, jednak ewidentnie stanowią one odrębną od komórek GHREL-ip, populację komórek aparatu wyspowego (Ryc.12.A, 13.A). Wyniki badań IMF, dokumentujące brak kolokalizacji GHREL z insuliną w komórkach β oraz z glukagonem w komórkach α trzustki, zgodne są ze wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi (Wierup i wsp., 2002).

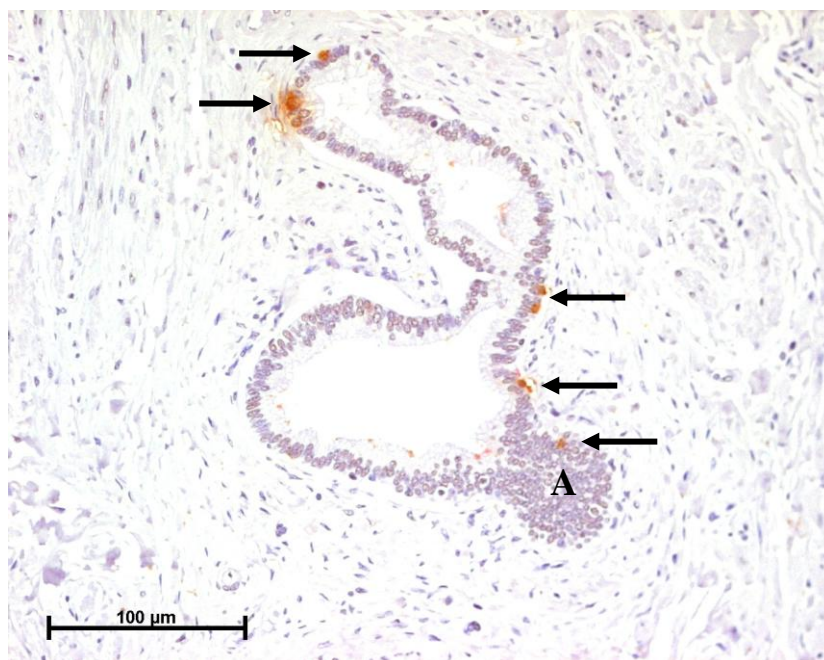
Dodatkowo przeprowadzono doświadczenia mające na celu potwierdzenie hipotezy o całkowitej i pełnej odrębności piątego typu komórek wyspy. Brak kolokalizacji GHREL z SST w komórkach δ i PP w komórkach PP (Ryc.13.C, 13.D) potwierdza tę hipotezę. Komórki GHREL-ip stanowią więc u człowieka dorosłego nowy, piąty typ komórek wysp Langerhansa trzustki.

5.1.4. Lokalizacja komórek GHREL-ip w trzustce

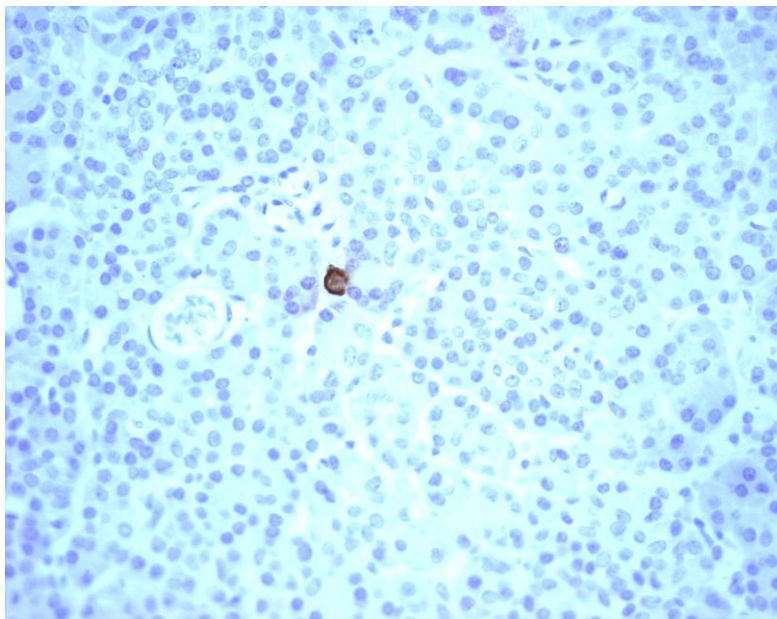
Obecność komórek GHREL-ip w trzustce opisano na podstawie badań IHC wykonanych na tkankach pochodzących od osób dorosłych. Zaobserwowano trzy typy lokalizacji komórek GHREL-ip w trzustce: w wyspie (Ryc.14), w przewodach trzustkowych (Ryc.15) oraz pojedyncze komórki zlokalizowane wśród pozostałych elementów egzokrynowych (Ryc.16). Najbardziej zewnętrznie położonymi komórkami wysp Langerhansa trzustki człowieka dorosłego są komórki syntetyzujące GHREL. Obecne są one zawsze na obrzeżu wyspy (Ryc.14), stanowiąc bardzo niewielki procent jej komórek. Nie zaobserwowano komórek GHREL-ip wewnątrz wysp. Komórki GHREL-ip obserwowano natomiast w ścianach przewodów trzustkowych (Ryc.15), oraz wśród pozostałych elementów egzokrynowych jako pojedyncze, chaotycznie rozrzucone komórki (Ryc.16).



Ryc.14 Immunohistochemiczna lokalizacja komórek GHREL-ip w wyspach Langerhansa trzustki człowieka dorosłego (A i B). Widoczna wyraźna reakcja IHC w kilku komórkach zlokalizowanych na obwodzie wysp A i B. Powiększenie obiektywu x 20.



Ryc.15 Immunohistochemiczna lokalizacja komórek GHREL-ip w przewodzie trzustkowym trzustki osoby dorosłej (strzałki). Widoczne na rycinie zgrupowanie komórek w dolnej części przewodu (A) może wyznaczać nowo kształtujące się komórki endokryne przyszłej wyspy (duct-to-islet neogenesis). Powiększenie określone skalą.



Ryc.16 Komórka GHREL-ip wśród elementów egzokrynych trzustki człowieka dorosłego. Powiększenie obiektywu x 40.

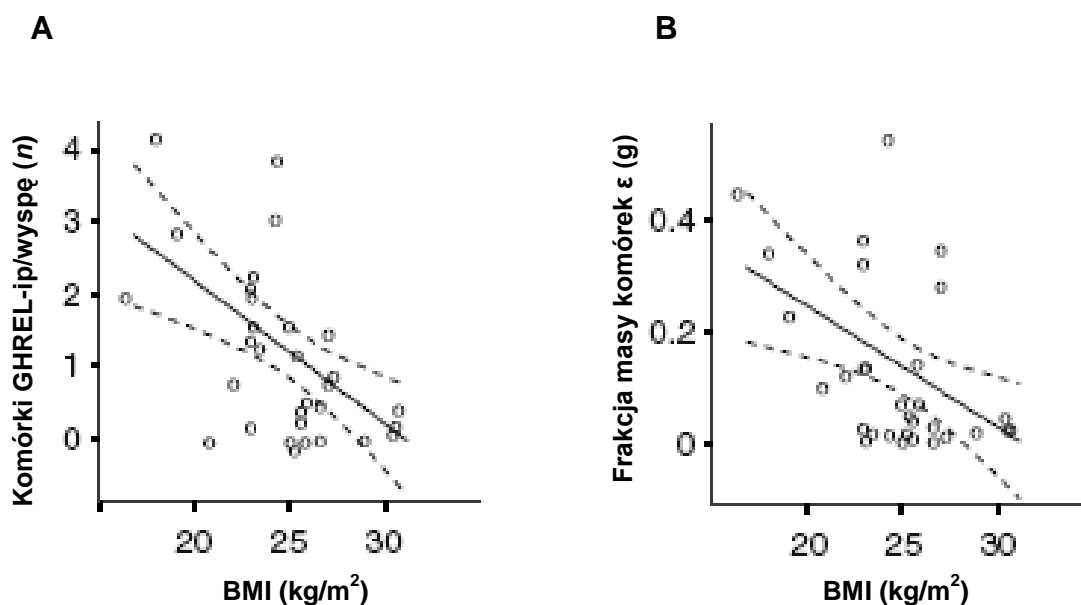
Przeprowadzone badania wykazały, że w pełni wykształconej trzustce człowieka niewiele jest komórek GHREL-ip. Stanowią one bardzo niski procent pozostałych komórek tworzących organ. Na podkreślenie zasługuje obecność tych komórek w ścianach przewodów trzustkowych, co może mieć istotny wpływ na neogenezę wysp w dorosłym organizmie.

5.1.5. Częstość występowania, frakcja objętości i frakcja masy komórek GHREL-ip w trzustce człowieka dorosłego

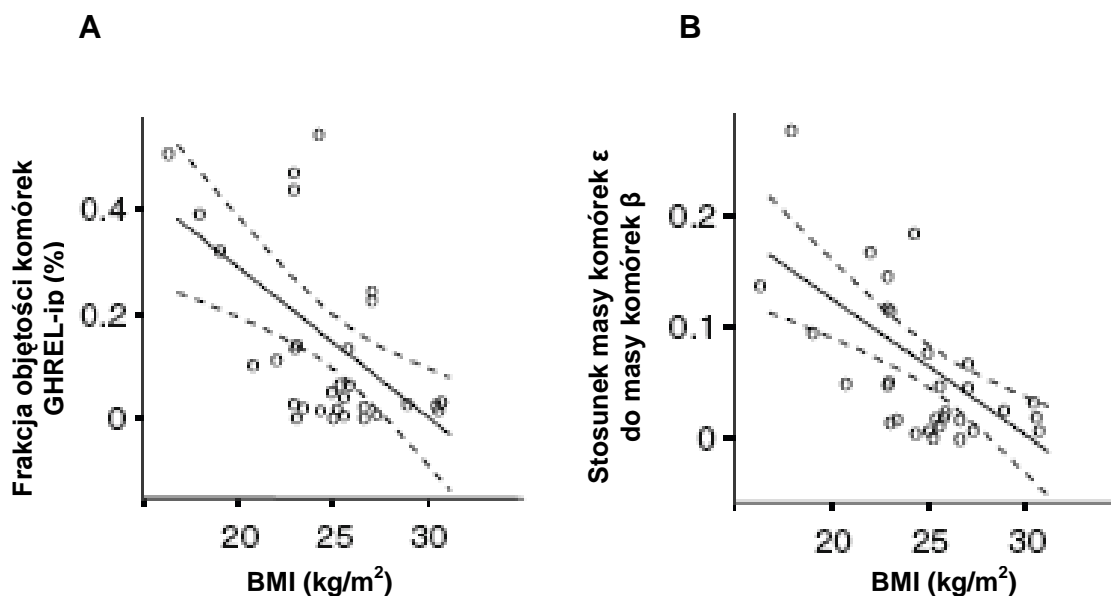
Badaniu poddano preparaty trzustek pochodzących od 32. pacjentów zakwalifikowanych jako dawcy narządu. Na preparatach tych wykonywano reakcję IHC dla GHREL. Spośród wszystkich wysp, $34,7 \pm 18,7\%$ wykazuje co najmniej jedną komórkę GHREL-ip, w pozostałych, takich komórek nie obserwowano. Spośród wszystkich wysp, w których zlokalizowano komórki GHREL-ip, aż $74,0 \pm 24,2\%$ wysp zawierało maksymalnie do 3. komórek GHREL-ip. W pozostałej części ($26,0 \pm 24,2\%$) obserwowano więcej niż 3 komórki GHREL-ip. Średnio około $1,2 \pm 1,2$ komórek GHREL-ip przypada na przekrój danej wyspy.

Obliczono również powierzchnię zajmowaną przez komórki ϵ i β (dla każdego typu komórek oddzielnie), przypadającą na analizowane pole preparatu. Analiza taka możliwa była dzięki zastosowaniu oprogramowania AxioVision Rel. 4.4. przy użyciu którego obliczano powierzchnię komórek wykazujących reakcję IHC, w stosunku do powierzchni komórek niewybarwionych, znajdujących się poza wyspą a wyznaczających część egzokrynną trzustki.

Fracja objętości komórek GHREL-ip w wyspach trzustki człowieka dorosłego wynosi $0,14 \pm 0,16\%$. Natomiast frakcja objętości komórek β wynosi $2,50 \pm 1,94\%$. Jako że dysponowano danymi odnośnie masy poszczególnych trzustek (100 ± 21 g), oraz przyjmując masę właściwą trzustki równą $1,000$ g-cm, obliczono całkowitą średnią masę komórek GHREL-ip ($0,13 \pm 0,15$ g), oraz komórek INS-ip ($2,4 \pm 1,9$ g) w trzustce. Tak płeć jak i wiek pacjentów nie wpływały na masę komórek GHREL-ip w trzustce, natomiast bardzo wyraźna była ujemna korelacja ze wskaźnikiem masy ciała (BMI) badanych.



Ryc.17 Średnia liczba komórek GHREL-ip/wyspę oraz frakcja masy komórek ϵ w trzustce człowieka dorosłego, oraz ich zależność od BMI. A. średnia liczba komórek GHREL-ip w trzustce (n/przekrój wyspy; $R=0.565$; $p=0.001$), B. frakcja masy komórek ϵ (g) w trzustce ($R=0.482$; $p=0.006$) w odniesieniu do BMI dawców. Linia ciągła – regresja liniowa, linia przerywana – 95% przedział ufności.



Ryc.18 Frakcja objętości wyspy zajęta przez komórki GHREL-ip i stosunek ich masy do masy komórek INS-ip w trzustce człowieka dorosłego i ich zależność od BMI. A. Frakcja objętości komórek GHREL-ip w trzustce (%) ($R=0.57$; $p=0.001$), B. stosunek masy komórek ϵ do masy komórek β w trzustce ($R=0.627$; $p<0.001$) w odniesieniu do BMI dawców. Linia ciągła – regresja liniowa, linia przerywana – 95% przedział ufności.

5.2. Cytologiczne aspekty rozwoju wysp Langerhansa człowieka w okresie płodowym

Kształtowanie się wysp w trakcie rozwoju to dynamiczny i bardzo złożony proces. Obejmuje on wzrost i różnicowanie się poszczególnych komórek a przez to zmianę relacji ilościowych poszczególnych komponentów endokrynej części trzustki. Jednak niemalże liniowemu wzrostowi wielkości wysp podczas ontogenezy nie towarzyszy równoczesny, liniowy wzrost procentowego udziału poszczególnych komórek endokrynych aparatu wyspowego. Ten dynamiczny proces wzajemnych zależności ilościowych poszczególnych komórek wyspy opisano w poniższych rozdziałach.

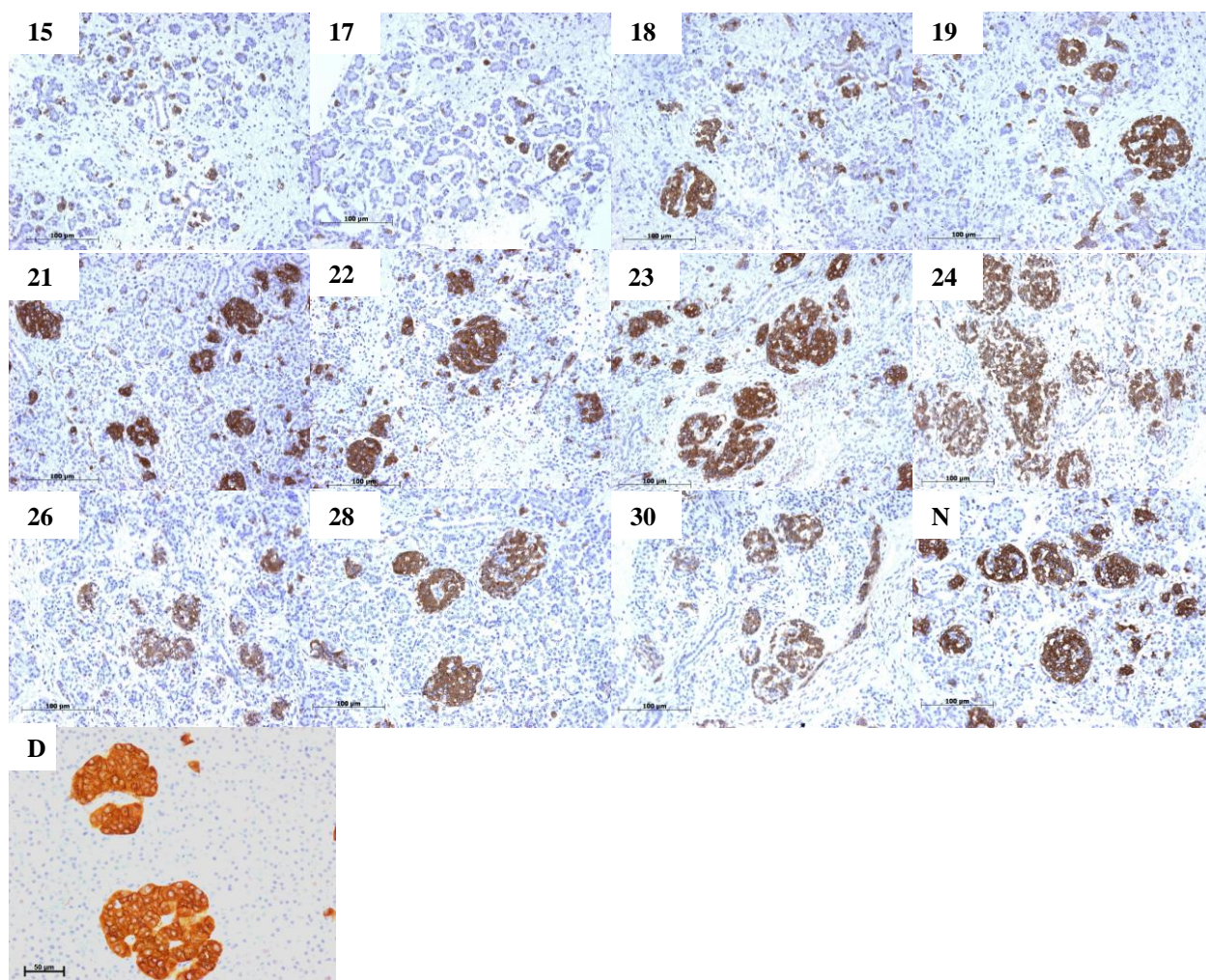
5.2.1. Ogólny rozwój wysp Langerhansa – analiza jakościowa i ilościowa

Analizowano trzustki płodów pomiędzy 13. a 39. tygodniem rozwoju wewnątrzmacicznego. W tym okresie w badanym narządzie obserwowano stały wzrost

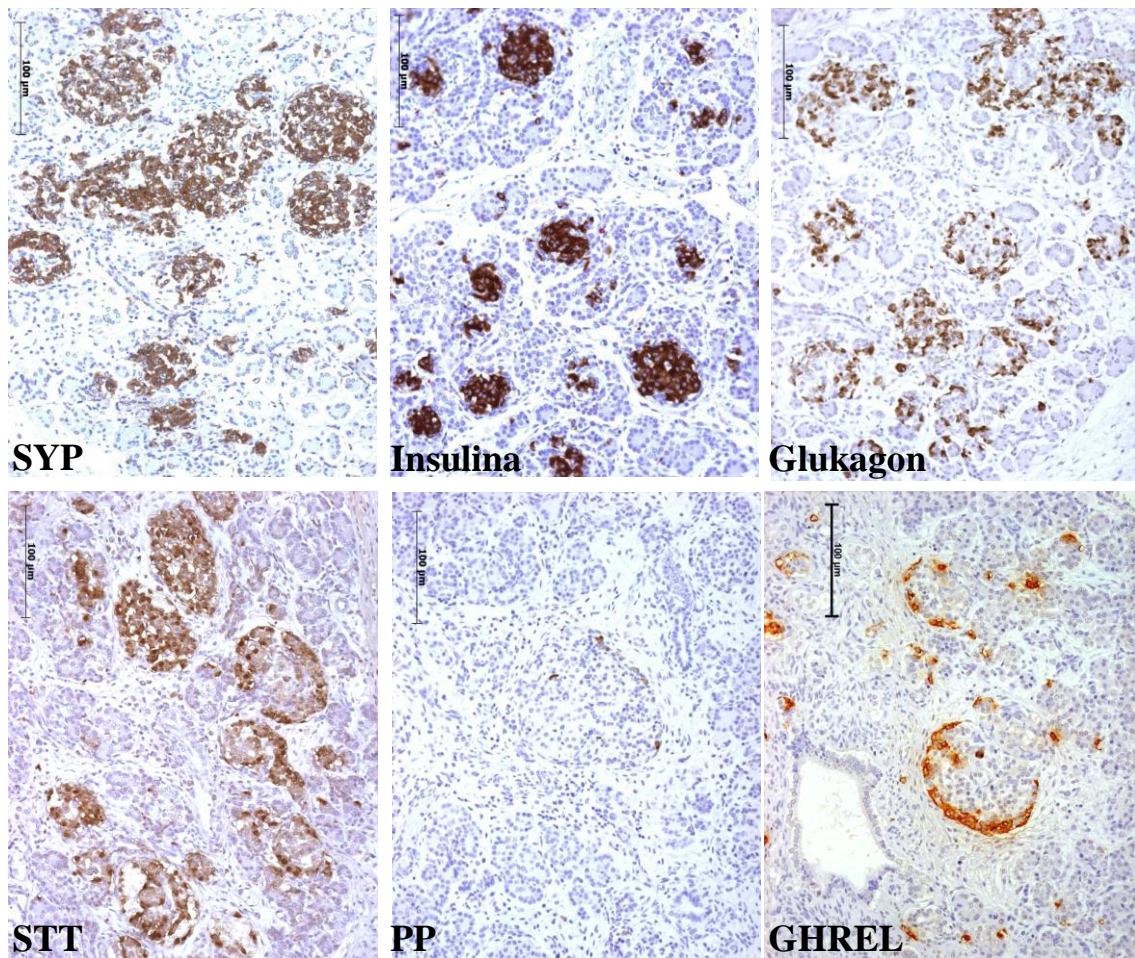
udziału komponenty endokrynej (komórki SYP-ip), który to proces analizowano ilościowo oraz jakościowo. Analizy te oparto na pomiarach zmieniającej się powierzchni endokrynej badanych trzustek.

5.2.1.1. Analiza jakościowa – immunohistochemiczna

Komórki endokryjne (SYP-ip), widoczne są w trzustce już na bardzo wczesnych etapach rozwoju płodowego. W trzynastym tygodniu życia wewnątrzmacicznego trzustka składa się z drobnych przewodów trzustkowych, w okolicy których bardzo często obserwuje się chaotycznie porzrzucone komórki endokryjne, które wraz z nabłonkiem endodermalnym, otoczone są masą komórek mezenchymalnych. Na tym etapie rozwoju pojedyncze komórki endokryjne nie są jeszcze zorganizowane w wyspy, choć wykazują pozytywne reakcje IHC dla poszczególnych hormonów. W kolejnych etapach rozwoju komórki zebrane są już w grupy komórek endokrynych (15 tydz.), które wykazują homotypowy, czyli jednolity sposób barwienia, oddzielnie dla insuliny lub glukagonu. Nadal obserwuje się pojedyncze komórki endokryjne rozsiane w części egzokrynej narządu. Komponenta endokryjna zaczyna kształtować się w wyspy Langerhansa trzustki około 17. tygodnia życia wewnątrzmacicznego (widoczne komórki GLUK-ip nadają zarys prymitywnym wyspom). Intensywny rozwój wysp obserwuje się od 18. tygodnia aż do urodzenia. Wyspy w 21. tygodniu rozwoju wykazują charakter heterotypowy – w prymitywnych wyspach obecne są już dwa lub więcej rodzajów komórek endokrynych. W 24. tygodniu życia wewnątrzmacicznego obserwuje się typowy dla dorosłej wyspy układ komórek α , β , δ , PP i ϵ , choć z nieustalonym jeszcze udziałem ilościowym poszczególnych typów komórek (Ryc.20). Komórki INS-ip stanowią zasadniczą i centralną część wyspy i otoczone są komórkami α oraz δ , z nielicznymi komórkami pozytywnymi dla PP na obwodzie. W dużej liczbie obecne są również komórki GHREL-ip, które zlokalizowane są na obrzeżach wysp (Ryc.20).



Ryc.19 Komórki SYP-ip w trzustce w okresie płodowym i pourodzeniowym człowieka. Okresy rozwoju (tygodnie) opisane są w lewym, górnym rogu każdego zdjęcia, gdzie N (noworodek), D (dorosły). Powiększenie określone odcinkiem wynosi 100 μm (zdjęcie D = 50 μm).



Ryc.20 Immunohistochemiczna lokalizacja hormonów trzustki w 24. tygodniu życia wewnątrzmacicznego. Opis poszczególnych hormonów widoczny jest na dole każdego ze zdjęć. Powiększenie określone odcinkiem wynosi 100 µm.

5.2.1.2. Analiza ilościowa

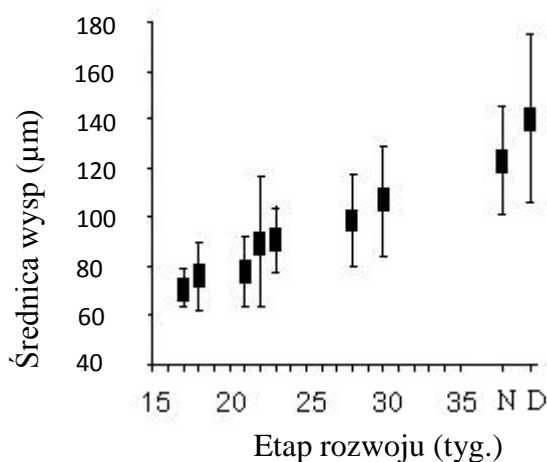
Komponent endokryny zaczyna kształtować się w wyspy Langerhansa trzustki wcześniej w rozwoju osobniczym. Początkowo, komórki endokryne obserwowane są jako pojedyncze, porzucane chaotycznie w tkance mezenchymalnej komórki, często znajdujące się w bliskim otoczeniu prymitywnych przewodów trzustkowych. W kolejnych etapach rozwoju komórki zebrane są już w grupy komórek endokrynych, które z czasem zwiększają swą średnicę tworząc prymitywne wyspy Langerhansa. Rozwój wysp obserwować można od 17. tygodnia a średnia wielkość wysp, wzrasta systematycznie aż do osiągnięcia pełnej dojrzałości morfologicznej jak i fizjologicznej w trzustce osoby dorosłej (Tab.8). Ze względu

na zbliżony do kulistego kształt wysp, ich wielkość analizowano jako średnią arytmetyczną liczoną z sumy długości (X) i szerokości (Y) analizowanej wyspy. Średnicę wysp obliczano więc według wzoru:

$$\text{Średnica wyspy} = (X+Y)/2$$

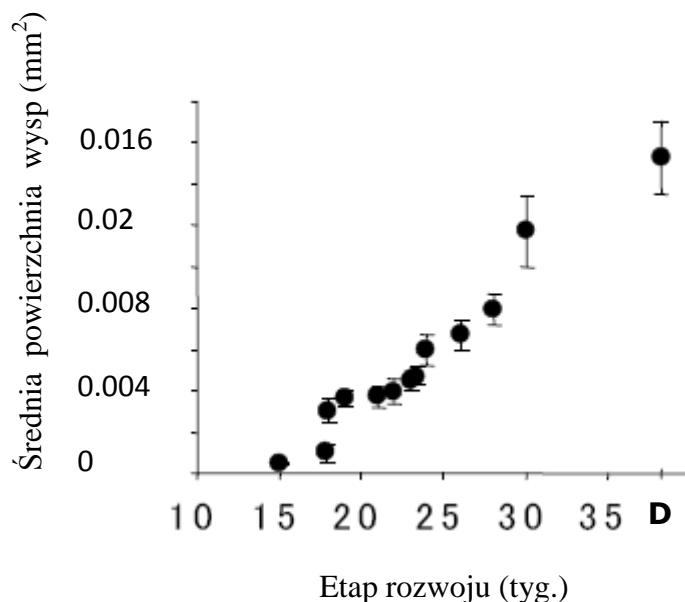
Tab.8 Średnie wielkości wysp wyrażone jako ich średnice (μm), zmieniające się w trakcie rozwoju trzustki człowieka. Duże litery oznaczają różnice wysoce istotnie statystycznie ($p \leq 0,01$), $n=5-640$. Obliczenia oparto na 1 trzustce, gdzie analizowano rozmiary wysp na podstawie pomiarów wielkości liczby wysp ukazanej w nawiasach. U dorosłych badania przeprowadzono na 32. trzustkach, analizując razem 640 wysp.

Okresy rozwoju trzustki (liczba mierzonych wysp)	średnica wysp (μm) \pm SEM
(A) 17 tydz. (n = 11)	71 \pm 80
(B) 18 tydz. (n = 9)	76 \pm 14
(C) 21 tydz. (n = 7)	78 \pm 14
(D) 22 tydz. (n = 7)	90 \pm 27
(E) 23 tydz. (n = 6)	91 \pm 13
(F) 28 tydz. (n = 12)	99 \pm 18
(G) 30 tydz. (n = 5)	107 \pm 22 (A)
(H) Noworodek (n = 8)	123 \pm 22 (ABCDE)
(I) Dorosły (n = 640)	140 \pm 34 (ABCDEGH)



Ryc.21 Wykres ukazuje zmieniającą się w trakcie rozwoju średnicę wysp trzustkowych człowieka. Na osi X oznaczono tygodnie rozwoju wewnątrzmacicznego (od 17. do 30.), N (noworodek), D (dorosły). Na osi Y oznaczono średnicę wysp podaną w µm.

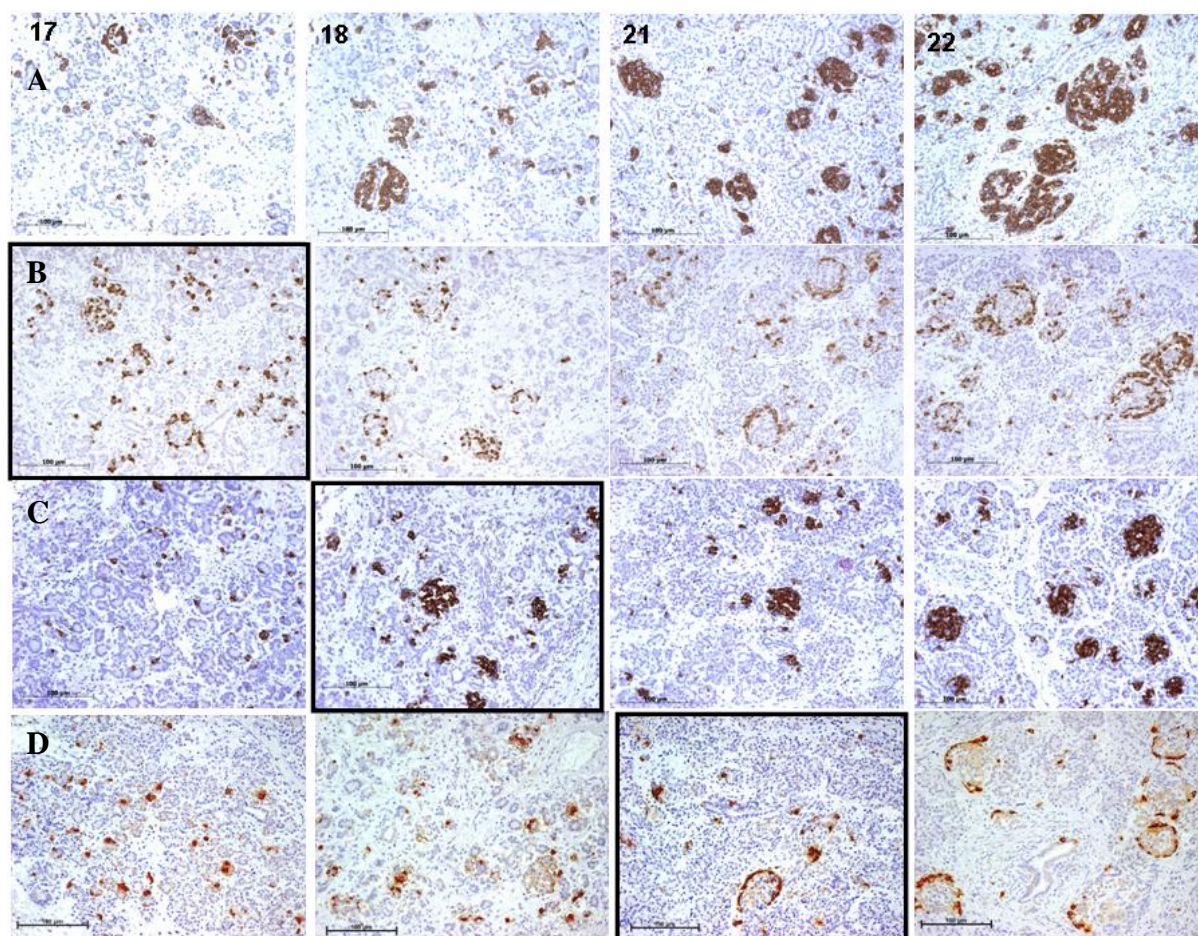
Taki stały, zbliżony do liniowego wzrost średniej wielkości wysp (Ryc.21) świadczy bezpośrednio tak o ekspansji komponentu endokrynnego w trakcie rozwoju jak i o zagęszczaniu się części endokryennej. Wyniki wstępnych analiz dotyczących zmieniającej się wielkości wysp w trakcie rozwoju wewnątrzmacicznego, wzbogacono dodatkowo o kalkulację progresywnie zmieniającej się powierzchni wysp, wyrażonej w mm² (Ryc.22). Kalkulacja taka możliwa była po wybarwieniu preparatów na SYP i analizie materiału w mikroskopie świetlnym przy użyciu oprogramowania AxioVision Rel. 4.4. Zaobserwowano podobne tendencje jeżeli chodzi o progresywnie zwiększającą się wielkość wysp podczas rozwoju wyrażoną tak jako ich średnicę, jak i ich powierzchnię.



Ryc.22 Zmieniająca się powierzchnia wysp Langerhansa, wyrażona w mm² (oś Y) w trakcie rozwoju wewnątrzmacicznego podanego w tygodniach (oś X). Średnia wielkość wysp wyrażona jest jako jej powierzchnia obliczana z 5-60 wysp przypadających na dany okres rozwoju. D (dorosły).

5.2.2. Identyfikacja poszczególnych typów komórek endokrynych

W dynamicznie rozwijającej się trzustce, już na bardzo wczesnych etapach rozwoju obserwować można obecne tam komórki endokryne, które z czasem formują wyspy. Początkowo, zgrupowania komórek endokrynych mają charakter homotypowy, są zatem złożone wyłącznie z komórek jednego typu, czyli GLUK-ip, lub też INS-ip. Dopiero z czasem struktury te, przypominające prymitywne wyspy, nabierają heterotypowego profilu, zawierając różnego rodzaju komórki endokryne, które układają się w ich obrębie w specyficzny i charakterystyczny dla danego typu komórek sposób. Możemy mówić wtedy o dojrzałości morfologicznej danego typu komórek. Tak więc komórki INS-ip wewnątrz wyspy, GLUK-ip dookoła komórek β a GHREL-ip na samym skraju wysp. Moment osiągnięcia dojrzałości morfologicznej różnych typów komórek endokrynych jest różny. Najwcześniej, w typowy dla siebie sposób układają się komórki GLUK-ip, bo już w 17. tyg. rozwoju zlokalizowane są na obrzeżu nowotworzących się wysp. Kolejno, dojrzałość morfologiczną osiągają komórki INS-ip (18. tydz.) i jako ostatnie – GHREL-ip, bo dopiero w 21. tyg. rozwoju. Ta czasowa zależność ukazana jest na rycinie nr 23 (panel A obrazuje progresywnie zmieniający się komponent endokryny trzustki w trakcie rozwoju).

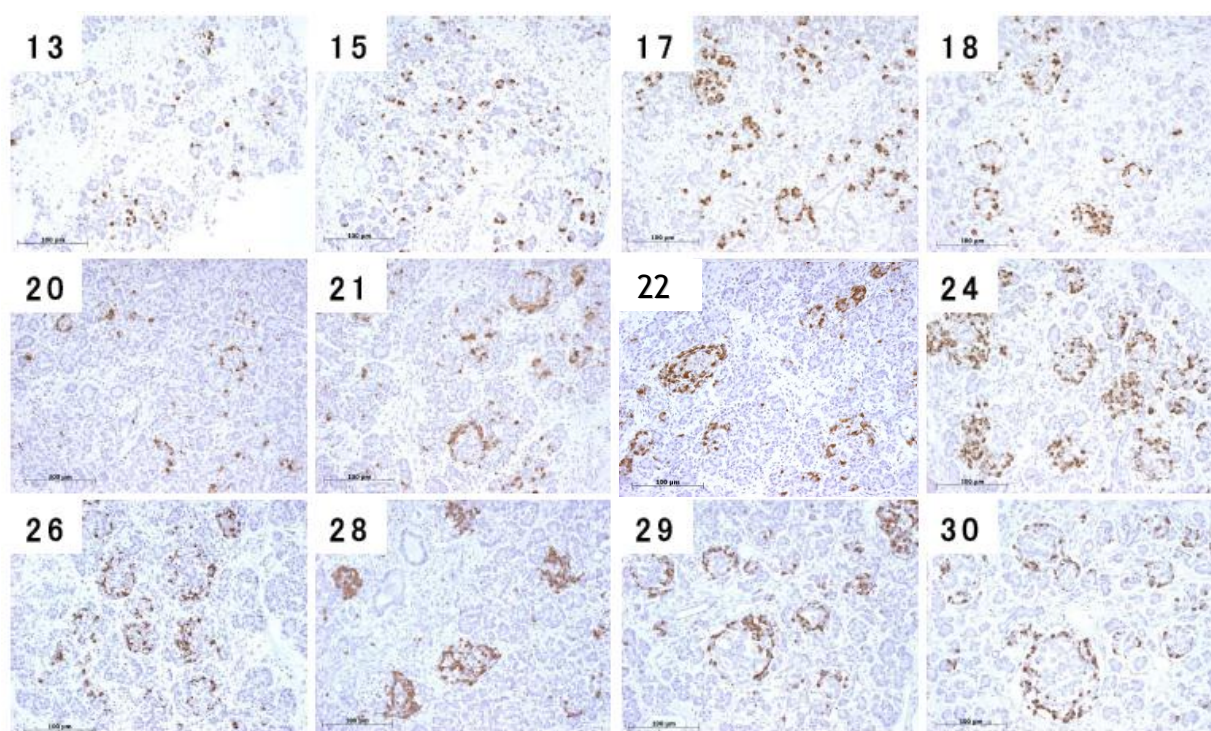


Ryc.23 Immunohistochemiczna lokalizacja głównych typów komórek endokrynych w trakcie rozwoju trzustki człowieka. Poszczególne panele przedstawiają lokalizację IHC różnych hormonów części endokrynej trzustki. Kolejno panele: A. SYP, B. glukagon, C. insulina, D. GHREL. Okres rozwoju trzustki podany jest w lewym górnym rogu każdego z pionów. Pogrubieniem ramki zdjęć oznaczono okres rozwoju, na jakim dany typ komórki osiąga dojrzałość morfologiczną, rozumianą jako typową dla trzustki dorosłego człowieka lokalizację w obrębie wyspy. Powiększenie określone odcinkiem wynosi 100 μm .

Identyfikacja oraz szczegółowy opis jakościowych zmian komponentu endokrynego, analizowanego oddzielnie dla komórek GLUK-ip, INS-ip oraz GHREL-ip znajduje się w kolejnych rozdziałach.

5.2.2.1. Identyfikacja komórek GLUK-ip

W zebranych materiale identyfikowano pojedyncze komórki GLUK-ip już od 13. aż do 15. tygodnia. W 17. tygodniu rozwoju, komórki GLUK-ip widoczne są już na obrzeżu nowoformujących się wysp. Taki schemat lokalizacji komórki te wykazują poprzez cały okres rozwoju. Komórki GLUK-ip nie tworzą zwartego pierścienia okalającego centralną część wyspy, lecz tendencja umiejscawiania się tychże na obrzeżu wysp, poczynając od 17. tygodnia rozwoju, jest stała i ewidentna (Ryc. 24).

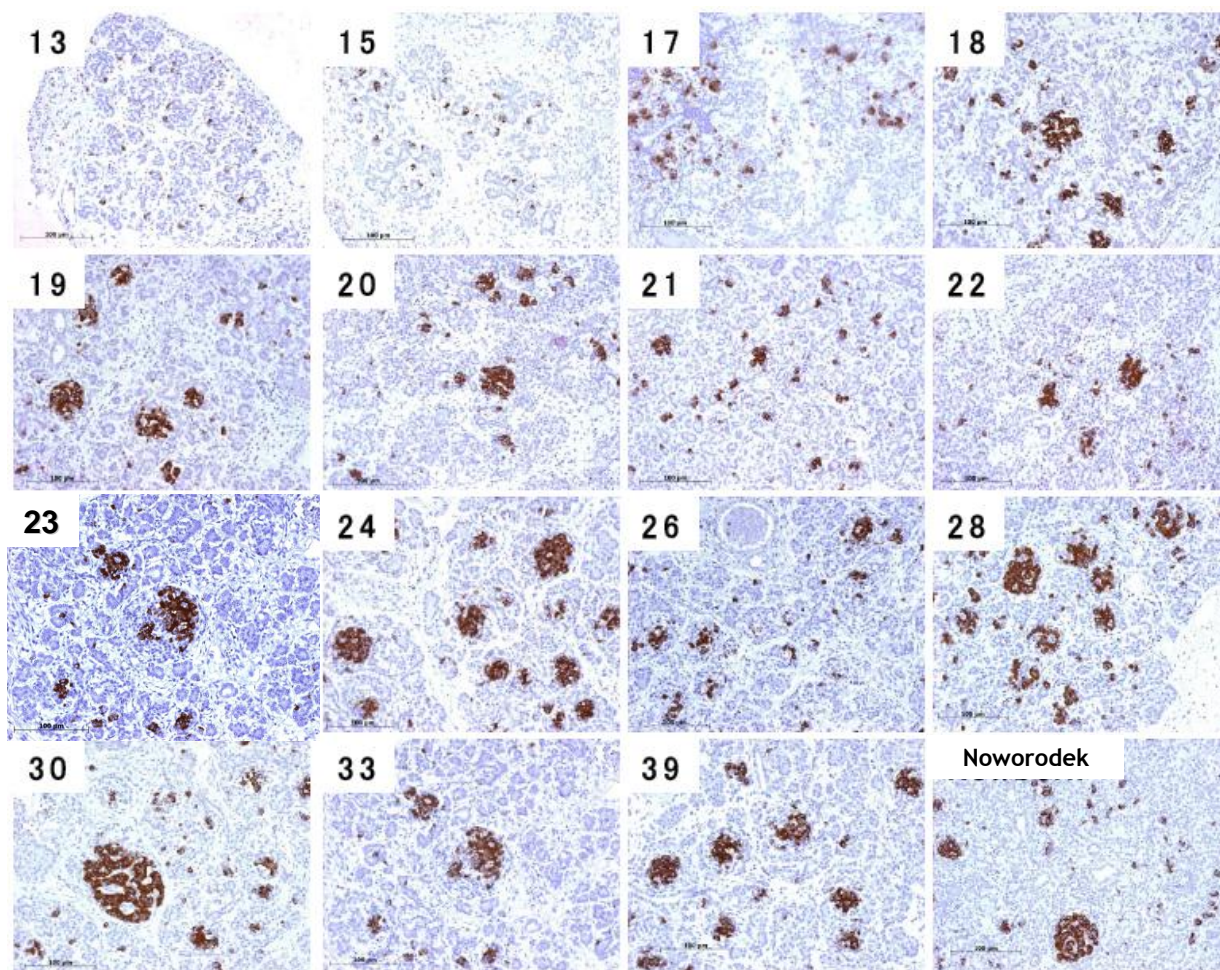


Ryc.24 Immunohistochemiczna lokalizacja komórek GLUK-ip w rozwijającej się trzustce człowieka. Okres rozwoju (tygodnie) podany jest w lewym górnym rogu poszczególnego zdjęcia. Powiększenie określone odcinkiem wynosi 100 μ m.

5.2.2.2. Identyfikacja komórek INS-ip

Komórki INS-ip widoczne są już w 13. tygodniu rozwoju, jako pojedyncze, rozrzucone chaotycznie w części egzokrynej komórki. Od 15. tygodnia obserwuje się ich tendencje do zbierania się w kilkukomórkowe, kilkunastokomórkowe grupy o charakterze

homotypowym. Od 18. tygodnia aż do okresu pourodzeniowego komórki INS-ip osiągają swą morfologiczną dojrzałość, tworząc zasadniczy element rozwijających się wysp Langerhansa. Poza zmiennym, procentowym udziałem liczby tych komórek w wyspie, ich profil immunohistochemiczny jest stały. Komórki INS-ip zlokalizowane są zazwyczaj w centrum wysp, stanowiąc większą, choć w zależności od etapu rozwoju zmienną część wyspy (Ryc.25).



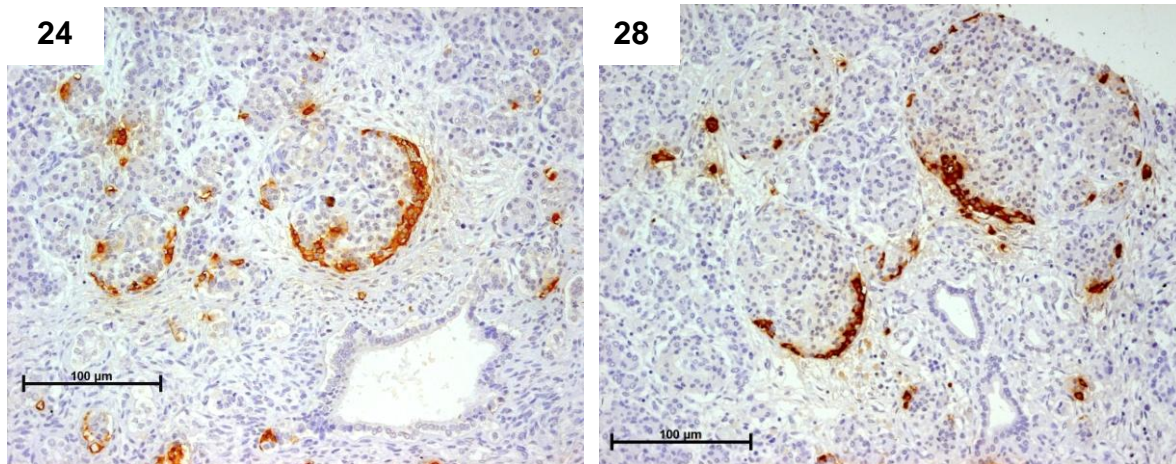
Ryc.25 Immunohistochemiczna lokalizacja komórek INS-ip w rozwijającej się trzustce człowieka. Okres rozwoju (tygodnie) podany jest w lewym górnym rogu poszczególnego zdjęcia. Powiększenie określone odcinkiem wynosi 100 μm .

5.2.2.3. Identyfikacja komórek GHREL-ip

Ze względu na obecność komórek GHREL-ip tak w obrębie wyspy, jak i w przewodach trzustkowych, analizowano immunohistochemiczny profil obecności tychże dwojako: w wyspie i poza nią. Najwięcej zmian, tak odnoszących się do liczbowego udziału komórek GHREL-ip, jak i ich specyficznego profilu immunohistochemicznego, obserwowano w obrębie wyspy, dlatego dane dotyczące analizy tej części trzustki prześledzono bardziej szczegółowo. Dodatkowo zaskakujący dynamizm zmian liczby komórek GHREL-ip w wyspie sprawił, że właśnie temu komponentowi części endokrynej poświęcono rozwiniętą w kolejnych rozdziałach, analizę ilościową.

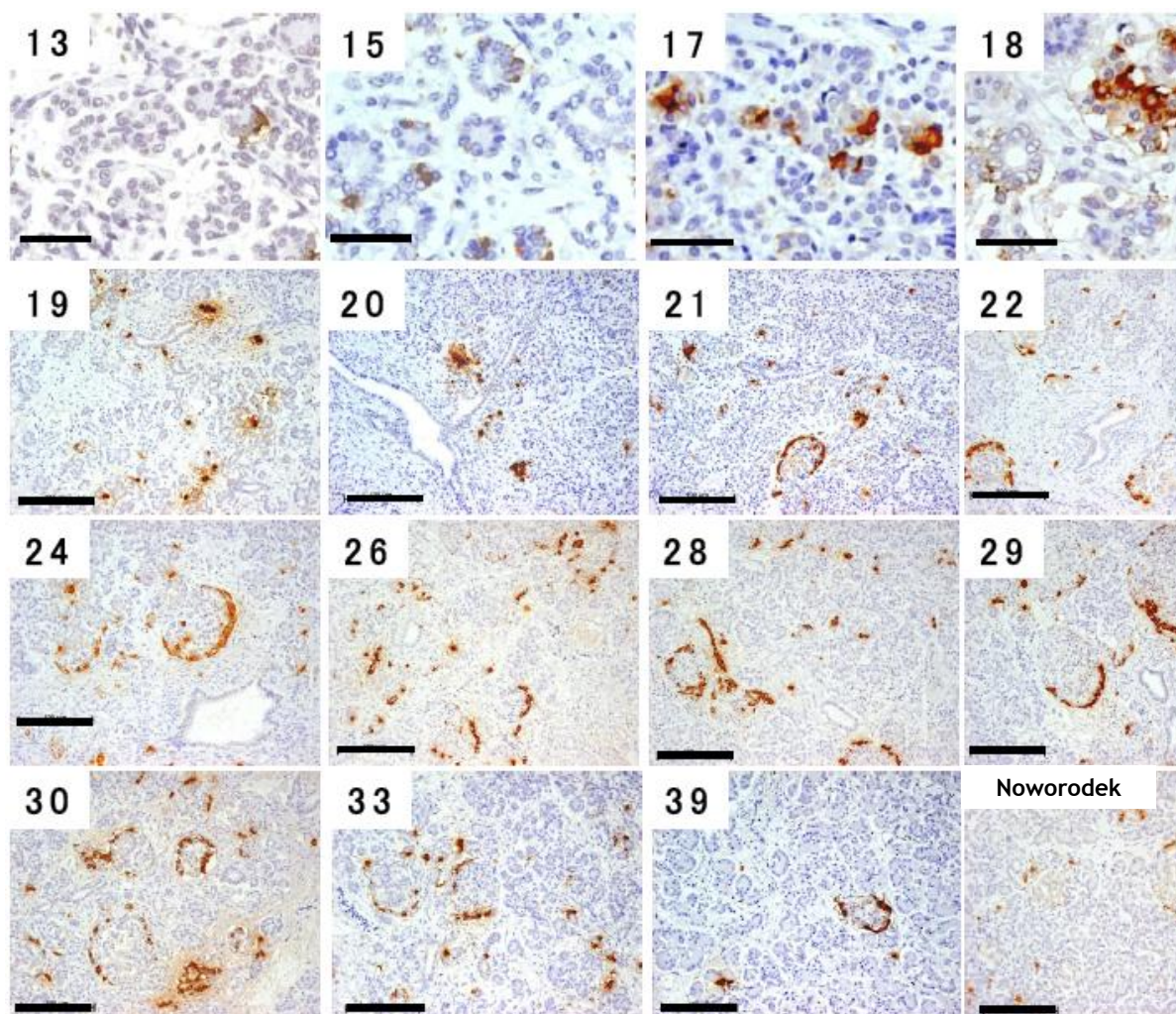
5.2.2.3.1. Komórki GHREL-ip w wyspie

Analizowano komórki GHREL-ip od 13. tygodnia rozwoju, poprzez szereg kolejnych okresów rozwoju płodowego (ostatnim etapem jest analiza trzustki w 39. tygodniu rozwoju wewnątrzmacicznego), aż do osiągnięcia pełnej dojrzałości wydzielniczej organu (trzustka człowieka dorosłego), (Ryc.27). Początkowo, pojedyncze komórki GHREL-ip (13 – 15. tydz.) grupują się w kilkunastokomórkowe (17. tydz.), kilkunastokomórkowe agregacje (18 – 20. tydz.), aby począwszy od 21. tygodnia rozwoju mogły być lokalizowane na obrzeżu wysp. Taki immunohistochemiczny profil ekspresji komórek GHREL-ip obserwuje się w kolejnych okresach rozwoju płodowego, aż do osiągnięcia pełnej dojrzałości morfologicznej trzustki. Jest on typowy i konserwatywny, choć w zależności od okresu rozwoju różny pod względem ilości komórek okalających wyspę. Charakterystyczny, a zarazem nietypowy dla komórek endokrynej części trzustki jest półksiężycowaty (crescent-like) układ komórek GHREL-ip w obrębie wyspy, obserwowany pomiędzy 21. a 39. tygodniem rozwoju (Ryc.26). U noworodka układ ten ulega rozpadowi na pojedyncze komórki, które konsekwentnie zlokalizowane są na skraju wysp. Podobnie w przypadku trzustki osoby dorosłej, komórki GHREL-ip obecne są na obrzeżu wysp, choć na tym etapie jest ich już bardzo niewiele w wyspie.



Ryc.26 Charakterystyczny „półksiężycowaty” układ komórek GHREL-ip na wybranych etapach rozwoju płodowego (wiek w tygodniach podany jest w lewym, górnym rogu każdego ze zdjęć). Powiększenie określone odcinkiem wynosi 100 µm.

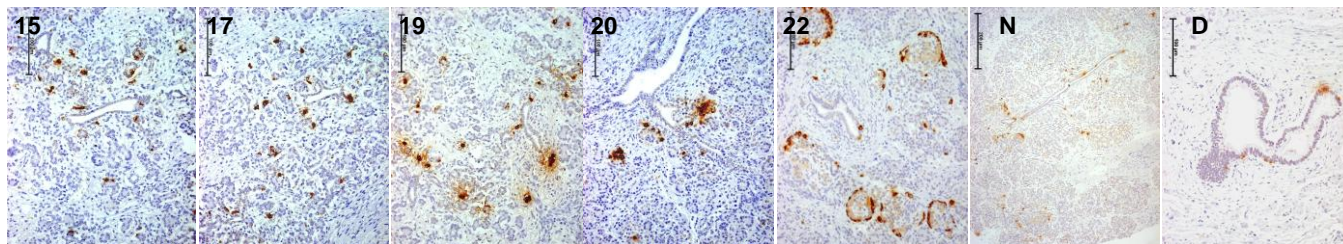
W 18. tyg. rozwoju wewnątrzmacicznego komórki GLUK-ip oraz INS-ip zlokalizowane są już w typowym dla siebie układzie w obrębie wyspy, podczas gdy komórki GHREL-ip obecne są nadal w formie pojedynczych komórek lub ich małych zgrupowań, otoczonych częścią egzokrynną. Osiągają one swoją dojrzałość morfologiczną dopiero około 21. tygodnia rozwoju wewnątrzmacicznego (Ryc.23).



Ryc.27 Immunohistochemiczna lokalizacja komórek GHREL-ip w rozwoju ludzkiej trzustki (okresy rozwoju podane są w lewym, górnym rogu poszczególnego zdjęcia). Powiększenie określone odcinkiem wynosi 25 μm dla tygodni 13-18, oraz 100 μm dla pozostałych.

5.2.2.3.2. Komórki GHREL-ip poza wyspą

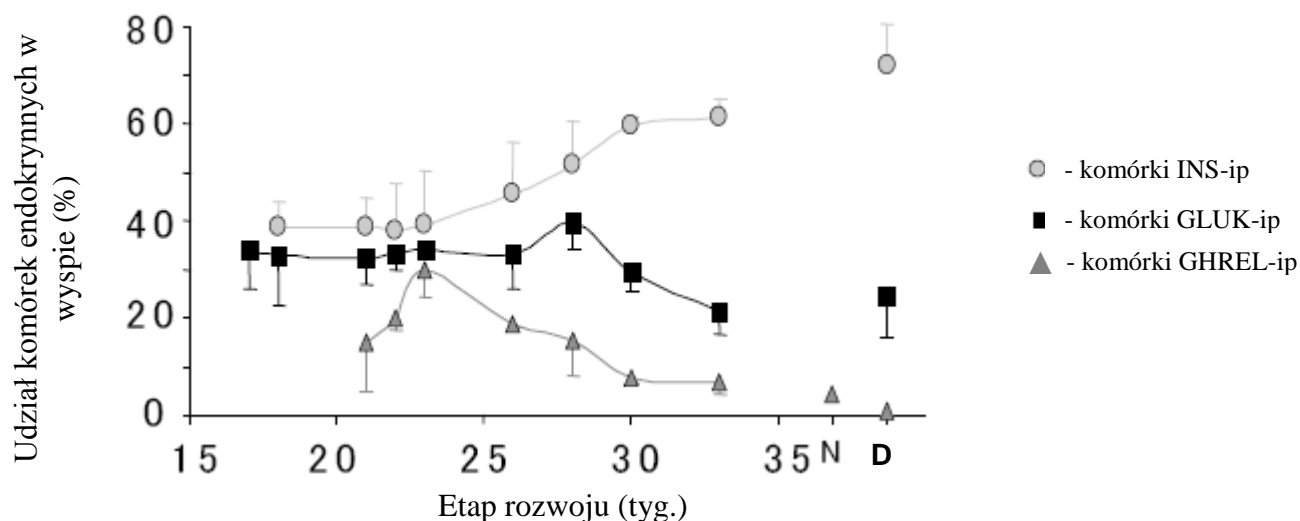
Poczynając od 13. tygodnia rozwoju wewnątrzmacicznego, poprzez kolejne stadia różnicowania się oraz ostatecznego kształtowania się części endo- i egzokrynej trzustki, komórki GHREL-ip lokalizowano również w ścianach przewodów trzustkowych (Ryc.28). Na uwagę zasługuje komórka GHREL-ip zlokalizowana w grupie komórek endokrynych wyodrębniających się z przewodu trzustkowego w procesie nowotworzenia się wyspy (z ang. „budding”) (Bonner-Weir i wsp., 2008), (Ryc.28.D).



Ryc.28 Lokalizacja komórek GHREL-ip poza wyspą podczas rozwoju wewnątrzmacicznego człowieka. Okresy rozwoju (tygodnie) opisane są w lewym, górnym rogu każdego zdjęcia, gdzie N (noworodek), D (dorosły). Powiększenie określone odcinkiem wynosi 100 μm .

5.2.3. Dynamika zmian liczby komórek endokrynych wysp trzustki

Analiza zmian liczby określonego typu komórek części endokrynej trzustki w obrębie wyspy możliwa jest dopiero po osiągnięciu przez dany typ komórek dojrzałości morfologicznej. W niniejszej rozprawie dojrzałość morfologiczną komórek endokrynych określono na moment osiągnięcia przez dany typ komórek charakterystycznej dla danej grupy lokalizacji w obrębie wyspy. Najwcześniej, bo w 17. tygodniu rozwoju dojrzałość morfologiczną osiągają komórki GLUK-ip. Kolejno, w 18. tygodniu rozwoju obserwuje się komórki INS-ip, w typowym dla nich ułożeniu w centralnej części wyspy. Komórki GHREL-ip dopiero w 21. tygodniu rozwoju osiągają dojrzałość morfologiczną (Ryc.23). Analizowano dynamikę zmian liczby poszczególnych typów komórek endokrynych w wyspach Langerhansa podczas rozwoju człowieka. Celem podkreślenia wzajemnych zależności liczbowych względem poszczególnych okresów rozwoju, wyniki kalkulacji komórek GLUK-ip, INS-ip oraz GHREL-ip przedstawione zostały na wspólnym wykresie.



Ryc.29 Frakcja objętości wysp Langerhansa zajmowana przez poszczególne typy komórek wyspy w trakcie rozwoju. Procentowe zestawienie komórek INS-ip (kółka), GLUK-ip (kwadraty) oraz GHREL-ip (trójkąty) w wyspie na poszczególnych etapach rozwoju (tygodnie), gdzie N – noworodek, D – dorosły.

5.2.3.1. Analiza liczby komórek INS-ip

Analiza liczby komórek INS-ip, wyrażonej jako procent wszystkich komórek danej wyspy, możliwa była począwszy od 18. tygodnia rozwoju, gdyż dopiero na tym etapie obserwowany jest typowy układ komórek β w obrębie wyspy. Szczegółowe obliczenia zestawione zostały w tabeli nr 9.

Procentowy udział komórek β w trzustce w trakcie rozwoju jest zmienny. Początkowo (18. tydz.) udział ten jest, jak na ten typ komórek, niski ($38,73\% \pm 5,01$) i do około 23. tygodnia zbliżony do procentowego udziału komórek α w wyspie. Pomiędzy 23. a 36. tygodniem rozwoju obserwuje się wyraźny wzrost liczby komórek INS-ip i taka tendencja wzrostowa widoczna jest już we wszystkich kolejnych okresach rozwoju. W dorosłym narządzie komórki β stanowią około $71,92\% \pm 8,65$ wyspy. Procentowy udział komórek β w wyspie osoby dorosłej zwiększył się więc niemalże dwukrotnie w odniesieniu do początkowych okresów rozwoju.

Tab.9 Procentowy udział komórek INS-ip w wyspach, na kolejnych etapach rozwoju trzustki człowieka (tygodnie) gdzie D – dorośli, n= 5-11.

Okres rozwoju	Średni udział (%)	±SEM
18 tydz.	38,73	5,01
21 tydz.	38,72	5,91
22 tydz.	37,89	9,67
23 tydz.	39,23	11,10
26 tydz.	45,68	10,44
28 tydz.	51,51	9,02
30 tydz.	59,64	1,77
33 tydz.	61,32	3,68
D	71,92	8,65

5.2.3.2. Analiza liczby komórek GLUK-ip

Analiza liczby komórek GLUK-ip, wyrażonej jako procent wszystkich komórek danej wyspy, możliwa była począwszy od 17. tygodnia rozwoju wewnątrzmacicznego, gdyż na tym etapie obserwowany jest typowy układ komórek α w obrębie wyspy. Szczegółowe obliczenia zestawione zostały w tabeli nr 10.

Tab.10 Procentowy udział komórek GLUK-ip w wyspach, na kolejnych etapach rozwoju trzustki człowieka (tygodnie) gdzie D – dorośli, n= 5-11.

Okres rozwoju	Średni udział (%)	±SEM
17 tydz.	34,19	8,17
18 tydz.	32,74	10,22
21 tydz.	32,25	5,59
22 tydz.	33,40	3,47
23 tydz.	34,14	1,95
26 tydz.	33,21	7,41
28 tydz.	39,54	5,67
30 tydz.	29,43	3,79
33 tydz.	21,15	4,47
D	24,50	8,23

Procentowy udział komórek α w wyspie jest zrównoważony w rozwoju trzustki człowieka. Komórki GLUK-ip stanowią nieco ponad 30% komórek kształtującej się wyspy. Obserwuje się to we wszystkich okresach rozwoju wewnątrzmacicznego, choć końcowe etapy charakteryzują się spadkiem procentowego udziału komórek α w wyspie ($21,15\% \pm 4,47$ w 33. tygodniu rozwoju). Wyspa Langerhansa osoby dorosłej składa się w $24,50\% \pm 8,23$ z komórek wydzielających glukagon.

5.2.3.3. Analiza liczby komórek GHREL-ip

Analiza liczby komórek GHREL-ip, wyrażonej jako procent wszystkich komórek danej wyspy, możliwa była począwszy od 21. tygodnia rozwoju, gdyż dopiero na tym etapie obserwowany jest typowy układ komórek ε w obrębie wyspy. Szczegółowe obliczenia zestawione zostały w tabeli nr 11.

Tab.11 Procentowy udział komórek GHREL-ip w wyspach, na kolejnych etapach rozwoju trzustki człowieka (tygodnie) gdzie N – noworodek, D – dorosły, n= 5-11.

Okres rozwoju	Średni udział (%)	\pm SEM
21 tydz.	14,88	10,22
22 tydz.	20,19	2,80
23 tydz.	29,94	5,79
26 tydz.	18,65	0,81
28 tydz.	15,16	6,95
30 tydz.	7,52	1,23
33 tydz.	6,85	2,41
N	4,34	1,55
D	0,74	0,53

Bardzo interesująca jest dynamika procentowego udziału komórek GHREL-ip w wyspie. Dopiero w 21. tygodniu obserwować można komórki GHREL-ip w obrębie wyspy. Do 23. tygodnia rozwoju wewnątrzmacicznego procentowy udział komórek GHREL-ip w wyspie rośnie do blisko 30% (Tab.11), będąc dwukrotnie wyższym w stosunku do początkowego etapu (21. tydzień). Warto podkreślić, że 23. tydzień rozwoju charakteryzuje

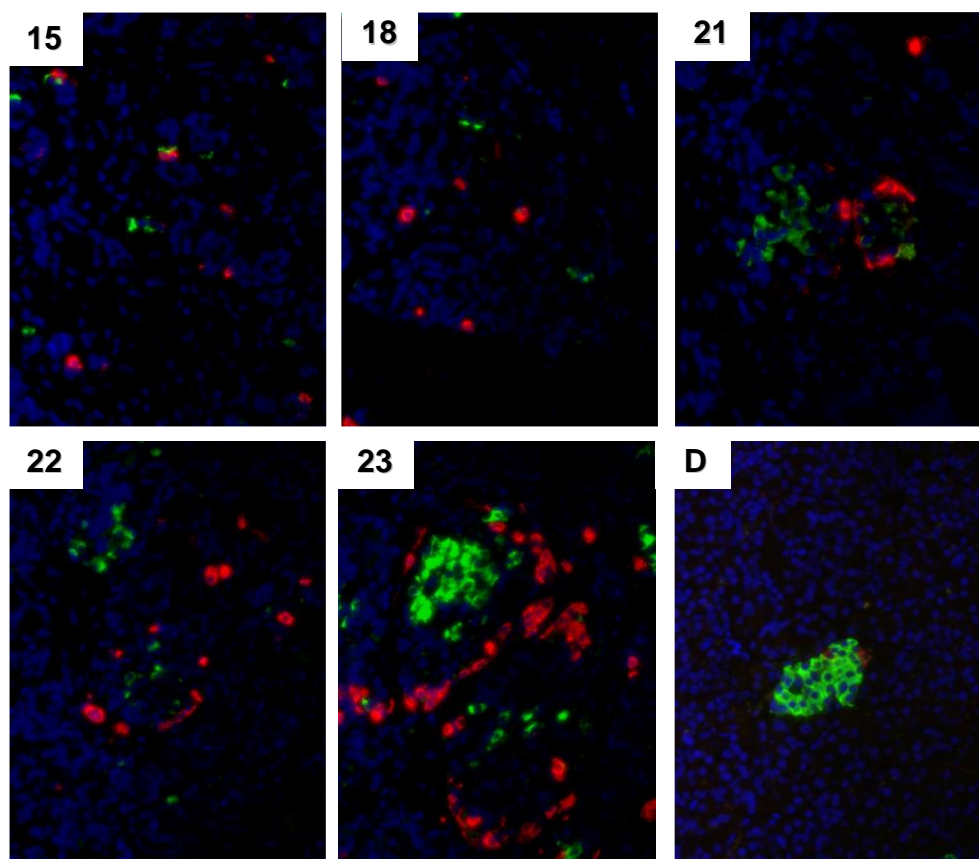
się podobnym procentowym udziałem trzech analizowanych grup komórek endokrynych: α , β i ϵ . Typowy rozkład procentowy poszczególnych typów komórek w obrębie wyspy stabilizuje się na dalszych etapach rozwoju. Już w 26. tygodniu zauważyć można istotny spadek liczby komórek GHREL-ip w wyspie ($18,65\% \pm 0,81$), udział których w 30. tygodniu jest aż dwukrotnie mniejszy w stosunku do 28. tygodnia rozwoju. U noworodka nadal obserwuje się znaczny jak dla tego typu komórek, procentowy udział w wyspie ($4,34\% \pm 1,55$), który spada do $0,74\% \pm 0,53$ w wyspach trzustki osoby dorosłej.

5.2.4. Badanie koekspresji głównych hormonów wyspy w trakcie rozwoju

W przeprowadzonych barwieniach IMF wykazano, że komórki GHREL-ip tworzą osobny typ komórek endokrynej części trzustki osoby dorosłej, jako że nie wykazano koekspresji GHREL z żadnym z czterech głównych hormonów trzustki. Podobne badania przeprowadzono na trzustkach płodów z różnych okresów rozwoju, w celu potwierdzenia hipotezy o odrębności komórek ϵ w całym okresie rozwoju osobniczego. Wyniki ko-immunofluorescencji GHREL z insuliną oraz glukagonem w zestawieniu szczegółowym, oraz GHREL z pozostałymi hormonami trzustki w opisie ogólnym w rozwoju, przeanalizowano w poniższych rozdziałach.

5.2.4.1. GHREL i insulina

Immunofluorescencyjna lokalizacja komórek INS-ip oraz GHREL-ip, przeprowadzona została na trzustkach płodów w różnych etapach ich rozwoju. W analizowanym materiale nie zaobserwowano kolokalizacji GHREL z insuliną w tym samym typie komórek wysp (Ryc.30). Już we wczesnych etapach rozwoju ontogenetycznego obecne są pojedyncze komórki INS-ip, które często zlokalizowane są w bliskim sąsiedztwie pojedynczych komórek GHREL-ip. Nie obserwowano jednak ich kolokalizacji, czyli nie znaleziono komórek, które miałyby potencjał sekrecji obu hormonów jednocześnie.

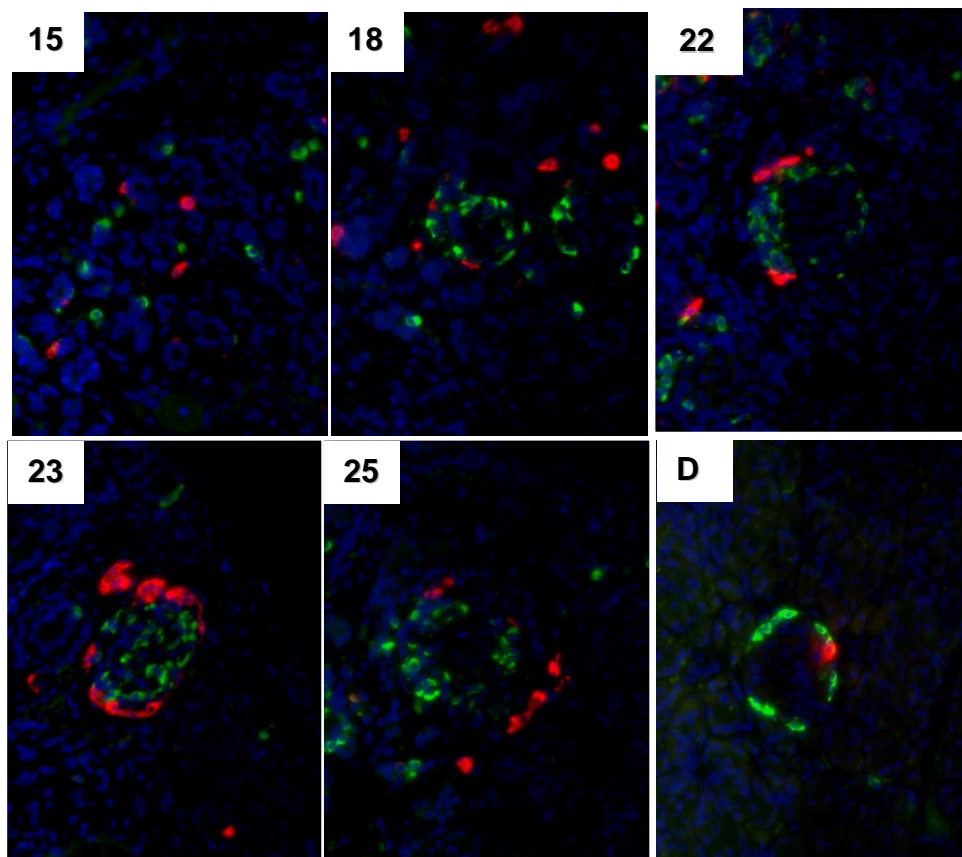


Ryc.30 Immunofluorescencyjna kolokalizacja insuliny (kolor zielony) oraz GHREL (kolor czerwony) w różnych okresach rozwoju trzustki człowieka (wskazane w lewym górnym rogu każdego zdjęcia, D – dorosły). Powiększenie obiektywu x 20.

5.2.4.2. GHREL i glukagon

Pojedyncze komórki GLUK-ip i GHREL-ip obecne są w 15. tygodniu rozwoju. Nie wykazują one jednak cech koekspresji (Ryc.31). W późniejszych etapach, komórki te często, ze względu na swoją charakterystyczną lokalizację w wyspie, sąsiadują ze sobą, jednak wyznaczają oddzielne typy komórek endokrynej części trzustki. Przez cały okres rozwoju komórki GHREL-ip wykazują tendencję do umiejscawiania się na skraju wysp, tworząc najbardziej zewnętrzną grupę komórek wyspy, wyznaczając niejako jej zakres. Od momentu osiągnięcia morfologicznej dojrzałości przez komórki GHREL-ip, wyspy zorganizowane są w ten sposób, że ich trzon tworzą komórki syntetyzujące insulinę, nieco bardziej peryferyjnie od nich leżą komórki GLUK-ip, a całość otoczona jest zwartym wieńcem komórek GHREL-ip. Dopiero w trzustce osoby dorosłej, gdzie liczba komórek GHREL-ip przypadająca na wyspę

jest bardzo niska – najbardziej zewnętrzna część wyspy współtworzona jest przez komórki α i ϵ (Ryc.31.D).

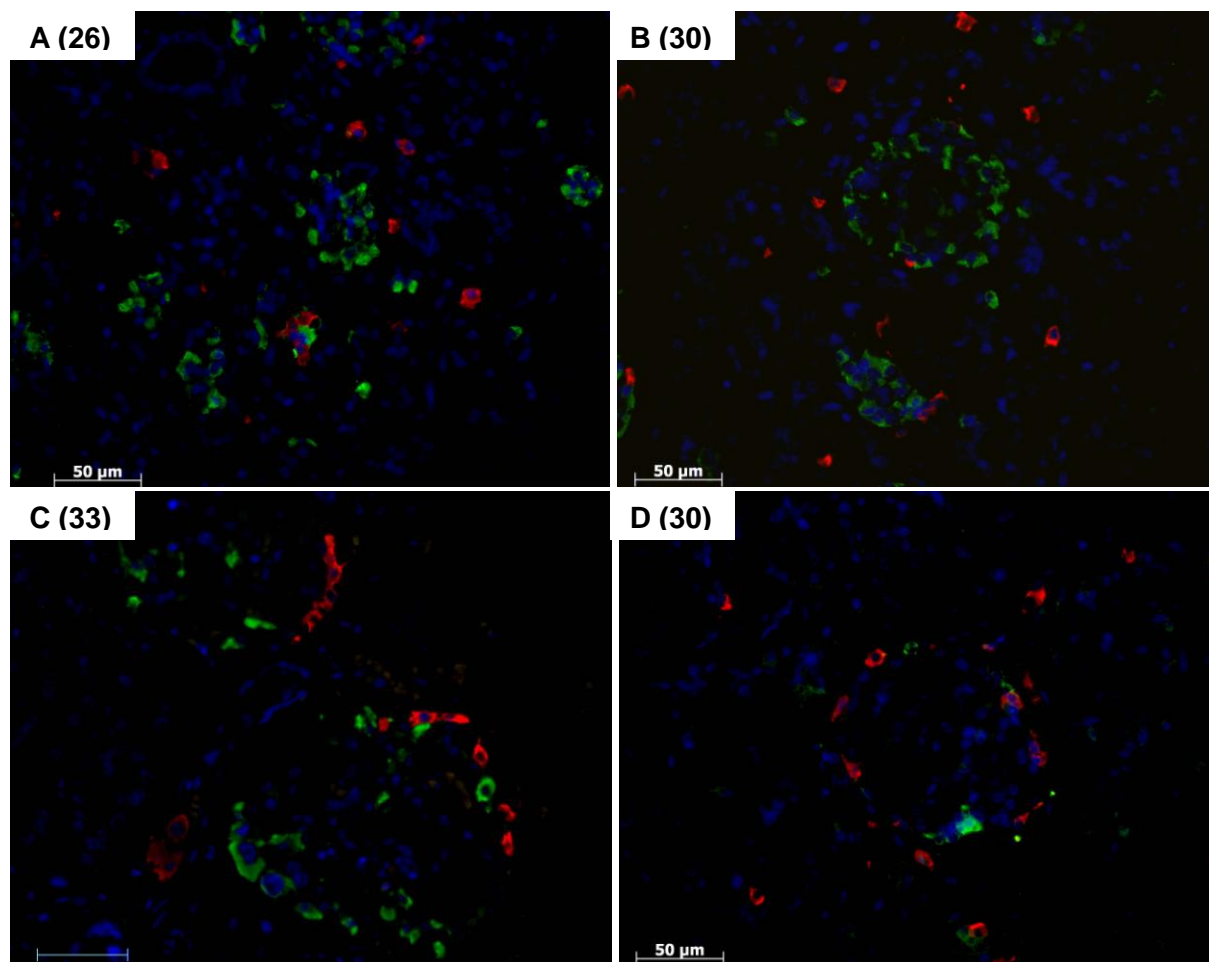


Ryc.31 Immunofluorescencyjna kolokalizacja glukagonu (kolor zielony) oraz GHREL (kolor czerwony) na różnych etapach rozwoju trzustki człowieka (wskazane w lewym górnym rogu każdego zdjęcia, D – dorosły). Powiększenie obiektywu x 20.

5.2.4.3. GHREL i pozostałe hormony trzustki

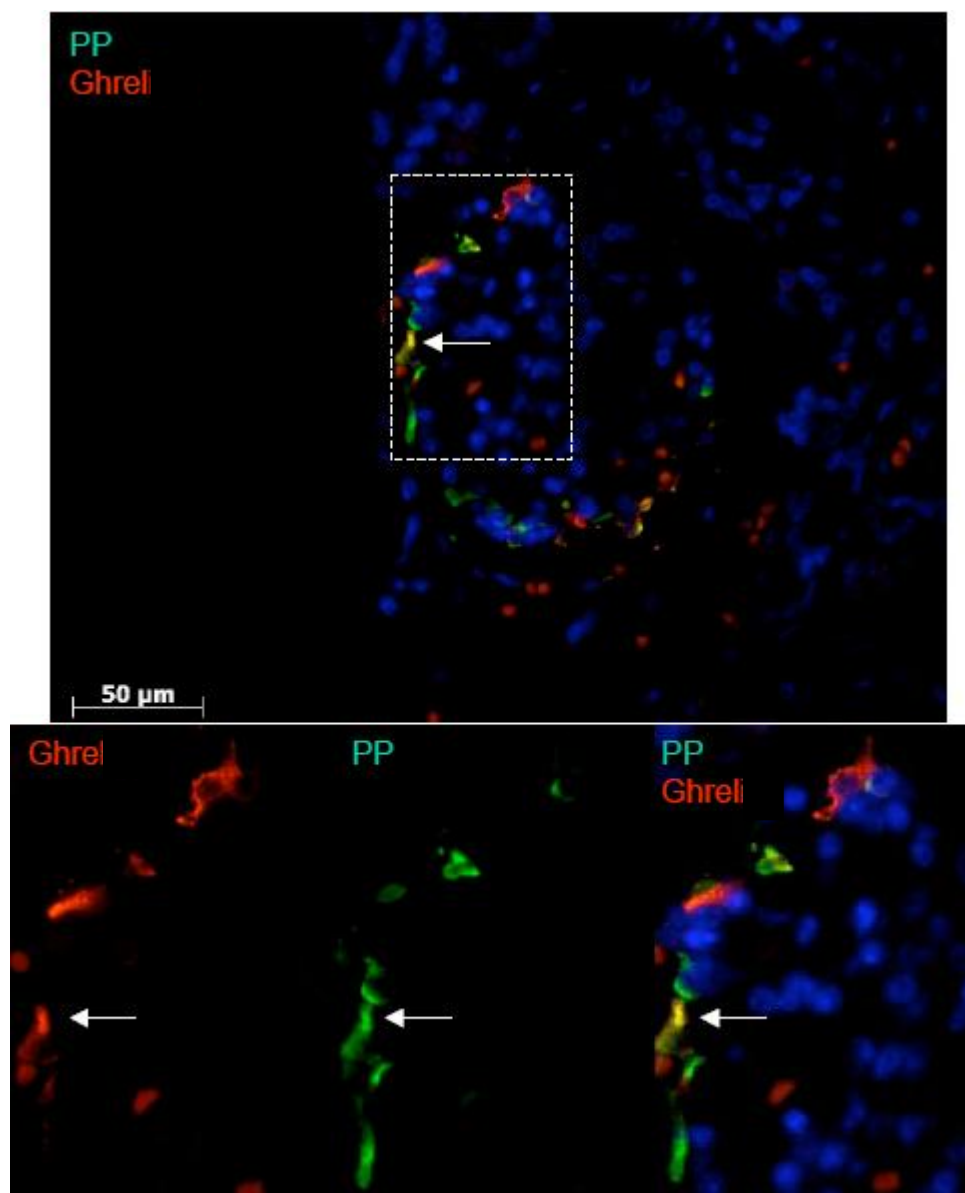
Poza najważniejszymi pod względem liczbowym komórkami endokrynnymi trzustki: α i β , wyspy od samego początku rozwoju tworzone są przez dwa pozostałe typy dobrze poznanych i opisanych komórek endokrynnych: δ i PP. W pracy skupiono się głównie na prześledzeniu ewentualnej kolokalizacji GHREL z insuliną lub glukagonem, ze względu na wcześniejsze doniesienia literaturowe, jakoby w trakcie rozwoju ludzkiej trzustki taka koekspresja zachodziła (Date i wsp., 2002; Volante i wsp., 2002). Jednak aby wnioskować o

odrębności komórek GHREL-ip, jako piątym typie komórek endokrynnej części trzustki, należało przeprowadzić dodatkowe doświadczenia mające na celu prześledzenie ewentualnej koekspresji GHREL z SST w komórkach δ , oraz PP w komórkach PP. Wyniki tych doświadczeń prezentowane są na rycinie nr 32.



Ryc.32 Immunofluorescencyjna lokalizacja komórek GHREL-ip (kolor czerwony) z SST (A, B, C – kolor zielony) i PP (D – kolor zielony) w rozwijającej się trzustce człowieka. Wiek (tygodnie) podany jest przy opisie każdego ze zdjęć. Powiększenie określone odcinkiem wynosi 50µm.

Podczas rozwoju ludzkiej trzustki nie stwierdzono komórek wykazujących koekspresję GHREL z SST. Sporadycznie obserwowano kolokalizację GHREL z PP na późniejszych etapach rozwoju (Ryc.33).

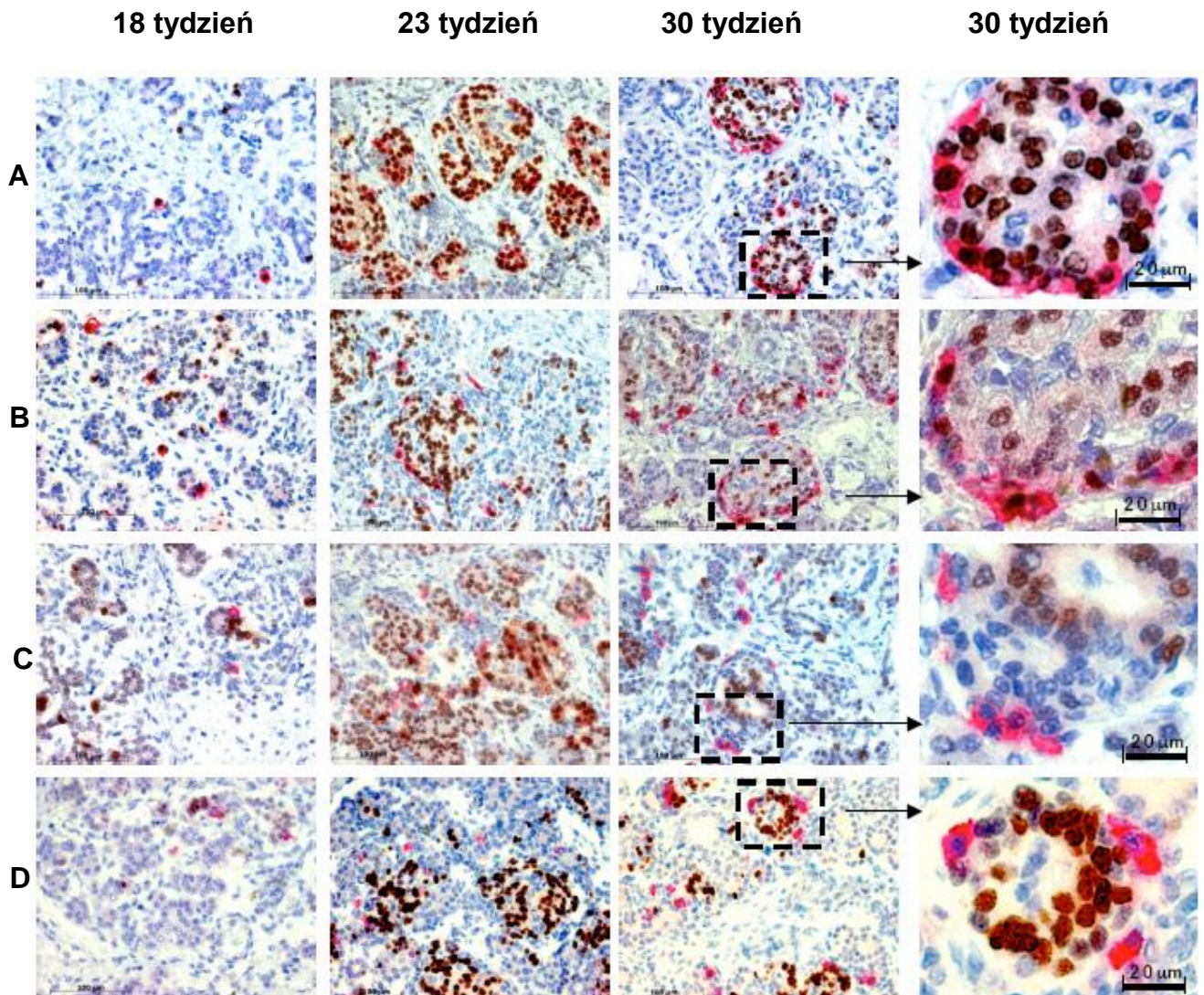


Ryc.33 Immunofluorescencyjna kolokalizacja GHREL (kolor czerwony) z PP (kolor zielony). Komórki wykazujące koekspresję GHREL z PP obserwowano bardzo sporadycznie (pojedyncza komórka wskazana jest białą strzałką). Trzustka w 30. tygodniu rozwoju. Powiększenie określone odcinkiem wynosi 50μm.

5.3. Badanie koekspresji GHREL z czynnikami transkrypcyjnymi kluczowymi w rozwoju trzustki człowieka: Isl1, Nkx2-2, Nkx6-1, Pax6

Istnieje szereg czynników transkrypcyjnych warunkujących przekształcenie się komórek pierwotnych w zdeterminowane sekrecją właściwego hormonu komórki danego typu.

Prześlędzono ewentualną koekspresję GHREL z czynnikami transkrypcyjnymi: Is11, Nkx2-2, Nkx6-1 oraz Pax6, istotnymi w rozwoju trzustki człowieka (Ryc.34).



Ryc.34 Komórki GHREL-ip (kolor czerwony) barwione podwójnie na wybrane czynniki transkrypcyjne (brązowy): Is11 (panel A), Nkx2-2 (panel B), Nkx6-1 (panel C) oraz Pax6 (panel D) na różnych etapach rozwoju trzustki człowieka (18, 23, i 30. tydzień rozwoju). Powiększenie określone odcinkiem wynosi 100 μ m, (na większych powiększeniach 20 μ m).

Tendencja koekspresji lub braku koekspresji GHREL jest stała dla danego czynnika transkrypcyjnego na wszystkich etapach rozwoju trzustki. Wykazano stałą koekspresję GHREL z czynnikami transkrypcyjnymi Is11 i Nkx2-2 oraz całkowity brak koekspresji GHREL z Nkx6-1 i Pax6.

6. DYSKUSJA

Celem niniejszej dysertacji było prześledzenie ontogenetycznych procesów determinujących różnicowanie się piątego typu komórek wysp trzustkowych, jakimi są komórki ϵ , w trzustce człowieka. Przeprowadzone badania wykazały, że komórki te charakteryzują się odmiennym profilem ekspresji genów i białek w porównaniu z komórkami α oraz β wysp trzustki. Po pierwsze, podczas rozwoju trzustki człowieka komórki ϵ wykazują istotne różnice, tak ilościowe jak i lokalizacyjne w stosunku do komórek α i β . W tym aspekcie Wierup i wsp. dowiedli już wcześniej obecności GHREL w życiu płodowym jak i w dorosłym organizmie człowieka (Wierup i wsp., 2002), jednakże badania te oparte zostały na bardzo ograniczonej liczbie analizowanych przypadków. Dodatkowo, dynamika zmian ilościowych komórek GHREL-ip w trakcie rozwoju trzustki człowieka nie została jak dotąd prześledzona.

Przeprowadzone badania wykazały, że najwięcej komórek ϵ obserwuje się w 23. tygodniu rozwoju wewnątrzmacicznego, w którym to okresie komórki GHREL-ip stanowią 30% endokrynej populacji komórek nowoformujących się wysp trzustki człowieka. U noworodka, jest ich zaledwie 5% i udział ten nadal maleje w trzustce człowieka dorosłego (poniżej 1%). Ponad czterdziestokrotny spadek procentowego udziału komórek GHREL-ip w wyspie człowieka dorosłego w stosunku do 23. tygodnia rozwoju, może świadczyć pośrednio o potencjalnej roli komórek GHREL-ip w rozwoju i kształtowaniu się w pełni funkcjonalnych wysp Langerhansa trzustki człowieka. Na uwagę zasługuje „półksiężycowate” ułożenie komórek GHREL-ip w wyspie, obserwowane od 21. tygodnia rozwoju wewnątrzmacicznego, do urodzenia. Sugerować on może zjawisko polaryzacji komórek w rozwijających się wyspach, co obserwowano już wcześniej w odniesieniu do komórek β w wyspie (Bonner-Weir, 1988). Czynnikiem limitującym badań, ujętych w niniejszej dysertacji jest ograniczona liczba badanych wysp na podstawie których oparto część statystyczną wyników. Nie można przykładowo definitywnie stwierdzić, że komórki GHREL-ip nie wykazują absolutnie żadnej koekspresji z innymi hormonami wyspy, pomimo faktu że takiej koekspresji nie zaobserwowano. Date ze współpracownikami (Date i wsp., 2002) opublikowali wyniki badań, w których wykazali kolokalizację GHREL z glukagonem w trzustce osób dorosłych, podczas gdy grupa Volante (Volante i wsp., 2002) opisała kolokalizację GHREL z insuliną w trzustce człowieka. W niniejszej dysertacji nie potwierdzono żadnej z tych obserwacji. Udowodniono natomiast na podstawie przebadanego materiału histologicznego trzusteek płodowych jak i w pełni wykształconych organów, że ekspresja GHREL zachodzi w zupełnie odrębnym typie komórek wysp Langerhansa. Brak kolokalizacji GHREL z innymi hormonami wyspy człowieka jest sprzeczny z wynikami zespołów Prado (Prado i wsp., 2004) i Hellera (Heller i wsp., 2005). Obie

grupy dowiodły istnienia komórek immunoreaktywnych dla obu hormonów: GHREL i glukagonu, na bardzo wczesnych etapach rozwoju, lecz nie w pełni wykształconym narządzie. Niestety, badania te przeprowadzono na gryzoniach, dlatego bezpośrednie ich odniesienie do rozwoju trzustki człowieka jest utrudnione, tym bardziej, że znane są istotne różnice gatunkowe w lokalizacji i charakterze komórek GHREL-ip (Jeon i wsp., 2009; Raghay i wsp., 2013). Według Polaka i wsp. (Polak i wsp., 2000), większość komórek endokrynych trzustki człowieka około 8. tygodnia rozwoju wewnątrzmacicznego ma charakter polihormonalny, podczas gdy już w 9. tygodniu rozwoju nie obserwuje się komórek o takim charakterze. Podobne obserwacje poczynili Bocian-Sobkowska i wsp. (Bocian-Sobkowska i wsp., 1999). Na podstawie badań opisanych w niniejszej dysertacji nie można wykluczyć faktu kolokalizacji GHREL z innymi hormonami aparatu wyspowego trzustki do 13-tego tygodnia rozwoju wewnątrzmacicznego.

Ważkim celem tejże pracy było prześledzenie profilu koekspresji GHREL z czynnikami transkrypcyjnymi istotnymi w różnicowaniu się poszczególnych rodzajów komórek endokrynych wyspy trzustki człowieka. Czynnikiem transkrypcyjnym Pax6, istotnym w różnicowaniu się komórek α , nie ulegał ekspresji w komórkach GHREL-ip w trakcie rozwoju. Wynik ten zgodny jest z obserwacjami Hellera i wsp. (Heller i wsp., 2005), którzy dowiedli, że u myszy różnicowanie się komórek ϵ nie jest kontrolowane przez czynnik transkrypcyjny Pax6, lecz jest przez niego antagonizowane. Te obserwacje, wraz z udokumentowanym brakiem koekspresji GHREL z glukagonem w trakcie rozwoju wysp trzustki, wskazują na odrębność tych dwóch typów komórek oraz różne szlaki transkrypcyjne determinujące ich różnicowanie się. Nie obserwowano również koekspresji GHREL z czynnikiem transkrypcyjnym Nkx6-1, podczas gdy ekspresja czynnika transkrypcyjnego Nkx2-2 zachodziła w komórkach ϵ . Potwierdzono to już wcześniej na myszach z wyciszonym genem czynnika transkrypcyjnego Nkx6-1 (Prado i wsp., 2004). W wyspach tych genetycznie zmodyfikowanych myszy nie obserwowano zmiany liczby komórek GHREL-ip w porównaniu z grupą kontrolną. Jednakże rola czynnika transkrypcyjnego Nkx2-2 wydaje się być bardziej złożona. Czynnikiem transkrypcyjnym Nkx2-2 odgrywa kluczową rolę w różnicowaniu się komórek INS-ip w rozwoju wysp trzustki. Z przedstawionych przez Prado i wsp. doświadczeń wynika, że Nkx2-2 odgrywa również istotną rolę w różnicowaniu się komórek GHREL-ip, jako że jego ablacja powoduje ewidentny wzrost liczby komórek ϵ w znokautowanych genetycznie wyspach myszy, przy czym u takich zwierząt obserwuje się zupełny brak komórek β (Prado i wsp., 2004; Chao i wsp., 2007). Wyniki te, wspólnie z obserwacjami prezentowanymi w niniejszej dysertacji o koekspresji Nkx2-2 z GHREL w wyspach człowieka w rozwoju, sugerować mogą rolę tegoż czynnika transkrypcyjnego w różnicowaniu się komórek ϵ w komórki typu β . Udokumentowano również obecność czynnika transkrypcyjnego Isl1 we wszystkich przebadanych komórkach

GHREL-ip w trakcie rozwoju. Isl1 jest czynnikiem transkrypcyjnym niezbędnym w rozwoju mezenchymy zawiązka grzbietowego trzustki, oraz różnicowaniu się nabłonka trzustki w komórki endokrynne (Habener i wsp., 2005; Ahlgren i wsp., 1997) i służył głównie jako kontrola pozytywna w opisanym układzie doświadczeń. Profil koekspresji GHREL z badanymi czynnikami transkrypcyjnymi istotnymi w różnicowaniu się poszczególnych rodzajów komórek endokrynych wyspy trzustkowej człowieka sugeruje różnicowanie się komórek INS oraz GHREL z tej samej linii komórek progenitorowych.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że po raz pierwszy oszacowano masę komórek ϵ w trzustce człowieka dorosłego (0,13 g) oraz ukazano silną, odwrotną korelację masy komórek GHREL-ip ze wskaźnikiem masy ciała BMI. Są to wstępne dane, jako że estymacja masy komórek ϵ oparta została na ograniczonej liczbie preparatów. Dodatkowo, zakres BMI dawców ujętych w statystyce był raczej wąski, jednak stosunek BMI z masą komórek ϵ odzwierciedlał odwrotną zależność BMI od stężenia GHREL w plazmie badanej grupy pacjentów, udokumentowaną wcześniej przez inne zespoły badawcze (Pumell i wsp., 2003; Monti i wsp., 2006).

Komórki GHREL-ip obecne są w trzustce człowieka poczynając od bardzo wczesnych etapów rozwoju. Trzustka nie jest jednak głównym miejscem syntezy GHREL. Funkcję tę w organizmie dorosłym spełniają przede wszystkim komórki błony śluzowej żołądka. Interesujący natomiast jest fakt, że w rozwoju relacja ilościowa komórek GHREL-ip trzustki w porównaniu z komórkami GHREL-ip żołądka jest odwrócona (Wierup i wsp., 2002). Nasza wiedza na temat funkcji GHREL w trzustce jest bardzo ograniczona, jednak hipoteza o jej parakrynej/autokrynej roli w regulacji funkcji komórek β trzustki wydaje się być bardzo istotna (Granata i wsp., 2007). W rozwoju, to właśnie trzustka stanowi główne miejsce syntezy GHREL. Wyniki prezentowane w niniejszej dysertacji zgodne są z tymi obserwacjami. Świadczyć to może o istotnej roli jaką mogą spełniać komórki GHREL-ip w rozwoju człowieka. Rozpatrywać powinno się tę kwestię jednak na dwóch poziomach. Z jednej strony rola komórek o precyzyjnie określonym profilu sekrecyjnym, z drugiej, rola hormonu przez nie wydzielanego, czyli GHREL. Niezaprzeczalnie, funkcja GHREL jako hormonu uwalniającego hormon wzrostu jest kluczowa we wzroście i rozwoju całego organizmu. Dowiedziono wcześniej, że GHREL stymuluje proliferację i różnicowanie się komórek wysp człowieka, w szczególności komórek β wysp trzustkowych (Granata i wsp., 2007). GHREL hamuje również apoptozę komórek wysp trzustki (Granata i wsp., 2007; Irako i wsp., 2006), dlatego jedną z funkcji GHREL w rozwijającym się organie może być miejscowa stymulacja wzrostu i dojrzewania komórek trzustki. Endogenna GHREL hamuje również sekrecję insuliny w wyspach (Wierup i wsp., 2004; Dezaki i wsp., 2006; Broglio i wsp., 2001; Egido i wsp., 2002; Colombo i wsp., 2003) oraz hamuje ekspresję i produkcję interleukin (Dixit i wsp., 2004) i tłumi rozwój

ostrego zapalenia trzustki (Dembinski i wsp., 2003). Można na tej podstawie spekulować, iż zmniejszona masa komórek ϵ związana z podwyższonym BMI, mogłaby być powodem podwyższonej sekrecji insuliny, jak i zwiększonego ryzyka apoptozy oraz zmian zapaleniowych komórek trzustki.

Podsumowując, w niniejszej rozprawie prześlędzono zmiany relacji ilościowych komponentu endokrynnego trzustki człowieka w trakcie rozwoju, ze szczególnym uwzględnieniem dynamiki zmian liczby komórek ϵ . W przebiegu rozwoju trzustki człowieka, w okresie życia płodowego komórki GHREL-ip cechują się znaczącą dynamiką migracyjną i proliferacyjną, co znajduje swe odbicie w zmieniającej się stopniowo ich lokalizacji oraz frakcji objętości jaką zajmują w wyspach. Udowodniono, że procentowy udział komórek GHREL-ip w wyspie wzrasta podczas rozwoju, stanowiąc blisko 30% komponenty endokrynnnej w 23. tygodniu rozwoju wewnątrzmacicznego. Wysoki udział procentowy komórek GHREL-ip w obrębie wyspy w trakcie rozwoju, przy bardzo niskim procencie obserwowanym w wyspie dorosłego sugeruje, że komórki te pełnią istotną rolę w rozwoju: samej wyspy, trzustki jak i całego organizmu. Liczba oraz lokalizacja komórek ϵ jest determinowana rozwojowo. Komórki GHREL-ip stanowią odrębną grupę komórek endokrynnnych aparatu wyspowego, tak w rozwoju jak i w organizmie dorosłym. Nie wyklucza to jednak istnienia niewielkiej subgrupy komórek GHREL-ip, które potencjalnie mogłyby mieć charakter polihormonalny. Komórki ϵ wykazywały koekspresję z czynnikami transkrypcyjnymi Nkx2-2 oraz Isl1 – istotnymi w różnicowaniu się komórek β . Taki profil koekspresji sugeruje różnicowanie się komórek INS oraz GHREL z tej samej linii komórek progenitorowych. Nie obserwowano ekspresji GHREL w komórkach wykazujących ekspresję Nkx6-1 oraz Pax6. Brak koekspresji GHREL z czynnikami transkrypcyjnymi istotnymi w różnicowaniu się komórek GLUK wysp trzustkowych człowieka sugeruje, że obie linie komórkowe odległe są od siebie genetycznie.

Dokładna rola GHREL w dojrzewaniu i reorganizacji trzustki człowieka podczas rozwoju jak i w organizmie dorosłym jest nadal niejasna, jednak uzyskane wyniki sugerują istotny wpływ komórek ϵ na biologię wysp Langerhansa trzustki, szczególnie na wczesnych etapach rozwoju.

7. WNIOSKI

1. Wyniki badań ujętych w niniejszej rozprawie wskazują, że komórki GHREL-ip są piątym typem komórek endokrynych wysp trzustkowych człowieka a kolokalizacja w nich GHREL i SYP wskazuje, że pochodzą one z neuroektodermy.
2. W przebiegu rozwoju trzustki człowieka, w okresie życia płodowego komórki GHREL-ip cechują się znaczącą dynamiką migracyjną i proliferacyjną, co znajduje swe odbicie w zmieniającej się stopniowo ich lokalizacji (w przewodach trzustkowych, w obrębie samych wysp jak i w pojedynczych komórkach zlokalizowanych wśród pozostałych elementów egzokrynowych) oraz frakcji objętości jaką zajmują w wyspach (blisko 30% komponenty endokrynej w 23. tygodniu rozwoju, przy tylko nieznacznej w trzustce dorosłego człowieka).
3. Wysoki udział procentowy komórek GHREL-ip w obrębie wyspy w trakcie rozwoju, przy bardzo niskim procencie obserwowanym w wyspie dorosłego sugeruje, że komórki te pełnią istotną rolę w rozwoju: samej wyspy, trzustki jak i całego organizmu.
4. Uzyskane wyniki wskazują, że od 13. do 24. tygodnia rozwoju płodowego powstające wyspy przechodzą z narządu homotypowego (jeden rodzaj komórek wydzielniczych) w narząd heterotypowy (5 rodzajów komórek w 23. tygodniu rozwoju), w którym następuje ustalanie się udziału ilościowego poszczególnych typów komórek endokrynych w wyspie.
5. Profil koekspresji GHREL z badanymi czynnikami transkrypcyjnymi istotnymi w różnicowaniu się poszczególnych rodzajów komórek endokrynych wyspy trzustkowej człowieka sugeruje różnicowanie się komórek INS oraz GHREL z tej samej linii komórek progenitorowych.
6. Brak koekspresji GHREL z czynnikami transkrypcyjnymi istotnymi w różnicowaniu się komórek GLUK wysp trzustkowych człowieka sugeruje, że obie linie komórkowe odległe są od siebie genetycznie.

8. STRESZCZENIE

Komórki syntetyzujące ghrelinę w wyspach trzustki w rozwoju płodowym człowieka oraz ekspresja w nich czynników transkrypcyjnych regulujących różnicowanie komórek wysp.

Cel: Podczas gdy mechanizmy specyfikacji oraz wzajemnych zależności pomiędzy czterema typami komórek endokrynnych trzustki (α , β , δ oraz PP) są dobrze poznane, tak w organizmie dorosłym jak i podczas rozwoju płodowego, mechanizm różnicowania się i funkcji piątego typu komórek aparatu wyspowego, komórek ϵ w organizmie ludzkim jest niezgłębiony. Celem prezentowanej pracy było zweryfikowanie hipotezy dotyczącej ontogenetycznej jak i morfogenetycznej odrębności komórek ϵ w stosunku do pozostałych komórek aparatu wyspowego ludzkiej trzustki.

Metody: Przeprowadzono analizę obecności komórek GHREL-ip w 24. trzustkach płodów pomiędzy 13. a 39. tygodniem rozwoju, oraz w trzustkach 32. osób dorosłych. Dodatkowo, materiał do prezentowanych badań stanowiła trzustka noworodka z autopsji.

Wyniki: Komórki GHREL-ip obserwowano od 13. tygodnia rozwoju wewnątrzmacicznego, jako pojedyncze, rozrzucone w części egzokrynniej trzustki komórki. Na późniejszych etapach rozwoju, komórki ϵ grupowały się w kilkukomórkowe agregacje, aby począwszy od 21. tygodnia rozwoju mogły być lokalizowane na obrzeżu wysp. Taki immunohistochemiczny profil ekspresji komórek GHREL-ip obserwuje się w kolejnych okresach rozwoju płodowego, aż do osiągnięcia pełnej dojrzałości morfologicznej trzustki. Jest on typowy i konserwatywny, choć w zależności od okresu rozwoju różny pod względem ilości komórek okalających wyspę. Nie obserwowano koekspresji GHREL z insuliną, glukagonem, czy STT. Sporadycznie obserwowano kolokalizację GHREL z PP na późniejszych etapach rozwoju wewnątrzmacicznego. Wykazano stałą koekspresję GHREL z czynnikami transkrypcyjnymi Isl1 i Nkx2-2 oraz całkowity brak koekspresji GHREL z Nkx6-1 i Pax6 na wszystkich etapach rozwoju trzustki. Średnio około $1,2 \pm 1,2$ komórek GHREL-ip przypada na przekrój danej wyspy w trzustce osoby dorosłej. Frakcja objętości komórek GHREL-ip w wyspach trzustki człowieka dorosłego wynosi $0,14 \pm 0,16\%$. Jako że dysponowano danymi odnośnie masy poszczególnych trzusteek (100 ± 21 g), oraz przyjmując masę właściwą trzustki równą 1,000 g-cm, obliczono całkowitą średnią masą komórek GHREL-ip ($0,13 \pm 0,15$ g). Tak płeć

jak i wiek pacjentów nie wpływały na masę komórek GHREL-ip w trzustce, natomiast bardzo wyraźna była ujemna korelacja ze wskaźnikiem masy ciała (BMI) badanych.

Wnioski: Wyniki badań ujętych w niniejszej rozprawie wskazują, że komórki GHREL-ip są piątym typem komórek endokrynych wysp trzustkowych człowieka a kolokalizacja w nich GHREL i SYP wskazuje, że pochodzą one z neuroektodermy. Profil koekspresji GHREL z badanymi czynnikami transkrypcyjnymi istotnymi w różnicowaniu się poszczególnych rodzajów komórek endokrynych wyspy trzustkowej człowieka sugeruje różnicowanie się komórek INS oraz GHREL z tej samej linii komórek progenitorowych. Wysoki udział procentowy komórek GHREL-ip w obrębie wyspy w trakcie rozwoju, przy bardzo niskim procencie obserwowanym w wyspie dorosłego sugeruje, że komórki te pełnią istotną rolę w rozwoju: samej wyspy, trzustki jak i całego organizmu.

Key words: Koekspresja, Rozwój, Komórki endokryne, Trzustka płodowa, Ghrelina, Insulina, Czynniki transkrypcyjne.

9. SUMMARY

Ghrelin-producing cells in pancreatic islets and the expression of transcriptional factors crucial for islet cell differentiation during human pancreas development.

Aims/hypothesis: While the mechanisms of specification and the reciprocal relationships of the four types of endocrine cell (alpha, beta, delta and pancreatic polypeptide cells) within the human endocrine pancreas are well described in adults and during fetal development, ghrelin-immunoreactive cells (epsilon cells) remain poorly understood.

Methods: We studied epsilon cells in 24 human fetal pancreases between 13 and 39 weeks of development and in 32 pancreases from adult organ donors.

Results: We observed single epsilon cells scattered in primitive exocrine tissue from gestational week 13 in developing pancreas. Later in the developmental process, epsilon cells started to aggregate into clusters. From gestational week 21, epsilon cells were located around developing islets, forming an almost continuous layer at the peripheral rim of the islets. They remain localized on the mantle of the islets, although at different amounts, in the adult pancreas. Coproduction of ghrelin with insulin, glucagon or somatostatin was not detected during fetal development. Co-production with pancreatic polypeptide was evident sporadically. Epsilon cells co-produced Nkx2-2 and Isl1, but not Nkx6-1 or Pax6. A quantitative analysis was performed in the adult pancreas: there was an average of $1,2 \pm 1,2$ epsilon cells per islet, the relative epsilon cell volume was $0,14 \pm 0,16\%$ and the epsilon cell mass was 0.13 ± 0.15 g. Neither sex nor age affected the epsilon cell mass, although there was a significant inverse correlation with BMI.

For the first time, we estimated the epsilon cell mass in human adult pancreas (about 0,13 g) and showed a significant inverse correlation of epsilon cell mass with BMI. The estimate is based upon relative volume calculations in a small portion of pancreas and should therefore be considered preliminary.

Conclusions/interpretation: We investigated the endocrine mass during human pancreas development, with a special emphasis on the dynamics of changes in epsilon cells. We were able to show that large numbers of epsilon cells are present in human pancreas during fetal life and that the number and

localisation of these cells is developmentally regulated. Epsilon cells were monohormonal and co-produced Nkx2-2 and Isl1, but not Nkx6-1 and Pax6. This indicates that alpha and epsilon cells represent distinct endocrine cell types subjected to different regulatory signals and that epsilon and beta cells may share a common precursor, different then for alpha cells.

The exact role of ghrelin in endocrine pancreas maturation during fetal life and in pancreas reorganisation in adulthood is still unknown, but results obtained in our study suggest a significant impact of epsilon cells in early islet biology.

Keywords: Co-expression, Development, Endocrine, Fetal pancreas, Ghrelin, Insulin, Transcription factors.

10. PIŚMIENNICTWO

1. Afelik S, Chen Y, Pieler T. Pancreatic protein disulfide isomerase (XPDIp) is an early marker for the exocrine lineage of the developing pancreas in *Xenopus laevis* embryos. *Gene Expr. Patterns* 4, 71–76, 2004.
2. Ahlgren U, Jonsson J, Edlund H. The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice. *Development* 122, 1409–1416, 1996.
3. Ahlgren U, Pfaff SL, Jessell TM, Edlund T, Edlund H. Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature*. 385(6613):257-60, 1997.
4. Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature Reviews Cancer* 2, 897-909, 2002.
5. Ber I, Shternhall K, Perl S, Ohanuna Z, Goldberg I, Barshack I, Benvenisti-Zarum L, Meivar-Levy I, Ferber S. Functional, persistent, and extended liver to pancreas transdifferentiation. *J. Biol. Chem.* 278, 31950–31957, 2003.
6. Black D, Lyman S, Heider TR, Behrns KE. Molecular and cellular features of hepatic regeneration. *J. Surg. Res.* 117, 306–315, 2004.
7. Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L, Wobus AM. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 998–1003, 2003.
8. Bocian-Sobkowska J, Zabel M, Wozniak W, Surdyk-Zasada J. Polyhormonal aspect of the endocrine cells of the human fetal pancreas. *Histochem Cell Biol.* 112:147–153, 1999.
9. Bonal C, Herrera PL. Genes controlling pancreas ontogeny. *Int J Dev Biol.* 52:823–835, 2008.
10. Bonner-Weir S. Morphological evidence for pancreatic polarity of beta-cell within islets of Langerhans. *Diabetes* 37(5):616-21, 1988.
11. Bonner-Weir S, Sharma A. Pancreatic stem cells. *J. Pathol.* 197, 519–526, 2002.
12. Bonner-Weir S, Inada A, Yatoh S, Li WC, Aye T, Toschi E, Sharma A. Transdifferentiation of pancreatic ductal cells to endocrine beta-cells. *Biochem Soc Trans.* 36:353-6, 2008.
13. Bowers CY, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Chang K, Momany F. A study of the regulation of GH release from the pituitary of rats, in vitro. *Endocrinology* 108:1071–1079, 1981.

14. Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, Powers AC. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem.* 53:1087-1097, 2005.
15. Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, van der Lely AJ, Deghenghi R, Ghigo E. Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 86: 5083–5086, 2001.
16. Broglio F, Gottero C, Benso A, Prodam F, Casanueva FF, Dieguez C, van der Lely AJ, Deghenghi R, Arvat E, Ghigo E. Acetylcholine does not play a major role in mediating the endocrine responses to ghrelin, a natural ligand of the GH secretagogue receptor, in humans. *Clin Endocrinol (Oxf).* 58(1):92-8, 2003.
17. Bunt JC, Salbe AD, Tschop MH, DelParigi A, Daychild P, Tataranni PA. Cross-sectional and prospective relationships of fasting plasma ghrelin concentrations with anthropometric measures in Pima Indian children. *J Clin Endocrinol Metab.* 88: 3756–3761, 2003.
18. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2334-2339, 2006.
19. Caminos JE, Tena-Sempere M, Gaytan F. Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology* 144, 1594-1602, 2003.
20. Cerf ME, Muller CJ, Du Toit DF, Louw J, Wolfe-Coote SA. Transcription factors, pancreatic development, and β -cell maintenance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326, 699–702, 2005.
21. Chao CS, Loomis ZL, Lee JE, Sussel L. Genetic identification of a novel NeuroD1 function in the early differentiation of islet α , PP and ϵ -cells. *Dev Biol.* 312:523–532, 2007.
22. Chejfec G, Falkmer S, Grimelius L, Jacobsson B, Rodensjö M, Wiedenmann B. Synaptophysin. A new marker for pancreatic neuroendocrine tumors. *Am J Surg Pathol.* 11:241-7, 1987.
23. Colombo M, Gregersen S, Xiao J, Hermansen K. Effects of ghrelin and other neuropeptides (CART, MCH, orexin A and B, and GLP-1) on the release of insulin from isolated rat islets. *Pancreas* 27:161–166, 2003.
24. Cortelazzi D, Cappiello V, Morpurgo PS, Ronzoni S, Nobile De Santis MS, Cetin I, Beck-Peccoz P, Spada A: Circulating levels of ghrelin in human fetuses. *Eur J Endocrinol.* 149: 111–116, 2003.

25. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50: 1714–1719, 2001.
26. Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, Purnell JQ. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med.* 346: 1623–1630, 2002.
27. Cummings DE, Frayo RS, Marmonier C, Aubert R, Chapelot D. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 287: E297–E304, 2004.
28. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T. Ghrelin, a novel growth hormone releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141:4255–4261, 2000.
29. Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Arima T, Matsuo H, Yada T, Matsukura S. Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 51:124-129, 2002.
30. Dembinski A, Warzecha Z, Ceranowicz P. Ghrelin attenuates the development of acute pancreatitis in rat. *J Physiol Pharmacol.* 54:561–573, 2003.
31. Dezaki K, Sone H, Koizumi M. Blockade of pancreatic islet-derived ghrelin enhances insulin secretion to prevent high-fat diet-induced glucose intolerance. *Diabetes* 55:3486–3493, 2006.
32. Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest.* 114: 57–66, 2004.
33. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. Adult pancreatic β -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature (London)* 429, 41–46, 2004.
34. Doublet PM, Benson CB, Nadel AS. Improved birth weight table for neonates developed from gestations dated by early ultrasonography. *Journal of Ultrasound Medicine* 16:241, 1997.
35. Edlund H. Transcribing pancreas. *Diabetes* 47:1817–1823, 1998.
36. Edlund H. Pancreas: how to get there from the gut? *Curr Opin Cell Biol.* 11:663–668, 1999.
37. Edlund H. Developmental biology of the pancreas. *Diabetes* 50(1):S5-9, 2001.
38. Edlund H. Pancreatic organogenesis – developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat. Rev. Genet.* 3, 524–532, 2002.

39. Egido EM, Rodriguez-Gallardo J, Silvestre RA, Marco J. Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion. *Eur J Endocrinol.* 146:241–244, 2002.
40. El-Salhy M, Falkmer S, Kramer KJ, Speirs RD. Immunohistochemical investigations of neuropeptides in the brain, corpora cardiaca, and corpora allata of an adult lepidopteran insect, *Manduca sexta* (L). *Cell Tissue Res.* 232, 295–317, 1983.
41. El-Salhy M. Immunocytochemical investigation of the gastro-entero-pancreatic (GEP) neurohormonal peptides in the pancreas and gastrointestinal tract of the dogfish *Squalus acanthias*. *Histochemistry* 80, 193–205, 1984.
42. Falkmer S. Phylogeny and ontogeny of the neuroendocrine cells of the gastrointestinal tract. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 22, 731–752, 1993.
43. Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I, Barshack I, Seijffers R, Kopolovic J, Kaiser N, Karasik A. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat. Med.* 6, 568–572, 2000.
44. Field HA, Dong PD, Beis D, Stainier DY. Formation of the digestive system in zebrafish. II. Pancreas morphogenesis. *Dev. Biol.* 261, 197–208, 2003.
45. Fuji S. Development of pancreatic endocrine cells in the rat fetus. *Archivum Histologicum Japonicum* 42:467–479, 1979.
46. Gaytan F, Barreiro ML, Chopin LK. Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 879-887, 2003.
47. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 2988–2991, 2002.
48. Granata R, Settanni F, Biancone L, Trovato L, Nano R, Bertuzzi F, Destefanis S, Annunziata M, Martinetti M, Catapano F, Ghè C, Isgaard J, Papotti M, Ghigo E, Muccioli G. Acylated and unacylated ghrelin promote proliferation and inhibit apoptosis of pancreatic beta-cells and human islets: involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, extracellular signal-regulated kinase 1/2, and phosphatidyl inositol 3-Kinase/Akt signaling. *Endocrinology* 148(2): 512-529, 2007.
49. Gualillo O, Caminos J, Blanco M. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 142, 788-794, 2001.

50. Gualillo O, Lago F, Gomez-Reino J, Casanueva FF, Dieguez C. Ghrelin, a widespread hormone: insights into molecular and cellular regulation of its expression and mechanism of action. *FEBS Lett.* 552:105–9, 2003.
51. Guz Y, Montminy MR, Stein R, Leonard J, Gamer LW, Wright CV, Teitelman G. Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in β -cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development* 121, 11–18, 1995.
52. Habener JF, Kemp DM, Thomas MK. Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology* 146, 1025–1034, 2005.
53. Hashimoto T, Kawano H, Daikoku S, Shima K, Taniguchi h, Baba S. Transient coappearance of glucagon and insulin in the progenitor cells of the rat pancreatic islets. *Anatomy and Embryology* 178:489–497, 1988.
54. Hattori N, Saito T, Yagyu T. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 4284–4291, 2001.
55. Heller RS, Jenny M, Collombat P, Mansouri A, Tomasetto C, Madsen OD, Mellitzer G, Gradwohl G, Serup P. Genetic determinants of pancreatic epsilon-cell development. *Dev Biol* 28, 217–224, 2005.
56. Holland AM, Gonez LJ, Harrison LC. Progenitor cells in the adult pancreas. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 20, 13–27, 2004.
57. Horb ME, Shen CN, Tosh D, Slack JM. Experimental conversion of liver to pancreas. *Curr. Biol.* 13, 105–115, 2003.
58. Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, Heit JJ, Cahoy JD, Kim SK. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16105–16110, 2002.
59. Howard AD, Feighner SD, Cully DF. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273:974–977, 1996.
60. Irako T, Akamizu T, Hosoda H. Ghrelin prevents development of diabetes at adult age in streptozotocin-treated newborn rats. *Diabetologia* 49:1264–1273, 2006.
61. Jensen J. Gene regulatory factors in pancreatic development. *Dev. Dyn.* 229, 176–200, 2004.
62. Jensen JN, Cameron E, Garay MV, Starkey TW, Gianani R, Jensen J. Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration. *Gastroenterology* 128, 728–741, 2005.

63. Jeon J, Correa-Medina M, Ricordi C, Edlund H, Diez JA. Endocrine Cell Clustering During Human Pancreas Development. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 57(9): 811–824, 2009.
64. Kahan BW, Jacobson LM, Hullett DA, Ochoada JM, Oberley TD, Lang KM, Odorico JS. Pancreatic precursors and differentiated islet cell types from murine embryonic stem cells: an in vitro model to study islet differentiation. *Diabetes* 52, 2016–2024, 2003.
65. Kalina M, Lukinius A, Grimelius L, Höög A, Falkmer S. Ultrastructural localization of synaptophysin to the secretory granules of normal glucagon and insulin cells in human islets of Langerhans. *Ultrastructural pathology* 15 (3):215-9, 1991.
66. Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, MacDonald RJ, Wright CV. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat. Genet.* 32, 128–134, 2002.
67. Kelly OG, Melton DA. Development of the pancreas in *Xenopus laevis*. *Dev. Dyn.* 218, 615–627, 2000.
68. Kimball C, Murlin J. Aqueous extracts of pancreas III. Some precipitation reactions of insulin. *J Biol Chem.* 58: 337-348, 1923. Retrieved September 16, 2007.
69. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone realising acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656–660, 1999.
70. Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Younan P, Imaeda H, Maeda M, Chan L. NeuroD-betacellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. *Nat. Med.* 9, 596–603, 2003.
71. Korbonits M, Little JA, Fosrling ML, Tringali G, Costa A, Navarra P. The effect of growth hormone secretagogues and neuropeptide Y on hypothalamic explants. *J. Neuroendocrinol.* 11: 521–528, 1999.
72. Korbonits M, Bustin SA, Kojima M. The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 881-887, 2001.
73. Korbonits M, Grossman AB. Ghrelin: update on a novel hormonal system. *European Journal of Endocrinology* 151:67–70, 2004a.
74. Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M, Grossman AB. Ghrelin-a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol.* 25(1):27-68, 2004b.
75. Kozakowski J, Dudek P, Zgliczyński S. U mężczyzn stężenie greliny jest niższe niż u kobiet i obniża się z wiekiem i spadkiem stężenia testosteronu. *Endokr. Pol.* 55, 414-420, 2004.

76. Krapp A, Knofler M, Frutiger S, Hughes GJ, Hagenbuchle O, Wellauer PK. The p48 DNA-binding subunit of transcription factor PTF1 is a new exocrine pancreas specific basic helix-loop-helix protein. *EMBO J.* 15, 4317–4329, 1996.
77. Krapp A, Knofler M, Ledermann B, Burki K, Berney C, Zoerkler N, Hagenbuchle O, Wellauer PK. The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev.* 12, 3752–3763, 1998.
78. Lee BC, Hendricks JD, Bailey GS. Metaplastic pancreatic cells in liver tumors induced by diethylnitrosamine. *Exp. Mol. Pathol.* 50, 104–113, 1989.
79. Lee HM, Wang G, Englander E, Kojima M, Greeley G Jr. Ghrelin, A New Gastrointestinal Endocrine Peptide that Stimulates Insulin Secretion: Enteric Distribution, Ontogeny, Influence of Endocrine, and Dietary Manipulations. *Endocrinology* 143(1):185–190, 2002.
80. Lely van der AJ, Tschop M, Heiman ML. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr. Rev.* 25, 426-457, 2004.
81. Lin JW, Biankin AV, Horb ME, Ghosh B, Prasad NB, Yee NS, Pack MA, Leach SD. Differential requirement for *ptf1a* in endocrine and exocrine lineages of developing zebrafish pancreas. *Dev. Biol.* 274, 491–503, 2004.
82. Lu S, Guan JL, Wang QP. Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci. Lett.* 321, 157-160, 2002.
83. Lucini C, Castaldo L, Lai O, De Vico G. Ontogeny, postnatal development pancreas in *Bubalus bubalis*, *J. Anat.* 192: 417-424, 1988.
84. Lukinius A, Ericsson JL, Grimelius L, Korsgren O. Ultrastructural studies of the ontogeny of fetal human and porcine endocrine pancreas, with special reference to colocalization of the four major islet hormones. *Developmental Biology* 153:376–385, 1992.
85. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science (Washington, D.C.)* 292, 1389–1394, 2001.
86. Maake C, Hanke W, Reinecke M. An immunohistochemical and morphometric analysis of insulin, insulin-like growth factor I, glucagon, somatostatin, and PP in the development of the gastro-entero-pancreatic system of *Xenopus laevis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 110, 182–195, 1998.
87. Matveyenko AV, Butler PC. Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) Transgenic Rodents as Models for Type 2 Diabetes, *ILAR Journal*, Volume 47, Number 3 2006.
88. Means AL, Meszoely IM, Suzuki K, Miyamoto Y, Rustgi AK, Coffey Jr. RJ, Wright CV, Stoffers DA, Leach SD. Pancreatic epithelial plasticity mediated by acinar cell

- transdifferentiation and generation of nestin-positive intermediates. *Development* 132, 3767–3776, 2005.
89. Misra M, Miller KK, Herzog DB, Ramaswamy K, Aggarwal A, Almazan C, Neubauer G, Breu J, Klibanski A. Growth hormone and ghrelin responses to an oral glucose load in adolescent girls with anorexia nervosa and controls. *J Clin Endocrinol Metab.* 89: 1605–1612, 2004.
90. Miyazaki S, Yamato E, Miyazaki J. Regulated expression of pdx-1 promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells. *Diabetes* 53, 1030–1037, 2004.
91. Monti V, Carlson JJ, Hunt SC, Adams TD. Relationship of ghrelin and leptin hormones with body mass index and waist circumference in a random sample of adults. *J Am Diet Assoc.* 106:822–828, 2006.
92. Mori K, Yoshimoto A, Takaya K. Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett.* 486, 213-216, 2000.
93. Muccioli M, Tschop M, Papotti M, Deghenghi MH, Ghigo E. Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J Pharmacol.* 440:235–254, 2002.
94. Murray I. The search for insulin. *Scot.Med. J.* 14: 286-293, 1969.
95. Murtaugh LC, Melton DA. Genes, signals, and lineages in pancreas development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 71–89, 2003.
96. Oliver-Krasinski JM, Stoffers DA. On the origin of the beta cell. *Genes Dev.* 22:1998–2021, 2008.
97. Ostberg Y, Van Noorden SV, Pearse AG. Cytochemical, immunofluorescence, and ultrastructural investigations on polypeptide hormone localization in the islet parenchyma and bile duct mucosa of a cyclostome, *Myxine glutinosa*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 25, 274–291, 1975.
98. Ostberg Y, Van Noorden S, Pearse AG, Thomas NW. Cytochemical, immunofluorescence, and ultrastructural investigations on polypeptide hormone containing cells in the intestinal mucosa of a cyclostome, *Myxine glutinosa*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 28, 213–227, 1976.
99. Peng Z, Xiaolei Z, Al-Sanaban H, Chengrui X, Shengyi Y. Ghrelin inhibits insulin release by regulating the expression of inwardly rectifying potassium channel 6.2 in islets. *Am J Med Sci.* 343(3):215-9, 2012.
100. Pictet RL, Clark WR, Williams RH, Rutter WJ. An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Dev. Biol.* 29, 436–467, 1972.

101. Pin CL, Rukstalis JM, Johnson C, Konieczny SF. The bHLH transcription factor Mist1 is required to maintain exocrine pancreas cell organization and acinar cell identity, *J. Cell Biol.* 155: 519-530, 2001.
102. Polak M, Bouchareb-Banaei L, Scharfmann R, Czernichow P. Early pattern of differentiation in the human pancreas. *Diabetes* 49:225-232, 2000.
103. Popovic V, Miljic D, Micic S. Ghrelin main action on the regulation of growth hormone release is exerted at hypothalamic level. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 3450-3453, 2003.
104. Prado CL, Pugh-Bernard AE, Elghazi L, Sosa-Pineda B, Sussel L. Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2924-2929, 2004.
105. Purnell JQ, Weigle DS, Breen P, Cummings DE. Ghrelin levels correlate with insulin levels, insulin resistance, and highdensity lipoprotein cholesterol, but not with gender, menopausal status, or cortisol levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 88:5747–5752, 2003.
106. Qader SS, Håkanson R, Rehfeld JF, Lundquist I, Salehi A. Proghrelin-derived peptides influence the secretion of insulin, glucagon, pancreatic polypeptide and somatostatin: a study on isolated islets from mouse and rat pancreas. *Regul Pept.* 7;146(1-3):230-7, 2008.
107. Raghay K, Gallego R, Scoazec JY, Garcia-Caballero T, More G. Different ghrelin localisation in adult human and rat endocrine pancreas. *Cell Tissue Res.* DOI 10.1007/s00441-013-1593-y
108. Rajagopal J, Anderson WJ, Kume S, Martinez OI, Melton DA. Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. *Science (Washington, D.C.)* 299, 363, 2003.
109. Rao MS, Scarpelli DG, Reddy JK. Transdifferentiated hepatocytes in rat pancreas. *Curr. Top. Dev. Biol.* 20, 63–78, 1986.
110. Reddy S, Bibby NJ, Elliott RB. An immunocytochemical study of endocrine cell development in the early fetal guinea-pig pancreas. *General and Comparative Endocrinology* 86:275–283, 1992.
111. Reinecke M. Immunohistochemical localization of polypeptide hormones in endocrine cells of the digestive tract of *Branchiostoma lanceolatum*. *Cell Tissue Res.* 219, 445–456, 1981.
112. Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M. Ghrelin producing cells exist as two types of cells, closed-and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides* 23: 531, 2002.
113. Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, Enikolopov G, Asghar Z, Wheeler MB, Korbitt G, van der Kooy D. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat. Biotechnol.* 22, 1115–1124, 2004.

114. Slack JMW. Developmental biology of the pancreas. *Development* 121, 1569–1580, 1995.
115. Stefan Y, Grasso S, Perrelet A, Orci L. A quantitative immunofluorescent study of the endocrine cell populations in the developing human pancreas. *Diabetes* 32:293–301, 1983.
116. Soriano-Guillen L, Barrios V, Martos G, Chowen JA, Campos-Barros A, Argente J. Effect of oral glucose administration on ghrelin levels in obese children. *Eur J Endocrinol.* 151: 119–121, 2004a.
117. Soriano-Guillen L, Barrios V, Campos-Barros A, Argente J. Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: Effect of weight reduction or recuperation. *J Pediatr.* 144: 36–42, 2004b.
118. Sumazaki R, Shiojiri N, Isoyama S, Masu M, Keino-Masu K, Osawa M, Nakauchi H, Kageyama R, Matsui A. Conversion of biliary system to pancreatic tissue in Hes1-deficient mice. *Nat. Genet.* 36, 83–87, 2004.
119. Teitelman G, Alpert S, Polak JM, Martinez A, Hanahan D. Precursor cells of mouse endocrine pancreas coexpress insulin, glucagon and the neuronal proteins tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y, but not pancreatic polypeptide. *Development* 118:1031–1039, 1993.
120. Tena-Sempere M, Barreiro ML, Gonzalez LC. Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* 143, 717-725, 2002.
121. Tong J, Pigeon RL, Davis HW, Bidlingmaier M, Kahn SE, Cummings DE, Tschöp MH, D'Alessio D. Ghrelin suppresses glucose-stimulated insulin secretion and deteriorates glucose tolerance in healthy humans. *Diabetes* 59(9):2145-51, 2010.
122. Tornehave D, Jansen P, Teisner B, Rasmussen HB, Chemnitz j, Moscoso G. Fetal antigen (FA1) in the human pancreas: cell type expression, topological and quantitative variations during development. *Anatomy and Embryology* 187:335–341, 1993.
123. Tzotzas T, Papazisis K, Perros P, Krassas GE. Use of somatostatin analogues in obesity. *Drugs.* 68:1963-73, 2008.
124. Wan HW, Fortuna MB, Furmanski P. A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously. *Journal of immunological methods* 103(1):121-9, 1987.
125. Wei W, Wang G, Qi X, Englander EW, Greeley Jr GH. Characterization and regulation of the rat and human ghrelin promoters. *Endocrinology* 146:1611–25, 2005.
126. Wessells NK, Cohen JH. Early pancreas organogenesis: morphogenesis, tissue interactions, and mass effects. *Dev. Biol.* 15, 237–270, 1967.
127. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol.* 24:1016–1019, 2000.

128. Whatmore AJ, Hall CM, Jones J, Westwood M, Clayton PE. Ghrelin concentrations in healthy children and adolescents. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 59: 649–654, 2003.
129. Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F. The ghrelin cell: A novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept*. 107: 63–69, 2002.
130. Wierup N, Yang S, McEvelly RJ, Mulder H, Sundler F. Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in developing rat islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells. *J Histochem Cytochem*. 52:301–310, 2004.
131. Volante M, Fulcheri E, Allia E, Cerrato M, Pucci A, Papotti M. Ghrelin expression in fetal, infant, and adult human lung. *J Histochem Cytochem*. 50: 1013–1021, 2002.
132. Volante M, Allia E, Gugliotta P, Funaro A, Broglio F, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E, Papotti M. Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 87:1300-1308, 2002a.
133. Volante M, Allia E, Fulcheri E, Cassoni P, Ghigo E, Muccioli G, Papotti M. Ghrelin in fetal thyroid and follicular tumors and cell lines: Expression and effects on tumor growth. *Am J Pathol*. 162: 645–654, 2003.
134. Yee NS, Lorent K, Pack M. Exocrine pancreas development in zebrafish. *Dev Biol*. 284, 84–101, 2005.
135. Youson JH, Al-Mahrouki AA. Ontogenetic and phylogenetic development of the endocrine pancreas (islet organ) in fish. *Gen. Comp. Endocrinol*. 116, 303–335, 1999.
136. Yui R, Fujita T. Immunocytochemical studies on the pancreatic islets of the ratfish *Chimaera monstrosa*. *Arch. Histol. Jpn*. 49, 369–377, 1986.
137. Zecchin E, Mavropoulos A, Devos N, Filippi A, Tiso N, Meyer D, Peers B, Bortolussi M, Argenton F. Evolutionary conserved role of *ptf1a* in the specification of exocrine pancreatic fates. *Dev. Biol*. 268, 174–184, 2004.

PODRECZNIKI:

1. Bielańska-Osuchowska Z. Zarys organogenezy. Różnicowanie się w komórek w narządach. Wydawnictwo naukowe PWN. Indeks: 69078637, Warszawa, 2004.
2. Bilous R, Donnelly R, Handbook of Diabetes, 4th Edition, Blackwell Publishing Ltd., ISBN 978-1-4051-8409-0, 2010.
3. Falkmer S, Comparative morphology of pancreatic islets in animals. In *The Diabetic Pancreas*, 2nd edition (Volk, B.W. and Arquilla, E.R., eds.), Plenum Press, New York, 1985

4. Guyton AC, Hall JE, Textbook of Medical Physiology 12th Edition, Elsevier, ISBN-13 9780721686776, 2005.
5. Ostrowski K, Histologia. Wyd. II. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, ISBN 83-200-1869-2, 1995.
6. Pictet R, Rutter WJ. Development of the embryonic pancreas. In Handbook of Physiology, section 7, Endocrinology, vol.1, Endocrine Pancreas, pp 25–66. Eds DF Steiner & N Freinkel. Washington: American Physiological Society, 1972.
7. Zabel M, Immunocytochemia. Wyd. nowe. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, ISBN 83-01-12884-4, 1999.

11. SPIS TABEL

Tab.1	Wykaz stosowanych przeciwciał pierwszorzędowych.....	29
Tab.2	Wykaz stosowanych przeciwciał i odczynników drugorzędowych.....	29
Tab.3	Startery wykorzystane w reakcjach PCR.....	35
Tab.4	Komponenty pierwszego etapu reakcji odwrotnej transkrypcji.....	42
Tab.5	Komponenty drugiego etapu reakcji odwrotnej transkrypcji.....	42
Tab.6	Skład mieszaniny reakcyjnej.....	43
Tab.7	Etapy i parametry reakcji PCR.....	44
Tab.8	Średnie wielkości wysp wyrażone jako ich średnice (μm), zmieniające się w trakcie rozwoju trzustki człowieka.....	70
Tab.9	Procentowy udział komórek INS-ip w wyspach, na kolejnych etapach rozwoju trzustki człowieka.....	81
Tab.10	Procentowy udział komórek GLUK-ip w wyspach, na kolejnych etapach rozwoju trzustki człowieka.....	81
Tab.11	Procentowy udział komórek GHREL-ip w wyspach, na kolejnych etapach rozwoju trzustki człowieka.....	82

12. SPIS RYCIN


Ryc.1	Anatomia trzustki.....	11
Ryc.2	Budowa histologiczna trzustki.....	13
Ryc.3	Ewolucja wysp trzustkowych	14
Ryc.4	Kompletna sekwencja kodująca mRNA ppGHREL człowieka.....	36
Ryc.5	Struktura ppGHREL i białka GHREL człowieka.....	36
Ryc.6	Rozdział elektroforetyczny RNA wyizolowanego z wysp Langerhansa trzustki.....	40
Ryc.7	TMA przygotowany dla blisko 100 różnych tkanek, umieszczonych w jednym bloczku parafinowym.....	47
Ryc.8	Schemat wykrywania antygeny za pomocą kompleksu streptoawidyna – peroksydaza.....	50
Ryc.9	Wyspy Langerhansa trzustki wybarwione Ditizonem.....	56
Ryc.10	Analiza ekspresji mRNA ppGHREL wykonana techniką PCR w izolowanych wyspach Langerhansa trzustki człowieka.....	58
Ryc.11	Kolokalizacja GHREL i SYP w trzustce człowieka.....	59
Ryc.12	Komórki GHREL-ip (FITC) wykazujące brak koekspresji z: A. glukagonem (TRITC) i B. insuliną (TRITC).....	61
Ryc.13	Immunofluorescencyjna lokalizacja GHREL (TRITC) z: A. insuliną (FITC), B. glukagonem (FITC), C. SST (FITC) oraz D. PP (FITC) w wyspie człowieka dorosłego.....	61
Ryc.14	Immunohistochemiczna lokalizacja komórek GHREL-ip w wyspach Langerhansa trzustki człowieka dorosłego	63
Ryc.15	Immunohistochemiczna lokalizacja komórek GHREL-ip w przewodzie trzustkowym trzustki osoby dorosłej.....	63
Ryc.16	Komórka GHREL-ip wśród elementów egzokrynych trzustki człowieka dorosłego.....	64
Ryc.17	Średnia liczba komórek GHREL-ip/wyspę oraz frakcja masy komórek ϵ w trzustce człowieka dorosłego, oraz ich zależność od BMI.....	65

Ryc.18	Fracja objętości wyspy zajęta przez komórki GHREL-ip i stosunek ich masy do masy komórek INS-ip w trzustce człowieka dorosłego i ich zależność od BMI.....	66
Ryc.19	Komórki SYP-ip w trzustce w okresie płodowym i pourodzeniowym człowieka.....	68
Ryc.20	Immunohistochemiczna lokalizacja hormonów trzustki w 24. tygodniu życia wewnątrzmacicznego.....	69
Ryc.21	Wykres ukazuje zmieniającą się w trakcie rozwoju średnicę wysp trzustkowych człowieka.....	71
Ryc.22	Zmieniająca się powierzchnia wysp Langerhansa, wyrażona w mm ² (oś Y) w trakcie rozwoju wewnątrzmacicznego podanego w tygodniach (oś X).....	72
Ryc.23	Immunohistochemiczna lokalizacja głównych typów komórek endokrynych w trakcie rozwoju trzustki człowieka.....	73
Ryc.24	Immunohistochemiczna lokalizacja komórek GLUK-ip w rozwijającej się trzustce człowieka.....	74
Ryc.25	Immunohistochemiczna lokalizacja komórek INS-ip w rozwijającej się trzustce człowieka.....	75
Ryc.26	Charakterystyczny „półksiężycowaty” układ komórek GHREL-ip na wybranych etapach rozwoju płodowego.....	77
Ryc.27	Immunohistochemiczna lokalizacja komórek GHREL-ip w rozwoju ludzkiej trzustki.....	78
Ryc.28	Lokalizacja komórek GHREL-ip poza wyspą podczas rozwoju wewnątrzmacicznego człowieka.....	79
Ryc.29	Fracja objętości wysp Langerhansa zajmowana przez poszczególne typy komórek wyspy w trakcie rozwoju.....	80
Ryc.30	Immunofluorescencyjna kolokalizacja insuliny oraz GHREL w różnych okresach rozwoju trzustki człowieka.....	84
Ryc.31	Immunofluorescencyjna kolokalizacja glukagonu oraz GHREL na różnych etapach rozwoju trzustki człowieka.....	85
Ryc.32	Immunofluorescencyjna lokalizacja komórek GHREL-ip z SST i PP w rozwijającej się trzustce człowieka.....	86
Ryc.33	Immunofluorescencyjna kolokalizacja GHREL z PP.....	87

Ryc.34 Komórki GHREL-ip (kolor czerwony) barwione podwójnie na wybrane czynniki transkrypcyjne (brązowy): Isl1, Nkx2-2, Nkx6-1 oraz Pax6 na różnych etapach rozwoju trzustki człowieka..... 88

13. ANEKS

Zgoda Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu na prowadzenie badań.



UNIwersYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 612/08

Na podstawie art. 29 ustawy z dnia 5 grudnia 1996r. o zawodzie lekarza i lekarza dentystry (t.j. Dz.U.z 2002r. Nr 21, poz.204 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U. Nr 47, poz.480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz.U. Nr 57, poz. 500); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz.U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 3 stycznia 2007r. w sprawie wzoru wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego produktu leczniczego oraz o wydanie przez komisję bioetyczną opinii o badaniu klinicznym produktu leczniczego, kierując się Zasadami Prawidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską.

Komisja, na posiedzeniu w dniu: 15 maja 2008 r.

rozpatrzyła wniosek, który przedstawił Pan:

prof. dr hab. Krzysztof W. Nowak

w sprawie prowadzenia badań w

San Raffaele Scientific Institute, Via Olgettina 60, 20 132 Milano, Italy

oraz w części analizy wyników w Katedrze Fizjologii i Biochemii Zwierząt

Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

Główny badacz: mgr Karolina Maria Andrałojć

Temat

badania: "Komórki syntetyzujące grelinę w wyspach trzustki w rozwoju płodowym człowieka oraz ekspresja w nich czynników transkrypcyjnych regulujących różnicowanie komórek wysp".

Komisja wyraża zgodę na prowadzenie badań

Przewodniczący Komisji

Prof. zw. dr hab. med. Zygmunt Przybylski

LISTA OBECNOŚCI

KOMISJA BIOETYCZNA
 przy
 UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
 im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
 61-701 Poznań, ul. Fredry 10
 tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
 fax (+48 61) 854 61 07

KOMISJI BIOETYCZNEJ
 PRZY
 UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO
 W POZNANIU.

15 maja 2008 r.

Posiedzenie Komisji dnia

Przewodniczący: prof. zw. dr hab. ZYGMUNT PRZYBYLSKI

Z-ca Przewodn.: prof. dr hab. JÓZEF KRAWCZAK

Członkowie : prof. dr hab. WOJCIECH SŁUŻEWSKI

prof. dr hab. ROMAN SZULC

prof. dr hab. JANUSZ SZYMAŚ

prof. dr hab. HENRYK WYSOCKI

prof. dr hab. PAWEŁ CHĘCIŃSKI

prof. dr hab. JANUSZ PALUSZAK

dr hab. MACIEJ KRAWCZYŃSKI

dr med. PIOTR TOMCZAK

prof. dr hab. JANUSZ WIŚNIEWSKI

ks. prof. dr hab. JERZY TROSKA

dr hab. JERZY W. OCHMAŃSKI

dr farm. OLIMPIA KLIMASZEWSKA

BARBARA LIPIAK

KOMISJA BIOETYCZNA
PRZY
UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
61-701 Poznań, ul. Fredry 10
tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax (+48 61) 854 61 07

SKŁAD OSOBOWY KOMISJI BIOETYCZNEJ

15.05.2008r.
z dnia

Lp.	Imię i Nazwisko	Specjalność	Miejsce Pracy
1	Przewodniczący Komisji prof. dr hab. Zygmunt Przybylski	medycyna sądowa	Katedra Medycyny Sądowej UM ul. Święcickiego 6, Poznań
2	Z-ca Przewodniczącego Komisji prof. dr hab. Józef Krawczak	farmakologia	Katedra Farmakologii UM ul. Rokietnicka 5a, Poznań
3	prof. dr hab. Roman Szulc	anestezjologia i reanimacja, otolaryngologia	I Klinika Anestezjologii i Intensywnej Terapii UM, ul. Długa 1/2, Poznań
4	prof. dr hab. Janusz Szymaś	anatomia patologiczna	Katedra Patomorfologii Klinicznej UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
5	prof. dr hab. Wojciech Służewski	pediatria, neurologia dziecięca, choroby zakaźne	Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UM ul. Szpitalna 27/33, Poznań
6	prof. dr hab. Henryk Wysocki	choroby wewnętrzne, kardiologia	Klinika Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
7	dr hab. med. Maciej Krawczyński	genetyka kliniczna, okulistyka	Katedra i Zakład Genetyki Medycznej UM ul. Grunwaldzka 55, Poznań
8	dr med. Piotr Tomczak	onkologia kliniczna, radioterapia	Klinika Onkologii UM, ul. Łąkowa 1/2, Poznań
9	prof. dr hab. Paweł Chęciński	chirurgia ogólna, naczyniowa i angiologia	Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii UM, ZOZ MSWiA ul. Dojazd 34, Poznań
10	prof. dr hab. Janusz Paluszak	fizjologia kliniczna	Katedra i Zakład Fizjologii UM, ul. Święcickiego 6
11	ks. prof. dr hab. Jerzy Troska	teologia, etyka	Wydział Teologiczny UAM, ul. Wieżowa 2/4, Poznań
12	dr hab. Jerzy W. Ochmański	prawnik	Wydział Prawa UAM, ul. Św. Marcin 90, Poznań
13	prof. dr hab. Janusz Wiśniewski	filozof	Wydział Nauk Społecznych UAM, ul. Szamarzewskiego 89, Poznań
14	dr farm. Olimpia Klimaszewska	farmaceuta	Apteka „Kalifarm”
15	Barbara Lipiak	pielęgniarka	ZOZ Grunwald