»58. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije«

Vpliv različnih koncentracij ionov Ca²⁺ v zunajcelični raztopini na delovanje celic beta v otočkih trebušne slinavke

Raziskovalno področje: interdisciplinarno (zdravstvo/biologija)

Raziskovalna naloga

Avtorja: Špela Polutnik, Tim Šinko

II. gimnazija Maribor

Mentorica: Katja Holnthaner Zorec

Somentorja: Polona Kovačič, Jan Kopecky

Maribor, april 2024

KAZALO

Kazalo slik III					
PovzetekV					
ZahvalaVI					
1 Uv	Uvod1				
1.1	Raziskovalna vprašanja in hipoteze				
2 Teo	oretično ozadje4				
2.1	Trebušna slinavka				
2.2	Vloga in regulacija inzulina5				
2.3	Membranski potencial celic beta in vloga Ca ²⁺ 11				
2.4	Konfokalna laserska mikroskopija (CLSM)13				
3 Ma	3 Materiali in metode dela				
3.1	Etična izjava17				
3.2	Priprava uporabljenih raztopin17				
3.2	.1 Agaroza (1,9 % w/w) 17				
3.2	.2 Zunajcelična raztopina (ZCR)				
3.2	.3 Zunajcelična raztopina s pufrom HEPES				
3.3	Priprava tkivnih rezin trebušne slinavke				
3.4	Barvanje vzorcev tkiva z barvilom CALBRYTE TM 520 AM				
3.5	Slikanje s konfokalno lasersko vrstično mikroskopijo (CLSM)				
3.6	Analiza posnetkov				
3.7	Statistična analiza obdelanih podatkov24				
4 Rez	zultati				
4.1	Kvadratni pulz				
4.2	Kalcijev stopničasti protokol				

»58. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije«

5	Razprava	30
6	Družbena odgovornost	35
7	Zaključek	36
8	Viri	38

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba Langerhansovega otočka (Britannica, 2023)5
Slika 2: Izločanje inzulina ob povišanju glukoze v krvi (Arora, in drugi, 2021)
Slika 3: Značilen dvofazni odziv celic beta na stimulacijo z glukozo (Rorsman & Renstörm, 2003)
Slika 4: Vpliv zunajcelične koncentracije ionov Ca^{2+} na spreminjanje membranskega potenciala, koncentracije $[Ca^{2+}]_{lum}$ stimulirane celice beta (Chay, 1997)
Slika 5: Princip delovanja konfokalne mikroskopije (Lasertec, 2023) 14
Slika 6: Potek dela
Slika 7: Prikaz injiciranja agarozne raztopine v dukt trebušne slinavke (osebni arhiv) 19
Slika 8: Langerhansov otoček pod stereolupo (osebni arhiv)
Slika 9: Protokol kvadratnega pulza
Slika 10: Kalcijev stopničasti protokol
Slika 11: Tkivni preparat Langerhansovega otočka trebušne slinavke. S konfokalnim mikroskopom posnet Langerhansov otoček, v katerem so celice napolnjene z od kalcija odvisnim barvilom (20x povečava). Z rdečimi elipsami so označene 4 celice beta (območja interesa) (osebni arhiv)

Slika 12: Shematska upodobitev analiziranih parametrov. Dolžina oscilacij na polovici maksimalne amplitude (A), število oscilacij na minuto, izraženo kot frekvenca oscilacij (B) in odstotek oz. delež aktivnega časa, ponazorjen s črnimi pasovi (C) (Stožer in sod., 2021)......24

»58. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije«

POVZETEK

Glavna naloga celic beta trebušne slinavke je izločanje inzulina, kadar je koncentracija glukoze in drugih energijsko bogatih hranil v krvi povišana. Glukozo celice beta absorbirajo iz krvi in jo v procesu celičnega dihanja razgradijo. Pri tem nastane ATP, ki povzroči zaprtje ionskih kanalov za ione K⁺ na celični membrani. Celica se depolarizira, kar povzroči odprtje napetostno odvisnih ionskih kanalov za ione Ca²⁺. Vstop ionov Ca²⁺ v celico povzroči izločanje inzulina v kri. Namen naše raziskovalne naloge je bil določiti, kakšen vpliv imajo različne koncentracije ionov Ca²⁺ v zunajcelični raztopini na delovanje in aktivnost celic beta trebušne slinavke. Langerhansove otočke, kjer se celice beta nahajajo, smo pridobili iz trebušne slinavke miši po metodi tkivne rezine (in situ). Celice smo pobarvali s fluorescenčnim kalcijevim senzorjem in jih snemali s konfokalnim mikroskopom (angl. confocal laser-scanning microscopy, CLSM). Med snemanjem smo rezine perifundirali z raztopinami, ki so vsebovale različne koncentracije ionov Ca²⁺ (1 mM, 2 mM, in 10 mM) in glukoze (6 mM ali 9 mM) in kasneje analizirali razlike med njihovimi odzivi. Ugotovili smo, da aktivni čas pada z naraščajočo koncentracijo Ca²⁺ v zunajcelični raztopini. Kljub najkrajši dolžini oscilacij pri koncentraciji 1 mM Ca²⁺ je bila frekvenca njihovega proženja toliko višja, da je končno privedla do največjega aktivnega časa v primerjavi z 2 in 10 mM Ca²⁺. Do podobnih opažanj z majhnimi odstopanji prihajamo tudi z izsledki stopničastega protokola. Odstopanje pri 1 mM Ca²⁺ pripisujemo prejšnji perifuziji z 10 mM Ca^{2+} , ki je podaljšala čas, potreben za repolarizacijo membrane in ponovno proženje Ca^{2+} oscilacij v nadaljevanju eksperimenta ter zato zmanjšala frekvenco oscilacij in aktivni čas celic. V prihodnje bi bilo potrebno naredili še več analiz raznih kalcijevih stopničastih protokolov, da bi lahko lažje razumeli razlike med rezultati v primerjavi s kvadratnim pulzom.

Ključne besede: trebušna slinavka, celice beta, inzulin, koncentracija zunajceličnih in citoplazemskih ionov Ca²⁺, konfokalna mikroskopija.

ZAHVALA

Zahvaljujeva se somentorjema, ki sta nama bila pripravljena svetovati z nasveti in sta naju uvedla v delo v laboratoriju. Zahvala gre tudi šolski mentorici za omogočeno sodelovanje z univerzitetnima mentorjema. Posebej se zahvaljujeva Inštitutu za fiziologijo Medicinske fakultete Maribor, ki nama je omogočil izvedbo raziskovalne naloge v njihovem laboratoriju, hvala vsem zaposlenim, ki so na kakršenkoli način pomagali pri izvedbi raziskovalnega dela.

Zahvaljujeva se tudi profesorjem šole, ki so nama omogočili odsotnost od pouka z namenom izvedbe raziskovalne naloge ter staršem, ki so naju podprli pri izvedbi.

1 UVOD

Sladkorna bolezen (*diabetes melitus*) je presnovna motnja, pri kateri je pri posamezniku zmanjšana sposobnost sekrecije inzulina (kot posledica avtoimunega odziva – sladkorna bolezen tipa 1) ali občutljivost tkiv na inzulin (sladkorna bolezen tipa 2), posledica česar je okvarjena presnova ogljikovih hidratov, kar vodi v povišano raven glukoze v krvi. Po podatkih Svetovne organizacije za diabetes (International diabetes federation, IDF) ima 537 milijonov ljudi na svetu, starih med 20 in 79 let, diagnosticiran diabetes. Število obolelih zaradi nezdravega življenjskega sloga in hitrega tempa družbe strmo narašča (IDF Diabetes Atlas, 2021). V Sloveniji je število obolelih med leti 2010 in 2019 naraslo za 25,9 % (NIJZ, 2023). Sladkorna bolezen predstavlja velik izziv za zdravstvo, zato je ključnega pomena raziskati vzroke za njen porast med svetovno populacijo in zasnovati učinkovito platformo, ki bo pomagala pri razumevanju in raziskovanju te bolezni ter pomagala umiriti trend naraščanja števila obolelih.

Pomembno vlogo pri razvoju sladkorne bolezni ima hormon inzulin, ki je v človeškem telesu esencialen. Pomaga pri skladiščenju energije po zaužitem obroku in tako nadzoruje nivo koncentracije glukoze v krvi. Človeški inzulin je peptidni hormon, sestavljen iz zaporedja 51 aminokislin. Je heterodimer verige A in verige B, ki sta povezani z disulfidnimi vezmi. Sintetizira se v celicah beta Langerhansovih otočkov trebušne slinavke, iz katere se izloča kot odgovor na povišane ravni glukoze v krvi (Seetho & Wilding, 2014). Inzulin deluje na tarčne celice in sproži privzem glukoze iz krvi, celice pa jo porabijo kot substrat pri presnovnih procesih, predvsem anabolnih, posledica česar je znižanje koncentracije glukoze v krvi (Campbell in sod., 2011).

Glukozno stimuliranje trebušne slinavke se izraža v dvigu citoplazemskega kalcija ($[Ca^{2+}]_i$) v celicah beta, posledica česar je eksocitoza veziklov z inzulinom. Rezultati predhodne študije v Belgiji (Gilon & Henquin, 1992), v kateri sta avtorja proučevala nihanje kalcija na izoliranih Langerhansovih otočkih, ki sta jih dobila s pomočjo razgradnje mišje trebušne slinavke s kolagenazo (*collagenase digestion*), so pokazali, da je pri stimulaciji izoliranih otočkov s 15 mM raztopino glukoze, ki je vsebovala 2,5 mM Ca²⁺, dvig $[Ca^{2+}]_i$ večfazen, s stalnimi približno enako frekvenčnimi oscilacijami (približno 2,2 min⁻¹). V prvi fazi je bilo zaznano majhno,

kratkotrajno znižanje koncentracije $[Ca^{2+}]_i$, sledil je velik dvig njegove koncentracije, ki je trajal približno 1 min, nato pa so sledile značilne oscilacije koncentracije $[Ca^{2+}]_i$. Oscilacije znotraj celic enega otočka so bile sinhrone. Ob popolni odstranitvi Ca^{2+} iz zunajceličnih raztopin, citoplazemskega dviga $[Ca^{2+}]_i$ in značilnih oscilacij niso zaznali. Oscilacij $[Ca^{2+}]_i$ prav tako niso zaznali ob prisotnosti zunajcelične raztopine z 1 mM Ca^{2+} , njegova koncentracija se je samo dvignila in stabilizirala na višji vrednosti. Ob proučevanju z zunajcelično raztopino z 10 mM Ca^{2+} so imele oscilacije nižjo frekvenco (v primerjavi s kontrolo - zunajcelično raztopino z 2,5 mM Ca^{2+}), razlika med minimalno in maksimalno koncentracijo (amplituda) $[Ca^{2+}]_i$ pa je bila večja (Gilon & Henquin, 1992).

Raziskav, ki bi proučevale vpliv različnih koncentracij Ca²⁺ na delovanje celic beta, ni veliko. Predstavljen je bil teoretični model vpliva različnih koncentracij Ca²⁺ (Chay, 1997), vendar je bilo izvedenih zelo malo praktičnih raziskav. Pri proučevanju delovanja celic beta se uporabljajo zunajcelične raztopine z 2-2,5 mM Ca²⁺, kar je več od fiziološke koncentracije prostih kalcijevih ionov v medceličnini, ki pri sesalcih znaša med 1,1 in 1,4 mM. (Douglas & Beierwaltes, 2012; Jaffredo in sod., 2021)

1.1 Raziskovalna vprašanja in hipoteze

Namen raziskovalne naloge je raziskati vpliv različnih koncentracij ionov Ca²⁺ v zunajcelični raztopini na odziv celic beta Langerhansovih otočkov trebušne slinavke ob spremembi koncentracije glukoze v zunajcelični raztopini (ZRC).

Pred raziskovanjem smo zastavili raziskovalna vprašanja (RV) in hipoteze (H):

RV1: <u>Ali se bodo celice beta trebušne slinavke odzvale na draženje s stimulatorno</u> <u>koncentracijo glukoze v ZRC z oscilatorno spremembo znotrajcelične koncentracije kalcijevih</u> <u>ionov?</u>

H1: Celice se bodo ob spremembi koncentracije glukoze v zunajcelični raztopini s 6 mM na 9 mM odzvale z oscilatorno spremembo.

RV2: <u>Kako različne koncentracije kalcijevih ionov (Ca²⁺) v zunajcelični raztopini vplivajo na</u> odziv celic beta Langerhansovih otočkov trebušne slinavke?

H2: Na spremembo koncentracije Ca^{2+} ionov v zunajcelični raztopini se bodo celice beta odzvale s spremenjeno dinamiko oscilacij znotrajcelične koncentracije Ca^{2+} . Aktivni čas celic bo pri višji koncentraciji Ca^{2+} nižji, pri nižji koncentraciji pa višji.

2 TEORETIČNO OZADJE

2.1 Trebušna slinavka

Trebušna slinavka je približno 80 g težka endo- in eksokrina žleza, ki se v človeškem telesu nahaja v zgornjem delu trebušne votline. Izvodila trebušne slinavke vodijo v dvanajstnik (in od tam neposredno v tanko črevo) ter v kri (Britannica, 2023; Stožer in sod, 2013). Eksokrini del pankreasa, ki zaseda glavnino žleze, tvorita dva tipa celic; acinarne in duktalne celice. Acinarne celice se združujejo v končni, mešičkasto razširjeni del žleze (t.i. acinus) in proizvajajo ter izločajo prebavne encime. Duktalne celice so organizirane v cevke, ki drenirajo izloček iz acinusov in secernirajo tekočino, ki je bogata z HCO₃⁻, v svetlino cevk. Cevke tvorijo duktalno drevo, skozi katerega teče izloček iz acinusov v smeri dvanajstnika. Bikarbonatni ioni nevtralizirajo kislo prebavno kašo, ki iz želodca prehaja v dvanajstnik, to pa zagotavlja optimalno okolje za prebavne encime, ki sodelujejo pri nadaljnji presnovi zaužitih hranil v takem črevesju (Stožer in sod., 2021; Stožer in sod., 2013).

Endokrini del je sestavljen iz velikega števila Langerhansovih otočkov, ki predstavljajo 1-4 % preostalega volumna trebušne slinavke in so razporejeni po celotni površini. Langerhansove otočke je prvi opisal Paul Langerhans leta 1869. Od takrat naprej so jih pogosto raziskovali predvsem v povezavi s sladkorno boleznijo (Xavier, 2018). V normalni trebušni slinavki človeka je med 500 000 in 7 milijonov otočkov. Otočki so ovalni ali okrogli s premerom med 50 in 300 μ m (Boron & Boulpeap, 2012, str. 1074). Približno 75 % celic v vsakem otočku je celic beta (β), katerih glavna funkcija je izločanje inzulina in se običajno nahajajo v notranjosti otočka (Britannica, 2023). Na perifernih delih Langerhansovih otočkov se nahajajo skupki celic alfa (α), gama (γ) in delta (δ), ki izločajo vsaka svoj hormon, glukagon, pankreatični polipeptid in somatostatin (Kelc in sod., 2019).

Večina raziskav za namene preučevanja trebušne slinavke uporablja glodalski model, zato je potrebno, da razumemo podobnosti in razlike v strukturi in delovanju trebušne slinavke med človekom in živalskim modelom. Na makroskopskem nivoju sta si človeška in mišja trebušna slinavka zelo podobni, na mikroskopskem nivoju pa se razlikujeta po številu Langerhansovih otočkov, ki jih je glede na velikost organizma ustrezno manj. Obema vrstama je skupno, da

lahko znotraj enega otočka definiramo pet glavnih tipov celic. Različna pa je prostorska razporeditev celic znotraj otočkov. Pri miših prevladuje vzorec skorja – sredica (večina celic beta je v sredici, obrobje sestavljajo druge celice). Otoček pri glodalcih običajno sestavlja 75 do 80 % celic beta, pri ljudeh pa le 55 do 75 %, kar je glavna razlika v zgradbi človeškega in glodalčevega endokirnega dela trebušne slinavke (Dolenšek in sod., 2015).

Celice lahko komunicirajo med seboj, prav tako pa poteka komunikacija z okolico. Ta temelji na hormonski komunikaciji, npr. izločanje inzulina znotraj enega otočka inhibira izločanje glukagona v drugih otočkih, somatostatin pa inhibira sekrecijo tako glukagona kot tudi inzulina; medcelični komunikaciji, ki temelji na presledkovnih stikih med celicami znotraj otočka, ki omogočajo lažje prenašanje informacij; ter živčni komunikaciji (Boron & Boulpeap, 2012, str. 1074). Celice oblikujejo obliko otočka skupaj s kapilarami, da lahko najlažje spremljajo spremembe koncentracij hranil v krvni plazmi, ki so posledice zaužitja hrane. Celice Langerhansovega otočka so 10-krat bolj prekrvljene kot sosednje celice eksokrinega tkiva (Fu in sod., 2013).



Slika 1: Zgradba Langerhansovega otočka (Britannica, 2023)

2.2 Vloga in regulacija inzulina

Inzulin je nujen hormon za uravnavanje normalnega metabolizma. Njegova primarna funkcija je nadzorovanje presnove ogljikovih hidratov, beljakovin in maščob (Kelc in sod., 2019).

Izločajo in sintetizirajo ga celice beta trebušne slinavke. Kodira ga gen, ki se nahaja na kromosomu 11 (Boron & Boulpeap, 2012). Inzulin se sintetizira na zrnatem endoplazemskem retikulumu. Po sintezi se spremeni v aktivno obliko in je shranjen v granulah v celicah beta do eksocitoze (Rorsman & Renstörm, 2003). Pri zdravih posameznikih je izločanje inzulina skrbno uravnavano glede na potrebe metabolizma. Celice beta zaznajo spremembo v koncentraciji glukoze v krvi in odgovorijo z eksocitozo točno določene količine granul inzulina (Fu in sod., 2013). Inzulin spodbuja privzem glukoze iz krvi v mišično tkivo, maščobno tkivo in v jetra (Kelc in sod., 2019). Njegovo odkritje v zgodnjih tridesetih letih je eden najpomembnejših dogodkov v zgodovini endokrine fiziologije in terapije. Leta 1923 so prvič sintetizirali inzulin iz goveje in prašičje trebušne slinavke na industrijski ravni ter ga uporabili kot terapijo pri pacientih z diabetesom. Od takrat je inzulin najbolj proučevan hormon. Največ raziskav se ukvarja s proučevanjem zaporedja medceličnih signalov, ki povzroči sekrecijo inzulina, procesa, s katerim lastni imunski sistem prepozna celice beta in jih uniči, kot je značilno za sladkorno bolezen tipa 1, ter procesa nastanka s prehrano povzročenega metabolnega sindroma, ki vodi v globalno za zdravstvene sisteme najbolj bremenilno obliko, sladkorno bolezen tipa 2. (Boron & Boulpeap, 2012).

Celice beta se lahko odzovejo na različne monomere energijsko bogatih molekul (najpogosteje na glukozo, lahko pa tudi na galaktozo, manozo, fruktozo, aminokisline – arginin ali levcin, ali pa manjše maščobne kisline) (Boron & Boulpeap, 2012). Glukoza je primarni stimulus za sekrecijo inzulina. Zaužitje 76 g glukoze bo pri zdravih ljudeh povzročilo dvig inzulina z 20- 30×10^{-9} mM na 250- 300×10^{-9} mM v 30 minutah (Fu in sod., 2013). Ko je nivo glukoze v krvi povišan, celice beta to zaznajo, izločijo inzulin ter obratno, ko je nivo glukoze v krvi znižan, je izločanje inzulina inhibirano, takrat se izloča glukagon. Izmenično delovanje glukagona in inzulina regulira stalen nivo glukoze v krvi, ki je pri zdravih posameznikih na tešče med 4,0 in 6,1 mM (Kelc in sod., 2019). Regulacija omogoča enakomerno oskrbo centralnega živčnega sistema z glukozo, kar omogoča njegovo pravilno delovanje. Glukoza je glavni vir energije živčnega sistema, homeostaza glukoze pa hkrati omogoča nadzorovano shranjevanje hranil in optimalno rast (Britannica, 2023). Če koncentracija glukoze v krvi pade pod 3,9 mM (hipoglikemija), posameznik doživi omotico in lahko izgubi zavest. Dolgotrajno povišane vrednosti glukoze (hiperglikemija) v krvi predstavljajo za celice velik metabolni in oksidativni stres, in lahko vodijo do debelosti, motene občutljivosti tarčnih tkiv na inzulin ter

razvoja sladkorne bolezni. Če je koncentracija glukoze v krvi previsoka, je nad 30 oz. 40 mM (močna hiperglikemija), lahko pride do motnje osmoregulacije in posledično dehidracije (Boron & Boulpeap, 2012). Hipoglikemija in hiperglikemija sta najpogosteje posledici nepravilnosti v delovanju celic beta. Izguba celic beta zaradi avtoimunskega napada nanje, posledica česar je zmanjšana sinteza inzulina, je razlog za sladkorno bolezen tipa 1 (Kelc in sod., 2019). Sladkorna bolezen tipa 1 v Evropi prizadene 1 na 600 otrok. Pred letom 1922 so vsi otroci, ki jih je bolezen prizadela, umrli v obdobju dveh let po diagnozi zaradi izgube telesne teže, kljub temu da so zaužili dovolj hrane, saj glukoza zaradi pomanjkanja inzulina ni prehajala v celice (Boron & Boulpeap, 2012). Izguba funkcionalnosti celic beta, ko te ne zmorejo več proizvajati/izločati dovolj velike količine inzulina, da bi zagotovile potrebam posameznika ter rezistenca tarčnih celic na inzulin, je značilna za bolnike s sladkorno boleznijo tipa 2 (Xavier, 2018). Diabetes je eden izmed večjih zdravstvenih problemov, zanj oboleva že skoraj 10 % odrasle populacije na svetu (Kelc in sod., 2019).

Normalno delujoče celice beta zaznajo porast glukoze ter jo privzamejo iz krvi. Glukoza v celico prehaja z olajšano difuzijo skozi beljakovinske prenašalce GLUT 2. V procesu celičnega dihanja (glikoliza, nato Krebsov cikel) se razgradi do ogljikovega dioksida in vode (Kelc in sod., 2019). V celicah beta se nahaja encim glukokinaza, podtip heksokinaz, ki v prvi stopnji glikolize fosforilira glukozo v glukozo-6-fosfat. Glukokinaza opravlja enako funkcijo, nahaja pa se samo v 4 različnih tipih celic (v hepatocitah, celicah beta, enterocitah in v glukoznoobčutljivih nevronih). Od ostalih glukokinaz jo razlikuje to, da ima nizko afiniteto do glukoze v primerjavi z ostalimi heksokinazami (potrebne so višje koncentracije glukoze, da doseže maksimalno hitrost sinteze), zaradi česa deluje hitreje pri višjih koncentracijah glukoze kot ostale heksokinaze. Prav tako je glukoza-6-fosfat (njen produkt) ne inhibira, kar ji omogoča neomejeno dejavnost. Glikoliza zaradi tega v celicah beta poteka veliko hitreje kot v drugih vrstah celic, kar jim pomaga pri njihovem delovanju kot senzor za glukozo. Produkt glikolize sta poleg dveh molekul NADH+H⁺ in dveh molekul ATP, dve molekuli piruvata, ki nato vstopita v mitohondrij. V mitohondriju se vanj prispeli piruvat v procesu cikla trikarboksilnih kislin dokončno razgradi do vode in ogljikovega dioksida, pri čemer nastane velika količina (do 32 dodatnih) molekul ATP (Fu in sod., 2013). Ob odsotnosti ATP-ja so KATP kanali (od ATP odvisni K⁺ kanali) odprti, zato pozitivno nabiti K⁺ ioni izhajajo iz celice, posledica česar je hiperpolarizacija celične membrane nestimulirane celice beta. Po stimulaciji celic beta z glukozo, posledično povišana znotrajcelična koncentracija ATP povzroči zmanjšano prevodnost K_{ATP} kanalov. Ker je izhajanje K⁺ inhibirano, se poviša koncentracija pozitivno nabitih ionov v notranjosti celice, kar privede do depolarizacije celične membrane (Rorsman & Renstörm, 2003). Zaradi napetostne spremembe na celični membrani se odprejo napetostno odvisni Ca²⁺ kanali in celice beta pričnejo prožiti akcijske potenciale (Kelc in sod., 2019). V povprečju je zunajcelična koncentracija Ca²⁺ v mirovanju 1,2 mM, znotrajcelična pa le 10⁻⁴ mM, zato Ca^{2+} ob odprtju napetostno odvisnih Ca^{2+} kanalov s pasivnim transportom prehaja v celico (Boron & Boulpeap, 2012). Celice beta imajo 3 od 4 različnih oblik Ca²⁺ kanalov, pri čemer so najpomembnejši kanali tipa L (Rorsman & Renstörm, 2003). Ti se odprejo, ko je napetost na celični membrani višja od -30 mV (Boron & Boulpeap, 2012, str. 198). Kalcij v celici aktivira 3 različne tipe kinaz, ki s fosforilacijo beljakovin povzročijo zlivanje veziklov, ki vsebujejo inzulin, s celično membrano, kar povzroči sekrecijo inzulina v kri (Kelc in sod., 2019). Prav tako kalcij znotraj celice po principu pozitivne povratne zanke povzroči dodatno sprostitev Ca²⁺ ionov iz celičnih organelov, predvsem iz endoplazemskega retikuluma v citoplazmo (Boron & Boulpeap, 2012). Pri koncentraciji glukoze, ki je tako visoka, da stimulira izločanje inzulina, so vsi K_{ATP} kanali zaprti (Rorsman & Renstörm, 2003). Pri ljudeh je ta koncentracija okoli 7 mM (Kelc in sod., 2019).



Slika 2: Izločanje inzulina ob povišanju glukoze v krvi (Arora, in drugi, 2021)

Ni pa to edini mehanizem, ki stimulira sekrecijo inzulina. Vsaka sprememba prepustnosti membranskih kanalov celic beta, ki vpliva na napetost na celični membrani, lahko vpliva na

premik Ca^{2+} ionov iz medceličnine v citoplazmo (Kelc in sod., 2019). Najpomembnejša v povezavi z izločanjem inzulina pa sta od ATP odvisen K_{ATP} kanal in od napetosti odvisen Ca^{2+} kanal.

Na izločanje inzulina vpliva tudi živčevje. Langerhansove otočke oživčuje avtonomni živčni sistem, in sicer tako simpatik kot parasimpatik. Agonisti beta adrenergičnih receptorjev spodbujajo izločanje inzulina iz celic, medtem ko agonisti alfa adrenergičnih receptorjev njegovo izločanje zavirajo. Med vadbo alfa adrenergični agonisti preprečijo nastanek hipoglikemije z zaviranjem izločanja inzulina. Prav tako vplivajo na izločanje inzulina tudi drugi endokrini hormoni trebušne slinavke, predvsem glukagon in somatostatin, ki inhibirata njegovo sekrecijo. Sekrecijo inzulina inhibirajo tudi koritizol, rastni hormon in adrenalin (Rorsman & Renstörm, 2003).

Sekrecija inzulina ob znatno povišani koncentraciji glukoze v krvi kaže kot značilen dvofazen vzorec, ki ga sestavljata prehodna prva faza z visoko amplitudo hitrosti izločanja inzulina in druga - plato faza, za katero je značilna manjša hitrost izločanja, ki postopoma narašča. Približno eno minuto po vstopu glukoze v celico beta se začne izločati inzulin. Razlog za zamik je čas, potreben za presnovo glukoze (Rorsman & Renstörm, 2003). Ko je koncentracija glukoze v krvi človeka približno 7 mM, se v prvi fazi, ki traja približno 10 minut, inzulin izloča s hitrostjo 1,4 nmol min⁻¹, v drugi fazi pa se inzulin izloča s hitrostjo 0,4 nmol min⁻¹, dokler koncentracija glukoze spet ne pade na normalno vrednost (Kelc in sod., 2019). V prvi fazi se v kri izloča inzulin, ki je bil že pred povišanjem koncentracije glukoze shranjen v granulah v citosolu celic beta, medtem ko je večina izločenega inzulina med drugo fazo odziva posledica njegove sinteze na novo (de novo) na ribosomih celic beta (Boron & Boulpeap, 2012). Inzulin izločen v prvi fazi odziva doseže jetra, ki ob njegovi prisotnosti začnejo glukozo privzemati iz krvi, inzulin izločen v drugi fazi odziva pa vpliva na dejavnost bolj oddaljenih organih (Jaffredo in sod., 2021). Raziskovalci so ocenili, da je število granul z inzulinom, ki lahko zapustijo celico v prvi fazi, omejeno na 40 do 80 granul na celico beta (Rorsman & Renstörm, 2003). Raziskave so pokazale, da je dvofazen odziv celic beta opazen tudi ob proučevanju *ex vivo* in da je tak odziv reguliran z dejavnostjo samih otočkov, zato povratne zanke drugih organov ob proučevanju niso potrebne (Jaffredo in sod., 2021).



Slika 3: Značilen dvofazni odziv celic beta na stimulacijo z glukozo (Rorsman & Renstörm, 2003)

V nekaterih organizmih se električna aktivnost celic beta v enem otočku spreminja sočasno zaradi stikov med samimi celicami, kar privede do delovanja otočka kot celote. Zato so oscilacije kalcija, ki se pojavljajo v celicah, sinhrone znotraj otočka (Idevall-Hagren & Tengholm, 2020). To je opazno predvsem v mišjih in podganjih otočkih, medtem ko je v človeških otočkih sinhronost manjša (Gosak in sod., 2022).

Ko je inzulin enkrat v krvi, najprej prehaja v jetra skozi jetrno portalno veno in tako se ga več kot polovica odstrani iz krvnega obtoka. Inzulin deluje anabolno, pospeši izgradnjo zalog v telesu, ter antikatabolno, prepreči razgradnjo že narejenih zalog. Njegova tarčna tkiva so jetra, mišice ter maščevje (Boron & Boulpeap, 2012). V jetra glukoza prehaja skozi prenašalce GLUT 2, ki niso odvisni od inzulina, inzulin pa se veže na inzulinski receptor, ki se ob njegovi vezavi aktivira in sproži avtofosforilacijo ter fosforilacijo drugih kinaz. V jetrih se tako ob vezavi inzulina na receptor pospeši predelovanje glukoze v glukozo-6-fosfat, saj je pospešena transkripcija gena za sintezo glukokinaze. Pospeši se sinteza glikogena iz glukoze-6-fosfata, međtem ko je njegova razgradnja upočasnjena. Ker se glukoza takoj ob vstopu v celico spremeni v glukozo-6-fosfat, je koncentracija glukoze v celici zmeraj nizka, zato lahko ta nemoteno (v velikih količinah) vstopa v celico s pasivnim transportom zaradi stalnega koncentracijskega gradienta. V jetrih je pospešena tudi glikoliza – tvorba piruvata, ki se v mitohondriju spremeni v acetil koencim A, iz katerega se sintetizirajo maščobne kisline.

Glukoneogeneza (tvorba glukoze *de novo*) je zavrta. Stimulirana je tudi sinteza beljakovin (Boron & Boulpeap, 2012).

V mišice glukoza prehaja skozi prenašalec GLUT 4, ki je aktiven ob vezavi inzulina na membranski receptor (je od inzulina odvisen). Ob vezavi inzulina na receptor se deli prenašalca GLUT4 prenesejo iz citoplazme in vgradijo na celično membrano. Brez vezave inzulina glukoza v mišico, ko je ta neaktivna, ne more vstopiti. Inzulin v mišicah aktivira heksokinazo in glikogen-sintazo, ki iz glukoze izgradita glikogen. Prav tako inzulin pospeši glikolizo ter stimulira sintezo proteinov v mišicah (Boron & Boulpeap, 2012).

Tudi v maščobno tkivo vstopa glukoza skozi prenašalec GLUT 4, ki je aktiven samo ob vezavi inzulina na membranski receptor. Inzulin spodbuja proces glikolize, v katerem se iz vmesnega produkta fosfoenolpiruvata v procesu reakcij tvori glicerol in iz piruvata, ki se v mitohondriju preoblikuje v acetil koencim, nastajajo maščobne kisline. Iz njih in glicerola se izgradijo trigliceridi, ki jih celica shrani. S tem mehanizmom inzulin spodbuja shranjevanje novih trigliceridov v maščobnem tkivu (Boron & Boulpeap, 2012).

2.3 Membranski potencial celic beta in vloga Ca²⁺

Kalcij je pomemben signalni ion in igra ključno vlogo pri sklapljanju dražljajev z izločanjem inzulina iz celic beta (angl. *stimulus-secretion coupling*). Na draženje z glukozo se celice beta odzovejo z depolarizacijo (električno aktivnostjo), ki jo spremlja sinhrona sprememba koncentracije $[Ca^{2+}]_i$ (prosti Ca^{2+} ioni v citosolu celice). Sprememba v membranskem potencialu je odvisna od glukoze in pri koncentracijah čez 20 mM je prisotno neprekinjeno proženje akcijskih potencialov na membrani celice (Rorsman & Renstörm, 2003). Depolarizacija celice beta ob stimulaciji z glukozo je posledica zaprtja od ATP odvisnih K⁺ kanalov (K_{ATP}) ter vstopa Ca^{2+} v celico, repolarizacijo pa povzroči zvišanje $[Ca^{2+}]_i$, saj dvig koncentracije $[Ca^{2+}]_i$ zapre Ca^{2+} kanale, ter ponovno izhajanja K⁺ iz celice, saj dvig $[Ca^{2+}]_i$ odpre od $[Ca^{2+}]_i$ odvisne K⁺ kanale (K_{Ca} – tok I_{K(Ca})). Študija T. R. Chay predvideva tudi prisotnost od zaloge odvisnega neselektivnega toka kationov v celico (I_{NS} - *»store-regulated nonselective cationic current*«), saj se depolarizacija celic beta zgodi tudi ob stimulaciji z medijem s povišano glukozo, v katerem Ca^{2+} ioni niso prisotni. Študija predvideva, da je dvig $[Ca^{2+}]_i$ posledica difuzije Ca^{2+} skozi transportne kanale v celico in sprostitve vezanega Ca^{2+} iz

gladkega endoplazemskega retikuluma (ER), medtem ko je znižanje $[Ca^{2+}]_i$ posledica njegove vezave na ER in v granule ter aktivnega transporta iz celice s črpalko (Ca²⁺_{ATP}) (Chay, 1997).

Raziskava Gilona in Henquina (Gilon & Henquin, 1992) dokazuje, da se celice beta v prisotnosti 10-15 mM glukoze odzovejo z ritmičnim valovanjem membranskega potenciala (2-2,5 min⁻¹) in z izbruhi konic $[Ca^{2+}]_i$ na platoju potenciala. Poleg tega je bil opažen značilen dvofazni odziv celic beta, ki ga je povzročil dvig $[Ca^{2+}]_i$ kot posledica dviga glukoze in odvisnost od zunanjega Ca^{2+} v obeh fazah. To podpira predlog, da se celice beta, stimulirane z glukozo, odzovejo z dvofaznim povečanjem električne aktivnosti, kar se odraža v dvofaznem povečanju dotoka Ca^{2+} , ki vodi do dvofaznega dviga $[Ca^{2+}]_i$ s končnim dvofaznim izločanjem inzulina. Prvemu sorazmerno šibkemu izločanju, ki je namenjen predvsem bližnjim tkivom, sledi močno drugo izločanje, ki je namenjeno bolj oddaljenim tkivom in trajnejšemu spustu glukoze v krvi (Gilon & Henquin, 1992).

Celokupna zunajcelična koncentracija kalcija (ki tvori komplekse z različnimi ioni in se veže na citoplazemske proteine) je tesno fiziološko regulirana (vitamin D, hormona kalcitonin in parathormon), tako da je normalna koncentracija med 2,2 in 2,6 mM in koncentracija ioniziranega prostega kalcija med 1,1 in 1,4 mM. Te ravni nihajo v ozkem razponu in redko presegajo odklon za več kot 5 % skozi čas (Douglas & Beierwaltes, 2012). Spremembe v zunajcelični koncentraciji kalcija imajo velik vpliv na delovanje celic beta trebušne slinavke, saj se spremeni frekvenca in dolžina oscilacij $[Ca^{2+}]_i$, posledica česar je spremenjena količina izločenega inzulina (Gilon & Henquin, 1992). Teoretični model vpliva spremembe koncentracije kalcija v zunajcelični raztopini na koncentracijo [Ca²⁺]_i in membranski potencial celice je v raziskavi predstavila T. R. Chay (Chay, 1997). V matematičnem modelu so ugotovili, da se ob stimuliranju celic beta z raztopino, ki ne vsebuje ionov Ca^{2+} , električno nihanje membranskega potenciala spremeni v konstantno depolarizacijo (vzburjenje celice). Koncentraciji $[Ca^{2+}]_i$ in $[Ca^{2+}]_{lum}$ (lumenski kalcij – kalcij sproščen iz zalog v lumnu ER) sta znižani na najnižji možni nivo. Ker pride do pomanjkanja kalcija v zunajcelični raztopini, ni njegovega toka v notranjost celice (I_{Ca}), zato tudi ni odprtja od [Ca^{2+}]_i odvisnih K⁺ kanalov, ki bi povzročili repolarizacijo celice. Neselektiven tok kationov v celico pa lahko zato povzroča stalno depolarizacijo (I_{NS}) (Chay, 1997). Ko je koncentracija Ca²⁺ v stimulatorni raztopini visoka (npr. 7,5 mM), imajo oscilacije višjo amplitudo, njihova frekvenca pa je nižja, saj je repolarizirani potencial nižji od običajnega (zaradi šibkega I_{NS} v celico, ki je posledica visoke koncentracije $[Ca^{2+}]_{lum}$ ter močnega I_{K(Ca)} iz celice, zaradi visoke koncentracije $[Ca^{2+}]_i$), zato repolarizirani potencial traja dlje časa in posledično so oscilacije redkejše. Amplituda je višja zaradi večje koncentracijske razlike Ca²⁺ med zunanjostjo in notranjostjo celice, zato je difuzija ob odprtju kanalov hitrejša, vendar višja koncentracija $[Ca^{2+}]_i$ povzroči hitrejšo in močnejšo repolarizacijo (krajša je dolžina plato faze, faza mirovanja je daljša), zato je frekvenca oscilacij nižja (Chay, 1997).



Slika 4: Vpliv zunajcelične koncentracije ionov Ca²⁺ na spreminjanje membranskega potenciala, koncentracije [Ca²⁺]i ter [Ca²⁺]_{lum} stimulirane celice beta (Chay, 1997)

2.4 Konfokalna laserska mikroskopija (CLSM)

Konfokalna laserska mikroskopija (angl. *confocal laser scanning microscopy*, CLSM) je mikroskopska tehnika, ki nadgrajuje presevno mikroskopijo. Prvi jo je leta 1957 predstavil

Marvin Minsky. Približno trideset let kasneje je CLSM postala standardna metoda za proučevanje bioloških vzorcev. Je specializirana oblika standardne fluorescenčne mikroskopije (imenovane tudi fluorescenčna mikroskopija s širokim poljem), ki uporablja posebne optične komponente za ustvarjanje slik visoke ločljivosti materiala, obarvanega s fluorescenčnimi senzorji. Zaradi uporabe fluorescenčnih senzorjev in možnosti mikroskopiranja s pomočjo različnih laserjev točno določene valovne dolžine, ki delujejo kot vir svetlobe, je mogoče nedvoumno zaznati, katere celice vsebujejo določen signal, oziroma ali se celica odzove na več signalov hkrati. Pogosto se uporablja v biologiji, fizikalni kemiji, mikrobiologiji in nevrofiziologiji (Peterson, 2010).



Slika 5: Princip delovanja konfokalne mikroskopije (Lasertec, 2023)

Njena primarna funkcija je ustvarjanje točkastega vira svetlobe in zavračanje neostre svetlobe, kar omogoča možnost slikanja v globino vzorca z visoko resolucijo ter tridimenzionalno slikanje. To je glavna razlika med optičnim in konfokalnim mikroskopom. Optični mikroskop osvetljuje celoten vzorec hkrati, konfokalni pa se omeji le na eno točko v goriščni ravnini (Elliott, 2020). Svetlobni žarki, ki jih oddaja svetlobni vir, gredo skozi lečo in se fokusirajo na površino vzorca. Vpadno svetlobo se pred vpadom na lečo omeji z režo. Na ta način se ustvari točkovni vir svetlobe in omeji zbiranje odbite svetlobe v določeno točko v goriščni ravnini.

Fotoni vira svetlobe vzburijo atome fluorescentne snovi, ki preidejo v vzburjeno stanje. Ko ponovno preidejo v osnovno stanje, oddajo energijo v obliki svetlobe z nižjo energijo (višjo valovno dolžino). Svetlobni žarki, ki jih odda vzorec, ponovno preidejo skozi isto lečo iz nasprotne smeri in so usmerjeni proti fotodetektorju. Fotodetektor zazna le svetlobne žarke, ki tvorijo ostro žarišče in gredo skozi luknjico, ki je postavljena tik pred njim. Ime »konfokalna« izhaja iz dejstva, da obstajata dve žariščeni točki, ena na površini vzorca in druga na fotodetektorju. Samo žarki, ki tvorijo žarišče na vzorcu, tvorijo drugo žarišče na fotodetektorju in ga dosežejo. Drugi žarki ne dosežejo fotodetektorja. Konfokalna mikroskopija tako omogoča odpravo razpršene svetlobe izven gorišča ter generiranje izjemno jasne slike. V kombinaciji z visoko vzdolžno ločljivostjo in višinskim merjenjem, ki omogoča 3D oblikovanje mikroskopiranega vzorca, je izjemno primerna za histološke raziskave (Lasertec, 2023).

3 MATERIALI IN METODE DELA

V eksperimentalnem delu smo izolirali trebušno slinavko iz miši, jo narezali na tanke rezine in obarvali s fluorescenčnim estrskim barvilom CALBRYTE[™] 520 AM. Vzburjenje tega barvila je največje pri 490 nm, vrh emisijskega spektra pa ima pri 525 nm. Po vstopu barvila v celico tega hidrolizirajo znotrajcelične esteraze, kar naredi barvilo občutljivo na kalcij. Po barvanju smo rezine snemali s konfokalnim mikroskopom ter med mikroskopiranjem rezine oblivali z ZCR po določenem protokolu. Za vzbujanje barvila smo uporabili argonski laser z valovno dolžino 488 nm, oddano svetlobo smo zajemali med (500 - 700) nm. Oddano svetlobo je detektor zajel vsakih 100 ms, kar nam je omogočilo snemanje s frekvenco 10 Hz. Na posnetkih smo nato znotraj Langerhansovega otočka v napisanem programu označili območja, ki so predstavljala eno celico. Program je povprečil jakost signala v označenem območju v odvisnosti od časa. To bazo podatkov smo nato za vsako celico otočka posebej analizirali v programu MatLab. Podatke smo pogladili, z željo, da čim bolj zmanjšamo vpliv šuma. Določili smo začetek ter konec pojava oscilacij ter vidne oscilacije označili. Dodali smo informacije o tem, kako se je koncentracija Ca²⁺ v zunajcelični raztopini med snemanjem spreminjala, ter upoštevali časovni zamik (čas, ki je potreben, da je raztopina po cevkah prišla do kamrice z rezino). Dokončno obdelane podatke smo nato med seboj primerjali in statistično analizirali. Potek dela je predstavljen na sliki 6.



Slika 6: Potek dela

3.1 Etična izjava

Raziskava je bila izvedena v skladu z merili nacionalne in evropske zakonodaje o zaščiti živali, ki se uporabljajo v znanstvene namene (direktiva 2010/63/EU) ter odobrena s strani Uprave RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (številka dovoljenja U34401-35/2018-2). Strogo smo upoštevali nacionalna in evropska priporočila, povezana z oskrbo in delo z laboratorijskimi živalmi, pri čemer je bilo zagotovljeno, da je bilo trpljenje živali absolutno minimalno.

3.2 Priprava uporabljenih raztopin

Zunajcelične raztopine (ZCR) z različnimi koncentracijami glukoze in raztopine s pufrom hepes (HEPES) (2-[4-(hidroksietil)piperazin-1-il]etansulfonska kislina) smo namešali nekaj dni pred poskusi in do uporabe shranjevali v hladilniku pri temperaturi med 4-8 °C. Na taki temperaturi se raztopini lahko shranjujeta do enega meseca.

3.2.1 Agaroza (1,9 % w/w)

Za pripravo agarozne injekcije, ki smo jo potrebovali za injeciranje v dukt trebušne slinavke z namenom fiksacije tkiva za lažje rezanje ter kasnejše oblikovanje kvadratnih koščkov z deli trebušne slinavke, smo v erlenmajerico dodali 0,475 g agaroze z nizkim tališčem in dolili 25 mL zunajceliče raztopine (ZRC), ki vsebuje 6 mM glukozo in 2 mM CaCl₂. Erlenmajerico smo segrevali v mikrovalovki do vrenja, premešali in postopek ponavljali, dokler se agaroza ni popolnoma stopila. S tako pripravljeno agarozo smo napolnili 5 mL brizgo. Pri tem smo bili pozorni, da v tekočini niso bili prisotni mehurčki, nanjo smo pritrdili 30 G iglo in jo do uporabe hranili v vodni kopeli (T = 40 °C). Neporabljeno agarozo smo do naslednjih eksperimentalnih dni hranili v hladilniku. Isto agarozo smo uporabili največ 5x, saj nato postane toga in trda.

3.2.2 Zunajcelična raztopina (ZCR)

Pripravili smo 6 ZCR, ki so se med seboj razlikovale v koncentraciji glukoze in koncentraciji CaCl₂. Koncentracija glukoze v nestimulatornih raztopinah je znašala 6 mM, v stimulatornih pa 9 mM. Stimulatorne in nestimulatorne raztopine so vsebovale 1, 2 ali 10 mM CaCl₂. ZRC smo namešali tako, da smo v merilno bučko odmerili 100 ml univerzalne raztopine (t.i. stok), nato smo dodali glukozo in CaCl₂ v različnih koncentracijah ter 1 mL 1 mM MgCl₂ in mlečno kislino v koncentraciji 6 mM. Dolili deonizirano vodo do 1 L.

Koncentracije snovi v univerzalni raztopini (stok) so bile naslednje: NaCl 1250 mM, KCl 25 mM, HEPES (2-[4-(hidroksietil)piperazin-1-il]etansulfonska kislina) 100 mM, NaHCO₃ 100 mM, NaH₂PO₄ 12,5 mM, Na priruvat 20 mM, myo-inositol 30 mM, askorbinska kislina 2,5 mM.

Iz vsake namešane raztopine smo prenesli 50 µL v 0,5 mL epico ter ji zmerili osmolarnost z osmometrom. Željena vrednost osmolarnosti znaša med 300 in 320 mOsm. Zaradi ohranjanja fizološkega pH-ja smo v raztopine ves čas uvajali karbogen (zračno zmes 95% O₂ ter 5% CO₂).

3.2.3 Zunajcelična raztopina s pufrom HEPES

Pripravili smo tri različne zunajcelične raztopine s pufrom HEPES (HEPES), ki so se med seboj razlikovale v koncentraciji CaCl₂ (1/2/10 mM). Koncentracije snovi so bile naslednje: NaCl 150 mM, HEPES 10mM, glukoza 6 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM. Raztopinam smo umerili pH na 7,4 z dodatkom NaOH.

V teh raztopinah (t.i. HEPES) smo shranjevali narezane rezine med barvanjem ter nato pobarvane rezine do snemanja. Med snemanjem smo jih perfundirali z zunajcelično raztopino (ZCR).

3.3 Priprava tkivnih rezin trebušne slinavke

Živali smo humano žrtvovali z izpostavitvijo prekomerni koncentraciji CO₂ in cervikalno dislokacijo. Pred začetkom eksperimenta smo žrtvovali (skupno) šest miši z namenom izolacije trebušne slinavke.

Pod stereomikroskopom smo mišji trebuh razprli z namenom dostopa do izvodil trebušne slinavke. S pinceto smo privzdignili izvodilo v okolici dvanajstnika in s peanoma zaprli dovod v glavni dukt (Vaterjevo papilo) kot prikazuje slika 7.

»58. srečanje Mladih raziskovalcev Slovenije «



Slika 7: Prikaz injiciranja agarozne raztopine v dukt trebušne slinavke (osebni arhiv)

S tem smo preprečili uhajanje agaroze iz trebušne slinavke v dvanajstnik in višje dele prebavila in tako utrdili željeno tkivo. Agarozo smo injicirali v proksimalni del žolčevoda. Napolnjena trebušna slinavka postane nabrekla in rahlo belkasta. Po končanem brizganju smo trebušno votlino takoj ohladili z 20 mL ledeno mrzle ZCR, predhodno postavljene v posodo z ledom, in agaroza se je strdila. Injicirano tkivo smo izrezali in sprali ter položili v 100 mm petrijevko z ledeno mrzlo ZCR. S secirnimi škarjami smo nato narezali približno 0,2 cm³ velike koščke tkiva trebušne slinavke in jim odstranili maščobno ter vezivno tkivo. Do 6 pripravljenih koščkov smo postavili v vrsto v 35 mm petrijevko, ki je vsebovala tekočo agarozo segreto na 40 °C ter petrijevko takoj prenesli na led, da se je agaroza strdila. Nato smo izrezali kocke agaroze, v katere so bili ujeti delci tkiva. Na označeno mesto na rezalniku (Vibratom Leica VT1000 S) smo s cianoakrilatnim lepilom pritrdili agarozne delčke. Banjico rezalnika smo napolnili z ledeno mrzlo ZCR, ki smo jo konstantno prepihovali s karbogenom ter dodali košček ledu (zamrznjena ZCR). Rezalnik za rezanje agaroznih blokov smo nastavili na hitrost med 0,05 in 1 mm/s, frekvenco 70 Hz ter debelino rezin na 140 µm. Tekom rezanja smo iz rezalnika s finim čopičem odstranili rezine in jih prenesli v petrijevko, napolnjeno z raztopino s pufrom HEPES sobne temperature, ki smo jo tekom eksperimenta večkrat zamenjali. V posebno petrijevko smo prenesli rezine, na katerih so bili pod stereolupo vidni Langerhansovi otočki. Te rezine smo nato barvali s fluorescenčnim barvilom, občutljivim na Ca²⁺.

»58. srečanje Mladih raziskovalcev Slovenije «



Slika 8: Langerhansov otoček pod stereolupo (osebni arhiv)

3.4 Barvanje vzorcev tkiva z barvilom CALBRYTETM 520 AM

Tkivne rezine smo barvali z barvilom CALBRYTETM 520 AM. Odpipetirali smo 3,75 μ L barvila, 1,25 μ L PLURONIC-a in 3,33 mL HEPES-a. Vse skupaj smo dobro zmešali do faze penjenja, potem smo raztopino vorteksirali in postavili na ultrazvočno kopel za 3 min. Tkivne rezine smo postavili v pripravljeno barvilo in jih zaščitili pred svetlobo, saj je barvilo fotolabilno. Pluronic deluje kot detergent in razrahlja fosfolipidni dvosloj, kar omogoči barvilu lažje prehajanje v znotrajcelični prostor in kasneje detekcijo dinamike znotrajcelične koncentracije kalcija z metodo CLSM. Pokrito petrijevko smo postavili na orbitalni stresalnik s hitrostjo 40 obratov min⁻¹ in rezine barvali 50 min. Nato smo jih prenesli v tri petrijevke z HEPES-om s koncentracijo CaCl₂ 1; 2; 10 mM. Rezine smo shranjevali na sobni temperaturi v HEPES-u največ 12 ur, HEPES smo zamenjali na 2 uri.

3.5 Slikanje s konfokalno lasersko vrstično mikroskopijo (CLSM)

Pred začetkom snemanja smo pobarvane tkivne rezine shranjevali v petrijevkah z raztopino s pufrom HEPES (6 mM glukoza) različnih molarnosti CaCl₂ (1; 2; 10 mM).

Za ugotavljanje vplivov kalcija na dinamiko proženja oscilacij $[Ca^{2+}]_i$ smo rezine stimulirali z uporabilo kvadratnega pulza. Iz petrijevke s HEPES raztopino, v kateri smo hranili celice, smo pod konfokalni mikroskop postavili rezino z otočkom in jo perifundirali z ZCR-jem z 6 mM

glukozo prvih pet minut poskusa. Nato smo molarnost glukoze dvignili na 9 mM, s čimer smo aktivirali celice beta, ki so se odzvale s karakterističnim vzorcem oscilacij $[Ca^{2+}]_i$. S to raztopino smo rezine perifundirali naslednjih 20 minut, nakar smo perifuzijo ponovno prestavili v 6 mM raztopino glukoze za 20 minut z namenom, da prekinemo celično aktivnost celic beta. Tak protokol smo ponovili za vse tri molarnosti raztopin kalcija (1; 2; 10 mM). Protokol prikazuje slika 9.



Molarnost CaCl₂ za vse raztopine: 1; 2; 10 mmol/L.

Slika 9: Protokol kvadratnega pulza

Po teh ugotovitvah smo zasnovali še kalcijev stopničast protokol, katerega namen je bil neposredno meriti vplive v ZCR raztopljenih kalcijevih ionov na dinamiko koncentracij $[Ca^{2+}]_i$ v celicah beta ter možne vplive predhodne koncentracije Ca^{2+} v raztopini na odgovor, ko celico perifundiramo že z drugo raztopino. Vse celice smo na začetku pet minut perifundirali v 6 mM glukozi z 2 mM CaCl₂. Sledila je trikrat po petnajstminutna perifuzija s tremi različnimi molarnostmi kalcija v zunajcelični raztopini (1, 2, 10 mM CaCl₂; 10, 1, 2 mM CaCl₂ in 2, 1, 10 mM CaCl₂). Protokol prikazuje slika 10.

»58. srečanje Mladih raziskovalcev Slovenije «



2 mmol/L	1 mmol/L	2 mmol/L	10 mmol/L
	10 mmol/L	1 mmol/L	2 mmol/L
	2 mmol/L	1 mmol/L	10 mmol/L

Molarnost CaCl2:

Slika 10: Kalcijev stopničasti protokol

Za namen zajemanja sprememb celic beta trebušne slinavke smo si pomagali z metodo konfokalne mikroskopije. Tako smo posneli značilne oscilacije [Ca²⁺]_i, katere smo analizirali in pridobili parametre za opis dinamike oscilacij [Ca²⁺]_i, kot so dolžina oscilacij, frekvenca oscilacij in aktivni čas posameznih celic znotraj otočka. Snemanje otočkov smo opravili na dveh mikroskopih: pokončnem konfokalnem mikroskopu Leica TCS SP5 AOBS Tandem II (20x vodni objektiv Leica HCX APO L, NA = 1,0) in pokončnem konfokalnem mikroskopu LEICA STELLARIS 8 FALCON DIVE. Uporabljeno barvilo CalbryteTM AM smo vzbudili z argonskim laserjem pri valovni dolžini 488 nm, čigar moč smo prilagodili dolžini posnetkov in se tako izognili pojavu fotobeljenja, kljub maksimalnemu ekscitiranju barvila. Oddano fluorescenco zbira hibridni detektor Leica (HyD) znotraj valovnih dolžin (500 - 700) nm. Optično rezino smo nastavili tako, da je bilo omogočeno zajemanje pod površinsko plastjo otočka (globina vsaj 15 µm), s čimer smo se izognili zgornji plasti celic, ki bi lahko bila mehansko poškodovana zaradi rezanja. Serije posnetkov smo zajemali z ločljivostjo 256 x 256 slikovnih pik s frekvenco zajemanja 10 Hz. Premer zaslonke konfokalnega mikroskopa se je gibal med $(150 - 200) \mu m$ in je tako omejil debelino snemane regije na 5 – 10 μm (povprečna dimenzija celic beta). Takšna nastavitev nam je omogočila zajemanje signala iz ene plasti celic, prav tako smo na ta način glede na debelino rezine zaznavali najmočnejši možen signal. Pred in po zajemanju smo posneli visoko-resolucijski sliki (1024 x 1024 slikovnih pik), s katerima smo določili morebitne premike rezine med snemanjem pri analizi posnetkov, z njima smo si pomagali tudi pri označevanju celic znotraj otočka pri analizi posnetkov. Za nestimulatorno ZRC je bila v vseh snemanjih izbrana 6 mM glukoza. Za stimulatorno raztopino pa je bila

izbrana 9 mM glukoza s spremenljivimi koncentracijami Ca²⁺ glede na protokol (1 mM; 2mM; 10 mM).

3.6 Analiza posnetkov

Po snemanju smo v namen pridobitve rezultatov dinamike [Ca²⁺]_i pregledali vse posnetke ter izbrali območja interesa (angl. *Region of interest*, ROI) v obliki elipse (program ImageFiltering, avtorske pravice Denis Špelič). Posamezno območje je zajemalo 1 aktivno celico beta. Na vseh posnetkih smo celice ročno označili in podatke izvozili z uporabo prilagojene programske opreme.



Slika 11: Tkivni preparat Langerhansovega otočka trebušne slinavke. S konfokalnim mikroskopom posnet Langerhansov otoček, v katerem so celice napolnjene z od kalcija odvisnim barvilom (20x povečava). Z rdečimi elipsami so označene 4 celice beta (območja interesa) (osebni arhiv).

Program je izračunal povprečje zaznane fluorescence celotne regije v odvisnosti od časa. To bazo podatkov smo nato analizirali v programu MatLab (The MathWorks Inc (2022)). Izločili smo vse regije s preslabim razmerjem med signalom in šumom, kar je lahko posledica premikov posnetka, fotobeljenja ipd. Vsaki časovni vrsti smo določili začetke in konce oscilacij. Na podlagi tako dobljenih rezultatov smo določili aktivni čas (integral deleža časa, ki ga zasedajo

oscilacije) (AT) kalcijevih oscilacij v fazi platoja, kar v matematičnem pomenu predstavlja produkt frekvence in dolžine. Določili smo tudi frekvenco oscilacij ter njihovo dolžino na polovici amplitude.



Slika 12: Shematska upodobitev analiziranih parametrov. Dolžina oscilacij na polovici maksimalne amplitude (A), število oscilacij na minuto, izraženo kot frekvenca oscilacij (B) in odstotek oz. delež aktivnega časa, ponazorjen s črnimi pasovi (C) (Stožer in sod., 2021).

3.7 Statistična analiza obdelanih podatkov

Statistično analizo smo izvedli v programu SPSS (IMB Corp. (2022). version 29.0. Armonk, NY). Shapiro-Wilk test smo uporabili za ugotavljanje normalne porazdelitve podatkov. Kadar je p > 0,05, je spremenljivka porazdeljena normalno. Naše spremenljivke niso bile porazdeljene normalno, zato smo razlike med skupinami (eno skupino nam je predstavljala ena koncentracija Ca^{2+}) dokazovali z izvedbo neparametričnega Kruskal-Wallis H-testa. Nato smo za podkrepitev podatkov izvajali tudi parne primerjave med tretmaji s *post hoc* Dunnovim testom z Bonferronijevim popravkom. Razlika med skupinama je statistično pomembna, če je p < 0,05.

Statistično značilne vrednosti so na grafih označene sledeče: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 in **** p < 0,0001. Grafe smo izrisali s programom GraphPad Prism 10.1.0 (316). Kot podatek, ki najbolj opisuje vrednost skupine za posamezen parameter, smo uporabili mediano, navedli smo tudi medčetrtinski razmik (IQR), ki predstavlja razliko med tretjim kvartilnom (Q₃) in prvim kvartilom (Q₁).

4 REZULTATI

V nalogi smo se osredotočili na odziv celic beta Langerhansovih otočkov trebušne slinavke mišjih samcev linije NMRI na spremembo koncentracije glukoze v odvisnosti od različnih koncentracij Ca²⁺ v zunajcelični raztopini. Odziv tipične celice beta sestoji iz faze aktivacije, platoja in deaktivacije. V analizi rezultatov smo se osredotočali na plato fazo odziva. Protokole snemanja smo ločili na kvadratne pulze, kjer smo med snemanjem spreminjali zgolj koncentracijo glukoze ob konstantni koncentraciji Ca²⁺, ter kalcijeve stopničaste protokole, kjer smo spreminjali koncentracijo Ca²⁺ zunajcelične raztopine in je bila koncentracija glukoze konstantna. Analizirali smo 14 otočkov za protokol »kvadratni pulz« s celičnim odzivom ter 12 otočkov za »stopničasti protokol«. V teh so se celice odzvale na povišanje koncentracije glukoze iz 6 mM na 9 mM z značilnimi oscilacijami [Ca²⁺]_i. Podatke stopničastih protokolov ter kvadratnega pulza smo analizirali ločeno.

Da bi izmerili spremembo v odzivu celic beta na tretma z zunajcelično raztopino z različnimi koncentracijami Ca^{2+} in 9 mM glukoze, smo s pomočjo konfokalne mikroskopije pridobili podatke o dinamiki oscilacij $[Ca^{2+}]_i$. Primer takšnega odziva pri stopničastem protokolu je prikazan na sliki 13.



Slika 13: Oscilatorna sprememba celice beta, zaznana pri različnih koncentracijah Ca²⁺. Celice beta se na dražljaj z raztopino stimulatorne koncentracije glukoze (9 mM) z različnimi koncentracijami Ca²⁺ odzovejo z oscilatorno spremembo znotrajcelične koncentracije [Ca²⁺]_i.

4.1 Kvadratni pulz

Iz posnetkov kvadratnih pulzov smo dobili 10081 podatkov, ki predstavljajo skupno število zaznanih oscilacij $[Ca^{2+}]_i$. Oscilacije smo ločili po koncentracijah Ca^{2+} v zunajcelični raztopini z 9 mM glukoze med snemanjem. Tako smo dobili tri skupine podatkov ter za vsako določili aktivni čas, frekvenco in dolžino oscilacij. 2671 oscilacij je ustrezalo koncentraciji Ca^{2+} je 1 mM, 5235 koncentraciji 2 mM in 2175 koncentraciji 10 mM. S Shapiro-Wilkovim testom smo po skupinah analizirali normalnost porazdelitve podatkov za vse tri parametre. S Kruskal-Wallis H-testom smo izvedli primerjavo podatkov in preverili statistično pomembnost razlike med skupinami za vse parametre. Mediana vrednost aktivnega časa po draženju z zunajcelično raztopino z 9 mM glukoze in 1 mM Ca^{2+} je znašala 0,28 (IQR = 0.33), po draženju z ZCR z 9 mM glukoze in 2 mM Ca^{2+} se je mediana znižala na vrednost 0.22 (IOR = 0.18), najnižja vrednost mediane pa je bila pri tretmaju z ZCR z 9 mM glukoze in 10 mM Ca²⁺, kjer je znašala 0.1 (IQR = 0.17). Statistične razlike so bile med vsemi skupinami statistično pomembne (p < 10,0001), kot prikazuje slika 14 A. Mediana vrednost dolžine oscilacij (s) po draženju z zunajcelično raztopino z 9 mM glukoze in 1 mM Ca²⁺ je znašala 1.41 (IQR = 1.31), po draženju z ZCR z 9 mM glukoze in 2 mM Ca^{2+} se je mediana zvišala na vrednost 4.14 (IQR = 5.18), vrednost mediane pri tretmaju z ZCR z 9 mM glukoze in 10 mM Ca^{2+} pa je znašala 2.2 (IQR = 1.2). Razlike so bile med vsemi skupinami statistično značilne (p < 0,0001), kot prikazuje slika 14 B. Mediana vrednost frekvence oscilacij (min⁻¹) po draženju z zunajcelično raztopino z 9 mM glukoze in 1 mM Ca^{2+} je znašala 9.1 (IOR = 14.33), po draženju z ZCR z 9 mM glukoze in 2 mM Ca^{2+} se je mediana znižala na vrednost 2.91 (IQR = 2.07), najnižja vrednost mediane je bila pri tretmaju z ZCR z 9 mM glukoze in 10 mM Ca^{2+} , kjer je znašala 2.30 (IOR = 3.45). Statistične razlike so bile med vsemi skupinami statistično pomembne (p < 0.0001), kot prikazuje slika 14 C.



Slika 14: Dinamika znotrajcelične koncentracije kalcijevih ionov v celicah beta v odvisnosti od koncentracije kalcijevih ionov v zunajcelični raztopini z 9 mM glukoze. Slika prikazuje aktivni čas (A), dolžino $[Ca^{2+}]i$ oscilacij (B) in frekvenco oscilacij (C) pri kvadratnih pulzih. Zbrali smo podatke 10081 oscilacij, pridobljenih iz 14 otočkov iz 6 živali. Podatki so prikazani v obliki škatel z brki, kjer škatla prikazuje interkvartilni razpon in mediano vrednost, brki pa oceno raztrosa podatkov. **** p < 0.0001 (enosmerna ANOVA na rangih, post hoc Dunnova metoda)

4.2 Kalcijev stopničasti protokol

Iz posnetkov za kalcijevih stopničastih protokolov smo dobili 18777 podatkov za analizo aktivnega časa in frekvence ter 19083 podatkov za dolžine oscilacij. Podatke smo ločili po koncentracijah Ca^{2+} v zunajcelični raztopini z namenom pridobitve treh skupin podatkov, katerim smo določali aktivni čas, frekvenco in dolžino oscilacij. 7738 oscilacij je ustrezalo koncentraciji 1 mM Ca^{2+} , 8185 koncentraciji 2 mM in 3160 koncentraciji 10 mM. S Shapiro-Wilk testom smo po skupinah analizirali normalnost porazdelitve podatkov za vse tri parametre. S Kruskal-Wallisovim H-testom smo preverili statistično pomembnost razlike med skupinami. Mediana vrednost aktivnega časa po draženju z ZCR z 9 mM glukoze in 2 mM Ca^{2+} se je mediana zvišala na vrednost 0.26 (IQR = 0.26), najnižja vrednost mediane aktivnega časa pa je bila pri tretmaju z ZCR z 9 mM glukoze in 10 mM Ca^{2+} , kjer je znašala 0.12 (IQR = 0.18). Razlika med vsemi skupinami je statistično značilna (p < 0,0001), kot prikazuje slika 15 A. Mediana vrednost dolžine oscilacij (s) je znašala 2,12 pri stimulaciji celic z ZCR z 9 mM

glukoze in 1 mM Ca²⁺ (IQR = 2.68), pri stimulaciji celic z ZCR z 9 mM glukoze in 2 mM Ca²⁺ se je mediana vrednost podaljšala na 2,93 (IQR = 3.74), pri tretmaju z ZCR z 9 mM glukoze in 10 mM Ca²⁺ je mediana vrednost znašala 2.12 (IQR = 1.52). Razlika je bila statistično značilna (p < 0,0001) med 1 mM Ca²⁺ in 2 mM Ca²⁺ ter med vrednostma 2 mM Ca²⁺ in 10 mM Ca²⁺ (p < 0,0001), medtem ko je bila med skupinama 1 mM Ca²⁺ in 10 mM Ca²⁺ razlika statistično nepomembna (p > 0,05). Kot prikazuje slika 15 B je mediana vrednost frekvence oscilacij [Ca²⁺]_i (min⁻¹) znašala 3,645 (IQR = 7.44) (Ca²⁺ 1 mM), 3,375 (IQR = 8.08) (Ca²⁺ 2 mM) in 2,688 (IQR = 3.90) (Ca²⁺ 10 mM). Statistično značilne razlike (p < 0,0001) lahko potrdimo med vrednostma 1 mM Ca²⁺ in 2 mM Ca²⁺ ter med 2 mM Ca²⁺ in 10 mM Ca²⁺, medtem ko med skupinama 1 mM Ca²⁺ in 2 mM Ca²⁺ ne moramo potrditi statistično značilnih razlik (p > 0,05). Rezultate prikazuje slika 15 C.



Slika 15: Dinamika znotrajcelične koncentracije kalcijevih ionov v celicah beta v odvisnosti od koncentracije kalcijevih ionov v zunajcelični raztopini z 9 mM glukoze. Slika prikazuje aktivni čas (A), dolžino oscilacij (B) in frekvenco oscilacij (C) pri stopničastem protokolu. Zbrali smo podatke 18777 oscilacij za analizo aktivnega časa in frekvenc ter 19083 oscilacij za analizo dolžin oscilacij pridobljenih iz 12 otočkov iz 6 živali. Podatki so prikazani v obliki škatel z brki, kjer škatla prikazuje interkvartilni razpon in mediano vrednost, brki pa oceno raztrosa podatkov. **** p < 0.0001 (enosmerna ANOVA na rangih, post hoc Dunnova metoda)</p>

5 RAZPRAVA

Akutna tkivna rezina trebušne slinavke je unikaten preparat *in situ*, saj je ohranjena medcelična komunikacija in struktura tkiva. Narejenih je znatno manj sprememb ob pripravi tkiva na snemanje kot v primeru proučevanju izoliranega otočka v tipičnih raziskavah *in vitro*. S snemanjem spremembe $[Ca^{2+}]_i$ celic v celotni rezini hkrati z uporabo konfokalne laserske mikroskopije (CLSM) lahko proučujemo kalcijeve signale na večjem številu endokrinih in eksokrinih celic hkrati. Število žrtvovanih živali, potrebnih za izvedbo eksperimenta, je nižje zaradi snemanja večjega števila tkivnih rezin, ki vsebujejo Langerhansove otočke, pridobljenih iz posamezne živali ter sočasnega zajemanja signala velikega števila celic. Metoda tkivne rezine je bila vpeljana leta 2003 (Speier & Rupnik, 2003), leta 2013 pa je bila prvič uporabljena za snemanje spreminjanja $[Ca^{2+}]_i$ kot odziv celic na glukozo v primerjavi s spreminjanjem membranskega potenciala (Stožer in sod., 2013).

V naši raziskovalni nalogi smo proučevali vpliv različnih koncentracij Ca²⁺ v ZCR na odziv celic beta trebušne slinavke ob stimuliranju z 9 mM glukozo. Na to temo še ni bilo narejenih veliko raziskav. Nam sorodna raziskava, ki sta jo leta 1992 objavila P. Gilon in J. C. Henquin, je proučevala vpliv 1 mM, 2,5 mM in 10 mM Ca²⁺ v zunajcelični raztopini na spremembo membranskega potenciala, spremembo koncentracije NAD(P)H-ja ter spremembo [Ca²⁺]_i pri mišjih samicah ob spremembi koncentracije glukoze iz 3 mM na 15 mM. Ob 1 mM Ca²⁺ oscilacij membranskega potenciala niso zaznali, zaznana je bila konstantna depolarizacija (brez faze repolarizacije). Pri 10 mM Ca²⁺ je bila frekvenca oscilacij nižja v primerjavi s kontrolo (2.5 mM Ca^{2+}) , saj je bila faza mirovanja daljša. Frekvenca oscilacij $[Ca^{2+}]_i$ pri 2.5 mM Ca²⁺ je znašala 2,5 \pm 0,3 min⁻¹ in pri 10 mM Ca²⁺ 0,6 \pm 0,05 min⁻¹. Mehanizmov delovanja, ki bi pojasnili opažene pojave, niso znali razložiti (Gilon & Henguin, 1992). Junija je svoje ugotovitve predstavila še R. M. Santos s sodelavci (Santos, in sod., 1992). Natančneje pa je mehanizem v svoji študiji leta 1997 predstavila T. R. Chay. Predstavila je teoretični model vpliva različnih koncentracij Ca^{2+} na membranski potencial, koncentracijo $[Ca^{2+}]_i$ in $[Ca^{2+}]_{lum}$. Predvideva, da se frekvenca oscilacij vseh treh parametrov z višanjem koncentracije Ca²⁺ v zunajcelični raztopini niža, podaljša se faza mirovanja ter pride do porasta povprečne amplitude oscilacij (Chay, 1997). Na opisane raziskave smo se opirali pri načrtovanju našega dela in pri postavljanju hipotez.

Rezultati protokolov kvadratnega pulza so pokazali, da sta bila frekvenca in aktivni čas najvišja pri 1 mM Ca²⁺ in sta padala z višanjem koncentracije Ca²⁺ v zunajcelični raztopini. Razlike med rezultati pri različnih koncentracijah Ca^{2+} so bile močno statistično značilne (p < 0,0001). Frekvenca z naraščanjem koncentracije pada, ker je faza mirovanja daljša. Višja kot je koncentracija Ca²⁺ v zunajcelični raztopini, večja je namreč hiperpolarizacija, zato je potrebno več časa, da nastane dovolj velika količina ATP-ja, da se celica ponovno depolarizira, ter se odprejo Ca²⁺ kanali in prožijo nove oscilacije. Naši rezultati se skladajo z modelom poteka kalcijevih oscilacij, ki ga je v svoji študiji opisala T. R. Chay (Chay, 1997). Poznanih je več vrst oscilacij, odziv izoliranih celic beta namreč ni enak odzivu celic, ki so del otočka, saj so te v otočkih med seboj električno in funkcionalno sklopljene. Oscilacije izoliranih celic so pogosto počasnejše, medtem ko so oscilacije celic v otočku hitrejše (1-6 min⁻¹). Hitrejši vzorec tudi prevladuje v preparatih in situ (Idevall-Hagren & Tengholm, 2020). Naši rezultati se od rezultatov študije P. Gilon in J. C. Henquin, kjer so uporabili enako linijo miši kot v naši raziskavi, razlikujejo le pri 1 mM Ca²⁺. Tudi v njuni študiji je frekvenca padla pri 10 mM Ca²⁺ v primerjavi z 2,5 mM Ca²⁺ (mi smo uporabljali 2 mM Ca²⁺). Do razlike pri 1 mM Ca²⁺ je najverjetneje prišlo zaradi nenatančnosti v njuni raziskavi uporabljene metode merjenja koncentracije [Ca2+]i, saj se je frekvenca oscilacij membranskega potenciala pri 1 mM Ca2+ zvišala, koncentracija $[Ca^{2+}]_i$ pa je ostala konstantna. Dolžina oscilacij je bila pri koncentraciji $Ca^{2+} 2 mM v$ primerjavi s koncentracijo 10 mM daljša. Razlika je bila statistično značilna (p < 0,0001). Spremembo lahko razložimo z modelom T. R. Chay. Zaradi višje koncentracijske razlike v Ca^{2+} med okolico in celico pri 10 mM Ca^{2+} je Ca^{2+} hitreje difundiral v celico ob odprtju Ca^{2+} kanalov, visoka koncentracija $[Ca^{2+}]_i$ je povzročila hitro odprtje od $[Ca^{2+}]_i$ odvisnih K⁺ kanalov ter hitro zaprtje Ca^{2+} kanalov, zato je koncentracija $[Ca^{2+}]i$ tako hitro, kot je narasla, tudi padla (naklon krivulje je bil zelo strm) in dolžina oscilacije je bila majhna. Vendar nas je presenetilo, da je bila dolžina oscilacij v 2 mM Ca²⁺ daljša tudi v primerjavi z 1 mM Ca²⁺, saj bi po modelu T. R. Chay pričakovali obratno. Za pojasnitev točnih molekularnih mehanizmov, ki stojijo za to spremembo (da je dolžina oscilacij največja pri 2 mM Ca²⁺ in ne pri 1 mM), bi bilo potrebno v prihodnosti narediti dodatne raziskave na področju komunikacije celic beta in poteka oblikovanja celičnega odgovora ob stimuliranju z medijem s povišano koncentracijo glukoze.

Rezultati stopničastih protokolov po skupinah (trend spremembe v odzivu pri perifuziji z raztopinami z različnimi koncentracijami Ca²⁺) za dolžino oscilacij so bili enaki rezultatom pri

kvadratnem pulzu. Tudi trend pri rezultatih frekvence oscilacij se je skladal s trendom pri kvadratnem pulzu. Razlika je nastala pri primerjavi koncentracije 1 mM Ca²⁺ z 2 mM Ca²⁺, saj je bila razlika v frekvencah minimalna in ni bila statistično pomembna (p > 0.05). To dokazuje, da rezultatov stopničastega protokola ne moremo enačiti z rezultati kvadratnega pulza. Pri stopničastem protokolu smo namreč tekom poskusa spreminjali tudi koncentracijo Ca²⁺, zato bi lahko predhodna koncentracija Ca^{2+} v raztopini imela vpliv na odziv celic tudi takrat, ko jih perifundiramo že z naslednjo raztopino. Če želimo proučevati zgolj vpliv koncentracije Ca²⁺ na odziv, je zato primerneje, da se opiramo na rezultate kvadratnega pulza, saj je bila koncentracija Ca²⁺ v tistih protokolih edina spremenljivka. Pričakovano je, da je do največjega odstopanja prišlo ravno pri 1 mM Ca²⁺, saj je možno, da je v raztopini v kamrici pod mikroskopom še vedno bila prisotna višja koncentracija Ca^{2+} in se je celica bolj hiperpolarizirala, kot pa če bi bila koncentracija Ca²⁺ 1 mM, posledica česar je daljša faza mirovanja in nižja frekvenca. Zato smo opazili največje odstopanje pri prestavljanju celic iz višjih koncentracij Ca²⁺ v nižio, sai se verjetno Ca²⁺ ni dovolj hitro odstranil in prepral iz kamrice pod mikroskopom. Zelo kritičen je bil predvsem protokol 10, 1, 2, saj je bila razlika v koncentraciji Ca²⁺ ob prvi menjavi raztopin izjemno visoka. Prav tako je koncentracija 10 mM veliko višja od fiziološke koncentracije 1 mM, zato obstaja možnost, da je v celicah med perifuzijo z 10 mM Ca²⁺ prišlo tudi do fizioloških sprememb, ki so se izrazile kasneje tudi ob perifuziji z raztopinami z nižjo koncentracijo Ca²⁺. Možna razlaga spremenjenega odziva celic na nadaljnje koncentracije Ca²⁺ je tudi povečanje koncentracije Ca^{2+} znotraj endoplazemskega retikuluma med perifuzijo z 10 mM Ca²⁺, kar bi imelo vpliv na celični odziv pri nadaljevanju snemanja. Zanimivo dogajanje, ki smo ga opazili, bi lahko podkrepili z nadaljnjo analizo protokolov 1, 2, 10; kjer bi proučili vpliv zaporedno naraščajoče koncentracije kalcija pri stopničastem protokolu v primerjavi s kvadratnim pulzom. Ločeno bi bilo smiselno proučiti tudi protokole 10, 1, 2; kjer bi pričakovali še večja odstopanja rezultatov v primerjavi z rezultati kvadratnih pulzov. Zaradi nižje frekvence oscilacij pri 1 mM Ca²⁺ je bil nižji tudi aktivni čas celic pri tej skupini. Aktivni čas grafično predstavlja produkt frekvence in dolžine oscilacij, zato je pričakovano ob zmanjšanem enem faktorju (frekvenca oscilacij) zmanjšan tudi produkt (aktivni čas). Aktivni čas pri 2 mM Ca²⁺ je bil v skladu z rezultati kvadratnega pulza daljši v primerjavi z 10 mM Ca²⁺.

Čeprav obstajajo nekatere pomembne razlike, so Langerhansovi otočki pri miših in ljudeh v veliki meri podobni tako po strukturi kot funkciji (Dolenšek in sod., 2015). Zato so podatki, pridobljeni iz mišjih modelov v eksperimentih, zelo pomembni in imajo močno translacijsko

vrednost. Ti nam pomagajo razumeti funkcionalne spremembe, disfunkcijo celic beta ter mehanizme razvoja sladkorne bolezeni pri ljudeh. Kljub temu pa ugotovitev, pridobljenih na kateremkoli živalskem modelu, ne moremo neposredno prenesti na človeka, kar je glavna omejitev naše raziskave. V prihodnje bi tako lahko raziskavo nadgradili z meritvami na tkivu človeških donorjev.

Prvo hipotezo, ki predpostavlja, *da se bodo celice ob spremembi koncentracije glukoze v zunajcelični raztopini iz 6 mM na 9 mM odzvale z oscilatorno spremembo*, lahko v celoti potrdimo. Ob spremembi koncentracije glukoze iz nestimulatorne vrednosti (6 mM) v stimulatorno vrednost (9 mM) so se snemane celice beta odzvale z značilnimi oscilacijami v vseh ponovitvah izbranih protokolov (neodivsno od koncentracije Ca²⁺ v zunajcelični razotpini), vendar smo opazili razlike med odzivi (spremembe v frekvenci oscilacije, njihovih dolžinah in aktivnem času).

Drugo hipotezo, ki predpostavlja, da se bodo celice beta na spremembo koncentracije Ca^{2+} ionov v zunajcelični raztopini odzvale s spremenjeno dinamiko oscilacij znotrajcelične koncentracije Ca^{2+} (pri višji koncentraciji Ca^{2+} se bodo odzvale z nižjim aktivnim časom, pri nižji koncentraciji pa z višjim aktivnim časom Ca^{2+} oscilacij), lahko na podlagi rezultatov kvadratnega pulza potrdimo. Pri statistični analizi skupin rezultatov kvadratnega pulza smo ugotovili, da je pri parnih primerjavah med vsemi skupinami (1 mM Ca²⁺ - 10 mM Ca²⁺, 1 mM $Ca^{2+} - 2 mM Ca^{2+}$, 2 mM $Ca^{2+} - 10 mM Ca^{2+}$) bila razlika statistično značilna za vse proučevane parametre (dolžina oscilacij, aktivni čas ter frekvenca). Dokazali smo, da celice beta ob različnih koncentracijah Ca²⁺ ionov v zunajcelični raztopini oblikujejo različen celični odgovor v smislu značilnih oscilacij [Ca²⁺]_i, kljub temu da jih perifundiramo z enako koncentracijo glukoze. Celice so izločale različne količine inzulina, saj je bil njihov aktivni čas (ki je določen kot produkt med dolžino oscilacij in njihovo frekvenco) različen. Dokazali smo tudi, da frekvenca oscilacij, zaradi daljšega časa mirovanja pada z višanjem koncentracije Ca²⁺ ionov v raztopini. S stopničastimi protokoli smo dokazali, da sprememba koncentracije Ca²⁺ tekom snemanja ni zanemarljiva in da ima predhodna koncentracija Ca²⁺ vpliv na celični odgovor tudi ob proučevanju v naslednji (drugi koncentracij), kar je verjetno privedlo do nekolikšnega odstopanja rezultatov v primerjavi z rezultati kvadratnega pulza. Opažen fenomen nam nakazuje, da imajo celice beta neke vrste celični spomin, kjer se učinek predhodne koncentracije kalcija ohrani tudi pri naslednji.

V prihodnje bi bilo potrebno narediti še več raziskav različnih kalcijevih stopničastih protokolov in ločeno proučiti razlike med njimi. Predvsem če prihaja do večjih razlik v primerjavi s kvadratnim pulzom pri protokolu »10 mM $Ca^{2+} \rightarrow 1$ mM $Ca^{2+} \rightarrow 2$ mM $Ca^{2+} \ll kot$ pa pri protokolu »1 mM Ca²⁺ \rightarrow 2 mM Ca²⁺ \rightarrow 10 mM Ca²⁺, saj pri prvem koncentracija Ca²⁺ v zunajcelični raztopini pada pri drugem pa narašča. Celice otočkov stimuliranih s kvadratnimi pulzi so bile najbolj aktivne pri fiziološki koncentraciji Ca²⁺ (1 mM), zato bi bilo morda smiselno spodbuditi druge raziskovalce, da zasnujejo svoje preizkuse, kjer uporabljajo protokol za stimulacijo celic beta pri takšnih koncentracijah kalcija v zunajcelični raztopini. Za proučevanje se namreč trenutno uporabljajo raztopine z višjimi koncentracijami Ca²⁺ (2-2,5 mM). Pomembno je, da se ohrani primerljivost rezultatov posameznih študij, kar lahko dosežemo le, če so bile v poskusih uporabljene enake raztopine. Z našo raziskavo smo dokazali, da ima koncentracija Ca²⁺ v zunajcelični raztopini vpliv na odziv celic, tudi če so ostale spremenljivke konstantne. Dejstvo, da je koncentracija Ca²⁺ med 2-2,5 mM standard za proučevanje celic beta, lahko razlagamo z dejstvom, da so v tej raztopini imele oscilacije največjo dolžino in še vedno dokaj visoko frekvenco ter aktivni čas (v primerjavi z 10 mM Ca^{2+}) in je bilo zato v teh pogojih najlažje v bazičnih raziskavah proučevati njihovo delovanje. Na podlagi izsledkov naše raziskave smatramo, da bi bilo smiselno prilagoditi koncentracije Ca²⁺ v zunajcelični raztopini in jih približati bolj fiziološkim koncentracijam, saj bi lahko na ta način dosegli večjo translacijsko vrednost bazičnih raziskav o delovanju Langerhansovih otočkov in celic beta. V prihodnje bi bilo potrebno proučiti tudi vpliv različnih koncentracij Ca²⁺ v zunajceličnih raztopinah na različnih mišjih modelih, saj bi se lahko tudi med temi pokazale značilne razlike v dinamiki znotrajceličnih oscilacij kalcijevega iona celic beta, kot tudi ugotovitve naše raziskave preveriti na človeških otočkih.

6 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Raziskovalne naloge smo se lotili z osnovnimi načeli družbene odgovornosti. Inzulin velja vse od njegovega odkritja naprej za enega najbolj proučevanih hormonov, predvsem v povezavi z razvojem platform za zdravljenje sladkorne bolezni in proučevanjem vzroka njenega nastanka (Boron & Boulpeap, 2012). Za sladkorno boleznijo oboleva že skoraj 10% svetovne populacije, pogostost bolezni pa zaradi nezdravega načina življenja in staranja prebivalstva raste, breme na zdravstvene ustanove pa se neprestano povečuje (Kelc in sod., 2019). Za raziskovanje fizioloških sprememb, ki nastanejo kot posledica tega sindroma, se pogosto uporabljajo živalski modeli, ki so kljub mnogim minimalnim razlikam v morfologiji, fiziološko dovolj podobni človeškim modelom, da se lahko izsledki raziskav prenesejo na človeški model (Dolenšek in sod., 2015).

Metoda tkivne rezine, ki smo jo uporabili v naši raziskavi, se za proučevanje odziva celic beta na porast glukoze uporablja od leta 2013 (Stožer in sod., 2013). Omogoča proučevanje različnih eksokrinih in endokrinih celic trebušne slinavke v njihovem naravnem okolju, saj ni potrebna izolacija proučevane celice od okoliškega tkiva. Zaradi snemanja več celic hkrati je žrtvovanih živali za eksperimentalne namene manj, zato želimo tudi druge spodbuditi k uporabi te metode.

Z našo raziskavo poudarjamo pomembnosti nadaljnjih bazičnih raziskav v smeri določanja optimalnega okolja, ki bi bilo čim bolj podobno fiziološkemu okolju, za proučevanja aktivnosti celic beta. Pomembno je da proučevano okolje omogoča optimalno delovanje celic, saj lahko tako proučujemo njihove odzive na različne spremembe. Z osnovano učinkovito platformo proučevanja pa lahko v prihodnosti učinkoviteje izvedemo aplikativne raziskave, kot so razvoj novega zdravila za zdravljenje sladkorne bolezni ter proučevanje sprememb v delovanju trebušne slinavke, ki so posledica prisotnosti metabolnega sindroma.

7 ZAKLJUČEK

V raziskovalni nalogi smo proučevali vpliv različnih koncentracij Ca²⁺ v zunajcelični raztopini na odziv celic beta trebušne slinavke miši. S konfokalnim laserskim mikroskopom smo merili spreminjanje koncentracije $[Ca^{2+}]_i$ v celicah beta med perifuzijo z različnimi raztopinam po protokolih. Ločili smo dve vrsti protokola: kvadratni pulz ter stopničasti protokol. Razliko med rezultati protokolov pripisujemo vplivu predhodne koncentracije Ca²⁺ v raztopini, tudi ob snemanju z naslednjo (drugačno koncentracijo Ca²⁺). Večji pomen pripisujemo rezultatom kvadratnih pulzov, ker se je pri tem protokolu spremenila samo koncentracija glukoze iz nestimulatorne v stimulatorno (koncentracija Ca²⁺ v zunajcelični raztopini pa se tekom snemanja ni spreminjala). Predvidevamo, da so odzivi, ki smo jih pri pulzih zasledili, posledica zgolį spremembe koncentracije Ca²⁺ ionov v zunajcelični raztopini. Aktivni čas je bil najvišji pri celicah, ki so bile perifundirane z 1 mM Ca²⁺ v zunajcelični raztopini, torej vrednosti bližje fiziološki koncentraciji Ca²⁺ v zunajceličnem prostoru (medceličnini). Aktivni čas kalcijevih oscilacij je produkt med njihovo frekvenco in dolžino in je dober pokazatelj aktivnosti celic in njihove sekrecije inzulina, zato predlagamo, da se v nadaljnjih študijah, ki se bodo uporabljale v namene proučevanja delovanja celic beta oz. njihovega delovanja v odvisnosti od drugih spremenljivk, uporablja zunajcelična raztopina, ki vsebuje bolj fiziološke vrednosti Ca²⁺, torej vrednosti blizu 1 mM. Zavedamo se, da z uvedbo te spremembe ne bi mogli več primerjati rezultatov novih raziskav s starimi, kjer so uporabljali vrednosti Ca²⁺ med 2-2,5 mM, zato je potrebno, da smo pri uvajanju sprememb previdni. Dolžina oscilacij je pri 2-2,5 mM Ca²⁺ daljša in prav to je bil verjetno razlog za uporabo te koncentracije pri izvedbi bazičnih raziskav v preteklosti. Zaradi večje dolžine oscilacije je bilo namreč te lažje zaznati in preučevati. Sklep podpiramo z ugotovitvijo, da so imele predhodne študije težave pri zaznavanju oscilacij v 1 mM Ca²⁺, saj zaradi njihove visoke frekvence in nizke dolžine izgledajo tudi kot šum. Stari mikroskopski sistemi tudi niso dovoljevali snemanja z visokimi frekvencami, kot to omogočajo novejši konfokalni sistem (Gilon & Henquin, 1992; Santos in sod., 1992). Pomembno se nam zdi poudariti, da tudi če se bodo 2-2,5 mM koncentracije Ca²⁺ uporabljale še v prihodnosti, se moramo zavedati, da snemanega odzivna ne moremo enačiti z odzivom v telesu, saj je v živih organizmih koncentracija Ca²⁺ močno uravnavana na 1,1-1,4 mM (Douglas & Beierwaltes, 2012) in je zato odziv celic in izločena celokupna količina inzulina najbolj podobna tisti, ki jo izmerimo ob proučevanju z raztopinami s koncentracijo Ca²⁺, ki je čim bližje fiziološkim vrednostim.

8 VIRI

- Arora in sod. (2021). Free fatty acid receptor 1: a ray of hope in the therapy of type 2 diabetes mellitus. *Inflammopharmacology*, 1625-1639. Pridobljeno 7. 10 2021 iz https://www.researchgate.net/figure/Mechanism-of-insulin-secretion-from-beta-cells-of-pancreas_fig2_355443328
- Boron, F., & Boulpeap, L. (2012). *Medical physiology, second edition*. Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Britannica. (18. 8 2023). *Pancreatitis*. Pridobljeno iz Britannica: https://www.britannica.com/science/pancreatitis

Campbell in sod. (2011). Cambell Biology (9th Edition). Boston: Benjamin Cummings.

- Chay, T. R. (9 1997). Effects of Extracellular Calcium on Electrical Bursting and Intracellular and Luminal Calcium Oscillations in Insulin Secreting Pancreatic (3-Cells. Pridobljeno
 6. 2 2024 iz National Library of Medicine (NIH): https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1181066/
- Dolenšek in sod. (20. 6 2015). *Structural similarities and differences beetween the human and the mouse pancreas*. Pridobljeno 8. 2 2024 iz Taylor and Francis Online: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19382014.2015.1024405
- Douglas, A. K., & Beierwaltes, W. (2012). *The influence of extracellular and intracellular calcium on the secretion of renin*. National Library of Medicine. Pridobljeno 10. 01 2024 iz https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3553253/
- Elliott, A. D. (1. 3 2020). *Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices*. Pridobljeno 28. 1 2024 iz PubMed Central: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6961134/
- Fu in sod. (2013). Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Curr Diabetes Rev.*, 25-53. Pridobljeno 7. 10 2023 iz National Library of Medicine: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3934755/
- Gilon, P., & Henquin, J.-C. (1992). Influence of Membrane Potential Changes on Cytoplasmic Ca2+ Concentration in an Electrically Excitable Cell, the Insulin-secreting Pancreatic B-cell. *The Journal of biological chemistry*, 20713-20720.

- Idevall-Hagren, O., & Tengholm, A. (7 2020). *Metabolic regulation of calcium signaling in beta cells*. Pridobljeno 9. 2 2024 iz Science Direct: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32085965/
- IDF Diabetes Atlas. (2021). *International Diabetes Federation*. Pridobljeno iz Diabetes around the world in 2021: https://diabetesatlas.org/
- Jaffredo in sod. (2021). Dynamic Uni- and Multicellular Patterns Encode Biphasic Activity in Pancreatic Islets. *Diabetes*, 878-888.
- Kelc in sod. (2019). Calcium Signaling in β-cell Physiology and Pathology: A Revisit. International Journal of Molecular Sciences, 1-24. Pridobljeno 7. 10 2023 iz https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31817135/
- Lasertec. (2023). *Measurement principle*. Pridobljeno 18. 11 2023 iz Principle of confocal microscope: https://www.lasertec.co.jp/en/products/microscope/optelics_hybrid/principle/microsco pe.html
- Merrins J. M. in sod. (2015). *Phase Analysis of Metabolic Oscillations and Membrane Potential in Pancreatic Islet b-Cells.* USA: Biophysical Society. Pridobljeno iz https://www.cell.com/biophysj/pdf/S0006-3495(15)04813-4.pdf
- NIJZ. (2023). *Nenalezljive bolezni*. Pridobljeno iz Sladkorna bolezen: https://nijz.si/nenalezljive-bolezni/sladkorna-bolezen/
- Peterson, D. (2010). *ScinceDirect*. Pridobljeno 18. 11 2023 iz Confocal Microscopy: https://www.sciencedirect.com/topics/nursing-and-health-professions/confocalmicroscopy
- Rorsman, P., & Renstörm, E. (2003). Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 1029-1045. Pridobljeno 16. 11 2023 iz https://www.researchgate.net/publication/10646653_Insulin_granule_dynamics_in_pa ncreatic_-cells
- Santos in sod. (1992). High external Ca2+ levels trigger membrane potential oscillations in mouse pancreatic β-cells during blockade of K(ATP) channels. Portugalska: Center for Neurosciences of Coimbra, Department of Zoology, University of Coimbra,. Pridobljeno iz https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X9291278X

»58. srečanje Mladih raziskovalcev Slovenije «

- Seetho, I. W., & Wilding, J. P. (2014). *ScinceDirect*. Pridobljeno 20. 01 2024 iz Human Insulin: https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/human-insulin
- Speier & Rupnik. (2003). *A novel approach to in situ characterization of pancreatic β-cells*. Nemčija: European Jurnal of Physiology. doi:https://doi.org/10.1007/s00424-003-1097-9
- Stožer in sod. (2013). The Relationship between Membrane Potential and Calcium Dynamicsin Glucose-Stimulated Beta Cell Syncytium in Acute Mouse Pancreas Tissue Slices.Kalifornija:PLOS.Pridobljenoizhttps://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0082374
- Stožer in sod. (2021). Confocal Laser Scanning Microscopy of Calcium Dynamics in Acute Mouse Pancreatic Tissue Slices. *jove*, 1-26.
- Xavier, G. D. (2018). The Cells of the Islets of Langerhans. *Journal of Clinical Medicine*, 1-17. Pridobljeno 7. 10 2023 iz https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5867580/