# Navorsings- en oorsigartikel

# Die ultrastrukturele, morfometriese evaluering van die mikrotubulêre stelsel in gestimuleerde B-selle van die pankreas

#### A. Crous\*, A.M. de Beer en E.J. Visser

Departement Geneeskundige Fisiologie, Universiteit van die Oranje-Vrystaat, Posbus 339, Bloemfontein 9300

#### L.J. Duyvené de Wit

Departement Anatomiese Patologie, Universiteit van die Oranje-Vrystaat, Posbus 339, Bloemfontein 9300

Ontvang 21 Julie 1992; aanvaar 17 September 1992

#### UITTREKSEL

Die intrasellulêre, regionale verspreiding van mikrotubuli in B-selle van die pankreas is morfometries ondersoek om die positiewe korrelasie tussen die mikrotubulêre inhoud en tempo van insulienvrystelling biochemies vasgestel, duideliker toe te lig. Roteilandweefsel is in vivo en in vitro met glukose gestimuleer en weefselmonsters geneem om beide fases van die fasiese insulienrespons te verteenwoordig. Elektronmikrograwe (x40 000) van individuele B-selle is in montage saamgestel ten einde volledige selprofiele teen hoë vergroting te konstrueer. Deur morfometriese analise is die totale sowel as regionale (perinukleêr, subplasmalemma en sentrale sitoplasma) verspreiding van mikrotubuli vir elke betrokke sel bepaal. Gedurende verhoogde vrystelling van insulien het die totale mikrotubulêre inhoud van die selle onveranderd gebly. Mikrotubuli het nie lukraak in die sitoplasma voorgekom nie, maar was in 'n spesifieke verspreidingspatroon georganiseer. Hierdie verspreidingspatroon het gedurende die aanvanklike, vinnige fase van glukosegestimuleerde insulienvrystelling onveranderd gebly. Gedurende die daaropvolgende, volgehoue vrystellingsfase het 'n verskuiwing in die mikrotubulêre verspreiding voorgekom. Die persentasie mikrotubuli in die perinukleêre en subplasmalemma-areas is onderskeidelik hoër en laer aangepas. Geen verandering het in die sentrale sitoplasma voorgekom nie. Uit die resultate word afgelei dat die vrystelling van sekresiegranules geposisioneer digby die selmembraan, geen modulasie van die mikrotubulêre stelsel verg nie. Die volgehoue vrystelling van insulien (wat die aktiewe vervoer van sekresiegranules vanaf die Golgi-area na die selmembraan vereis) word egter vergesel van oënskynlik doelgerigte organisatoriese veranderinge in die mikrotubulêre sisteem. Sekretoriese aktiwiteit kan dus verhoog, terwyl die sellulêre tubulienmikrotubulus-ewewig (mikrotubulêre inhoud) nie gewysig word nie.

# ABSTRACT

# Ultrastructural morphometric evaluation of the microtubular system in stimulated B-cells of the pancreas

The intracellular distribution of microtubules in pancreatic B-cells was studied morphometrically to elucidate the positive correlation between microtubular content and the rate of insulin release found by biochemical investigations. Rat islet tissue was glucose stimulated under in vivo and in vitro (isolated islets) conditions and tissue samples taken to represent both phases of the phasic insulin response. Electron micrographs (x40 000) of individual B-cells were assembled into montages to obtain complete cell profiles at high magnification. Morphometric analysis determined the total and regional (perinuclear, subplasmalemma and central cytoplasm) distribution of microtubules for each relevant cell. During increased release of insulin the total microtubule content of the cells remained unchanged. Microtubules did not occur at random in the cytoplasm, but were organized into a definite distribution pattern. This distribution pattern did not change during the initial, rapid phase of glucose-stimulated insulin release. During the second, sustained release phase a shift in the microtubule distribution occurred through a higher and lower adjustment of the percentage of microtubules in the perinuclear and subplasmalemmal areas, respectively. No change occurred in the central cytoplasm. The results indicate that the release of secretion granules positioned near the cell membrane requires no modulation of the microtubular system. The sustained release of insulin (necessitating active transport of secretory granules from the Golgiarea to the cell membrane) is accompanied by an apparently purposeful organizational change in the microtubula content) is not altered.

Intrasellulêre beweging van sekresiegranules na B-selbinnemembraanoppervlakke is 'n voorvereiste vir die vrystelling van insulien deur die eilandjies van Langerhans.<sup>15</sup> Sodanige doelgerigte beweging van granules ten einde emiositose moontlik te maak, het 'n doeltreffende intrasellulêre vervoerstelsel nodig. Bewyse dat kolgisien en ander

<sup>\*</sup>Outeur aan wie korrespondensie gerig kan word.

middels wat mikrotubulusfunksie ontwrig, lei tot die inhibisie van insulienvrystelling, verhef mikrotubuli tot 'n essensiële komponent van die vervoerstelsel.<sup>12</sup>

Sitoplasmiese mikrotubuli bestaan in 'n dinamiese ewewig met 'n sellulêre poel van tubuliensubeenhede. Verskuiwings in dié ewewig verhoog of verlaag die mikrotubuli-inhoud van 'n sel. Die blootstelling van eilandweefsel aan toestande wat insulienvrystelling stimuleer (hoëglukosekonsentrasies<sup>23,</sup> <sup>25</sup>/verhoogde sikliese AMP-aktiwiteit<sup>25</sup>), lei tot 'n afname in vry tubuliensubeenhede. Die weglating van kalsiumione uit die inkubeermedia van geïsoleerde eilandjies het 'n afname in insulienvrystelling tot gevolg, terwyl die tubuliensubeenheidspoel toeneem in omvang.25 Deur 'n afname in die tubulienpoelgrootte as 'n toename in gepolimeriseerde tubulien (mikrotubuli) te interpreteer, word die omgekeerde korrelasie tussen die mate van insulienvrystelling en die hoeveelheid vry tubulien 'n maatstaf van die belang van intakte mikrotubuli in die meganisme van insuliensekresie. Mikrotubuli mag as spore vir die vervoer van sekresiegranules dien, waardeur 'n groter hoeveelheid tubuli verhoogde sekresietempo's veroorsaak. Daar is egter voorgestel dat die dinamiese regulering van tubulienpolimerisering, eerder as die daarstelling van statiese bane vir granuulbeweging, 'n belangriker faktor in die vrystellingsmeganisme verteenwoordig.<sup>10</sup>

In respons op volgehoue glukosestimulasie stel eilandweefsel vinnig 'n kwantiteit insulien vrv, waarna 'n afname in sekresietempo volg. Na ongeveer vyf minute verhoog die vrystelling van insulien egter weer en hierdie vinniger vrystellingstempo word vir die volle duur van die stimulasie gehandhaaf.<sup>6</sup> Daar is reeds aangetoon dat 'n fasiese verandering in tubulienpolimerisasie direk positief korreleer met die bifasiese patroon van insulienvrystelling.23 Hierdie bevindinge dui daarop dat mikrotubuli in die aanvanklike, vinnige fase van insulienvrystelling sowel as die daaropvolgende, volgehoue fase betrokke is. Die veranderinge in tubulienpolimerisasie word indirek deur middel van kolgisienbindingsessais na aanleiding van die tubulienpoelgrootte bepaal.<sup>27</sup> Die intrasellulêre verspreiding van mikrotubuli in verskillende areas van die sitoplasma kan nie biochemies aangetoon word nie. Dinamiese veranderinge in die regionale, intrasellulêre verspreiding van mikrotubuli tydens fluktuerende vlakke van selaktiwiteite mag selfs ongemerk gaan, indien mikrotubulusvorming in 'n spesifieke area van die sitoplasma saamval met gelykwaardige dissosiasie in 'n ander streek. Die tubulienpoelgrootte, verteenwoordigend van die totale mikrotubulêre inhoud van die sel, bly gevolglik ongewysig en word verkeerdelik geïnterpreteer as 'n onaktiewe mikrotubulusstelsel.

Immunofluoressensie-ondersoeke het aangedui dat selfs in ongestimuleerde B-selle, mikrotubuli nie ongeorden versprei deur die sitoplasma voorkom nie, maar straal oënskynlik radiaal vanaf die perinukleêre sone na die plasmamembraan.<sup>3</sup> Kwantitatief word 'n hoër mikrotubulêre verspreidingsdigtheid in die perinukleêre area as in die subplasmalemmagebied verwag. Hoewel mikrotubuli in 'n morfometriese ondersoek van die rustende B-sel ingesluit was,<sup>7</sup> is die regionale verspreiding van die tubuli nie kwantitatief ondersoek nie. Die mikrotubulêre lokalisering gedurende insulienvrystelling is ook steeds onbekend.

Mikrotubuli kan in spesifieke areas van die sitoplasma

deur stereologiese of morfologiese analise van elektronmikrograwe gekwantifiseer word.28 Die klein afmetings van mikrotubuli vereis elektronmikrograafvergrotings waarby volledige selprofiele nie op 'n enkele mikrograaf geakkommodeer kan word nie. Reekse mikrograwe kan wel in montage van totale selprofiele saamgestel word, waardeur die gelyktydige evaluering van mikrotubulêre verspreidingsdigthede in verskillende sitoplasma-areas van dieselfde sel moontlik gemaak word.<sup>5</sup> Die funksionele verband tussen mikrotubuli en hoër vrystellingstempo's van granules wat volg op glukosestimulasie, mag in waarneembare veranderinge van die mikrotubulêre vervoerstelsel gesetel wees. Sodanige veranderinge mag verskuiwings van mikrotubuli van een area van die sitoplasma na 'n ander insluit. Deur ontleding van volledige selprofiele kan veranderinge in die mikrotubulêre verspreiding relatief tot mekaar as 'n persentasie van die totaal uitgedruk word.

Deur middel van erkende morfometriese tegnieke het die outeurs die mikrotubulêre verspreidingsdigthede in die perinukleêre, sentrale sitoplasmiese asook subplasmalemmaareas van rot B-selle *in vivo* en *in vitro* bepaal. Die resultate lewer bewys dat mikrotubuli nie kwantitatief uniform deur die sitoplasma verspreid voorkom nie, maar gekonsentreerd om die selkern asook onder die selmembraan. Volgehoue glukosestimulasie veroorsaak 'n herdistribusie van intrasellulêre mikrotubuli. Op geen tydstip verhoog glukosestimulasie die totale mikrotubuli-inhoud nie. 'n Hipotese waardeur dié organisatoriese veranderinge in die intrasellulêre vervoerstelsel funksioneel verantwoord word, word aangebied.

## **MATERIALE EN METODES**

#### In vivo- en in vitro-benadering

Pankreasweefsel vir ultrastrukturele morfometriese analise is vir *in vivo*- asook *in vitro*-modelle bekom. Die *in vivo*eksperiment (verteenwoordigend van die meer fisiologies verantwoordbare omgewing) het slegs die langtermyneffek van glukosestimulasie op mikrotubulêre distribusie geëvalueer. Geïsoleerde eilandjies van Langerhans is in die *in vitro*-eksperiment aangewend om moontlike fasiese fluktuasies in mikrotubulêre verspreiding in verhouding tot die bifasiese patroon van insulienvrystelling te ondersoek. Eksperimente het deurgaans konstante homeostatiese toestande vir mikrotubuli verseker. Vyf *in vivo*- en vyf *in vitro*-eksperimente is uiteindelik uitgevoer.

#### In vivo-eksperimente

Drie manlike Sprague-Dawleyrotte (300 – 350 g) is in elke eksperiment gebruik. Weefsel- en bloedmonsterversameling is voorafgegaan deur een proefdier vir 'n periode van 72 uur te vas, 'n volgende 30% glukose in 2% natriumchloriedoplossing vir 72 uur te voer, terwyl die derde proefdier vry toegang tot 'n konvensionele laboratoriumrantsoen gehad het.<sup>26</sup> Hierdie eksperimentele uitleg verteenwoordig onderskeidelik ongestimuleerde, glukosegestimuleerde asook kontroletoestande van B-selle. Elke proefdier is deur servikale dislokasie gedood. Die stertgedeelte van die pankreas is so vinnig haalbaar verwyder en onverwyld in 'n oplossing van 2,5% glutaraldehied in 0,1 M kakodilaatbuffer pH 7,2 aangevul met looisuur (0,25% w/w) geplaas.<sup>33</sup> Die temperatuur van die oplossing was  $\pm 22$  °C. Gedurende onderdompeling in die fikseermengsel is die pankreasweefsel in klein (< 1 mm<sup>3</sup>) stukkies gesnipper. Direk na dood is addisioneel by elke proefdier 'n bloedmonster by wyse van kardiale punksie bekom en vervolgens in 'n gehepariniseerde buis (Venoject®) gesentrifugeer. Die plasma-opbrengs is by -20 °C gevries en geberg.

# Isolering van eilandjies van Langerhans

Die pankreas van een 300 – 350 g manlike Sprague-Dawleyrot, met vrye toegang tot 'n standaardlaboratoriumrantsoen, is per eksperiment aangewend. Eilandjies is geïsoleer met behulp van Kuo et al.<sup>14</sup> se modifikasie van die kollagenase verteringtegniek van Lacy en Kostianovsky.<sup>16</sup> Tipe V-kollagenase (Sigma®) (Kat. no. C9263) is vir die vertering van die pankreas aangewend. Groter eilandjies is onder stereomikroskopie geselekteer en met behulp van 'n fyn glaslussie na vars, koue (4 °C) Hank se buffer oorgedra. Hiervandaan is die eilandjies na die reaksieflessies vir inkubasie oorgeplaas.

#### Inkubeermedia

Krebs-Ringerbikarbonaatbuffer (KRB), (pH 7,4) aangevul met beesalbumien tot 'n konsentrasie van 2 mg/ml<sup>18</sup> is as standaardinkubeermedium (KRB\*) gebruik. Hierdie medium is verder aangevul met glukose tot konsentrasies van 5,5 mM asook 16,5 mM soos deur die inkubasiemetode vereis.

#### Inkubasieprosedure

Inkubasies is deurgaans uitgevoer by 37 °C in 'n 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>-atmosfeer en meganies teen 2 ossilasies/sek. geskud. Ses reaksieflessies is opgestel vir elke eksperiment. Eilandjies (5/reaksieflessie) is vir 20 minute in KRB\* gepreïnkubeer, waarna die inkubeermedia vervang is deur of lae glukose KRB\* (5,5 mM) of as alternatief hoe glukose KRB\* (16,5 mM). Die drie flessies met lae glukose KRB\* het as kontroles gedien vir die ander drie flessies met hoë glukose KRB\*. In beide groepe is inkubasies vir periodes van 2,5, 5,5 en 20 minute uitgevoer. Die inkubeermedia van die 5,5- en 20minute-reaksieflessies is vervang met vars KRB\* (identiese samestelling) na 3 minute en 17,5 minute onderskeidelik, ten einde 'n 2,5-minute-insulienvrystellingsmonster vir elk van die ses flessies te bekom. By voltooiing van 'n inkubasieperiode is die betrokke medium vinnig met fikseermengsel (±22 °C) vervang. Al die ingewinde media is vervolgens by -20 °C gevries.

# Weefselvoorbereiding vir elektronmikroskopie

Weefselmonsters is deur onderdompeling by kamertemperatuur (~22 °C) gefikseer. Opvolgfiksering vir 1,5 uur in 2%-osmiumtetroksied in Palade-veronalasetaatbuffer (pH 7,2) (22 °C) het dehidrering in gegradeerde asetoonverdunnings voorafgegaan. Inbed is uitgevoer in Spurr se laeviskositeit-epoksiehars. Dun snitte (75 – 80 nm) van eilandweefsel is dubbel gekleur met versadigde waterige uranielasetaat en Reynolds se loodsitraat en ondersoek met 'n Philips 201-elektronmikroskoop.

#### Elektronmikrografiese montage

Aanvanklik is elke snit teen 'n vergroting laag genoeg om identifikasie van mikrotubuli uit te sluit, ondersoek. Vyf gekernde B-selprofiele is lukraak geselekteer vir een eilandjie van elke eksperimentele groep (5 *in vivo* en 5 *in vitro*). Elke geselekteerde sel is gemikrografeer teen 'n hoër vergroting (x4 380). Daar is gevind dat 10-15 oorvleuelende beligtings gewoonlik nodig was om een volledige selprofiel te akkommodeer. Die negatiewe is vergroot ten einde 'n finale afdrukvergroting van x40 000 te verskaf. Elke stel afdrukke is saamgestel in 'n enkele montage.

## Ultrastrukturele morfometriese analise

Die gebruiklike punttelmetode vir die kwantifisering van sitoplasmiese mikrotubuli op elektronmikrograwe<sup>28</sup> is as onprakties vir toepassing op groot montage beoordeel. As alternatief is 'n gewysigde morfometriese metode vir die kwantifisering van mikrotubuli in volledige selprofiele soos voorgestel deur Crous en De Beer,<sup>5</sup> aangewend. Die kriteria waaraan 'n mikrotubulus moes voldoen alvorens dit in die morfometriese opname opgeneem is (lang onvertakte, matig geboë asook reguit silindriese strukture met lengte > 5 mm op die montage), kom in beginsel grootliks ooreen met die van ander outeurs.729 Die gesamentlike lengte van al die mikrotubuli in 'n spesifieke sitoplasma-area verteenwoordig dan per implikasie die totale mikrotubulêre eenheidsoppervlakte vir daardie area. Die sitoplasma-areas vir die bepaling van mikrotubulêre inhoud is soos volg gedefinieer: areas (3 cm breed op die montage) is afgemerk rondom die selkern asook onder die selmembraan. Sodoende is die sitoplasma in minstens drie aparte kompartemente onderverdeel ('n perinukleêre asook subplasmalemma-area met 'n bykomstige, sentrale sitoplasmiese area tussenin). Voorskrifte vir afmetings van hierdie areas is nie in die literatuur beskikbaar nie. Die arbitrêre besluit om die perinukleêre asook subplasmalemma-areas 3 cm breed op die montages te maak, is beïnvloed deur die waarneming dat 'n mikrotubulus naasliggend tot groter sekresiegranules, in sodanige oppervlakte geakkommodeer word. Indien die afstand tussen die selkern en die selmembraan kleiner as 6 cm was, was onderverdeling van die sitoplasma problematies en het 'n vierde sitoplasma-area oorgeskiet. 'n Skematiese voorstelling van die onderverdeling van die sitoplasma word in figuur 1 gegee. Die oppervlaktes van die verskillende sitoplasmaareas is deur middel van planimetrie bepaal en in mm<sup>2</sup> uitgedruk. Die mikrotubulêre verspreidingsdigtheid vir 'n gegewe sitoplasma-area word aangedui deur die mikrotubulêre oppervlakte wiskundig te deel deur die oppervlakte van daardie sitoplasmakompartement (kwosiënt). Vir totale mikrotubulêre verspreidingsdigthede is die oppervlakte van drie (of waar van toepassing vier) sitoplasma-areas van 'n volledige selprofiel bymekaargereken. Ooreenstemmend is individuele mikrotubulêre oppervlaktes sommeer en die totale mikrotubulêre verspreidingsdigthede so bereken.

#### Relatiewe mikrotubulêre verspreiding

Die verhouding van die onderskeie mikrotubulêre verspreidingsdigthede in die verskillende sitoplasma-areas (areas 1, 2 & 3 fig. 1) van elke montage is relatief tot mekaar as 'n persentasie van die totaal uitgedruk. 'n Mikrotubulêre verspreidingspatroon vir elke seldeursnit is dus verkry. Veranderinge aan die patroon is aanduidend van modulering in mikrotubulêre verspreiding tussen die gedefinieerde sitoplasma-areas.



FIGUUR 1: 'n Skematiese voorstelling van die sitoplasma-areas gebruik in die bepaling van mikrotubulêre verspreidingsdigthede. Geïllustreer is twee selle met kerne onderskeidelik sentraal en eksentries geleë. Die sitoplasma van die sel aan die linkerkant kan volledig in die drie vooraf gedefinieerde areas (perinukleêr (1), sentraal (2) en subplasmalemma (3)) verdeel word. Waar die selkern naby die selmembraan voorkom, ontstaan 'n vierde oorgangsarea (4).





FIGUUR 2: Voorbeelde van gedeeltes van 'n perinukleêre area ( $\rightarrow p \leftarrow in fig. A$ ) en subplasmalemma-area ( $\rightarrow s \leftarrow in$ fig. B) uit dieselfde sel (teen vergroting waarby metings geneem is). Mikrotubuli is duidelik sigbaar (pyle). Dwars deurgesnyde mikrotubulusprofiele (pyltjies) is nie in die bepaling van mikrotubulêre verspreidingsdigthede ingesluit nie (x40 000).

#### Insulienkonsentrasie

Die insulienkonsentrasies in plasmamonsters asook inkubeermedia is radio-immunologies bepaal (INCSTAR) (Kat. no. 20008).

#### Statistiese ontleding

Statistiese beduidenheid van die verskille tussen gemiddeldes is deur middel van Student se t-toets vir ongepaarde data vasgestel. Daar is deurgaans van 95%-vertrouensintervalle gebruik gemaak om veranderlikes te vergelyk.

# RESULTATE

#### Ultrastruktuur

Mikrotubuli is geredelik identifiseerbaar op elektronmikrograwe. In die voorbeelde van perinukleêre en subplasmalemma-areas (fig. 2), teen die vergroting waarby montage saamgestel en die morfometriese metings uitgevoer is, is die tubuli duidelik van die omringende organelle onderskeibaar. Mikrotubuli is selde loodreg tot die kern georden. Die indruk word telkens gewek van 'n uitwaartse straling (teen 'n kleiner hoek) van mikrotubuli vanaf die omgewing van die selkern. Veral in gestimuleerde selle is sekresiegranules nie uniform deur die sitoplasma versprei nie, maar veral by een pool van die sel gekonsentreer. In figuur 3 vertoon twee glukosegestimuleerde B-selle granuulkonsentrasies aan die teenoorgestelde kant van die kern as die Golgi-apparaat. Sodanige polarisasie van sekresiegranules betrek dikwels die kapillêre pool van selle.

#### Insulienkonsentrasies

In beide die *in vivo* asook *in vitro* eksperimentele reekse het insulienvrystelling aan die verwagte norme voldoen. Waar proefdiere vir 72 uur gevas of glukose gevoer is, was die bloedinsulienvlakke onderskeidelik laer en hoër, vergelyk met kontrolediere (fig. 4). Die insulienkonsentrasies van die inkubeermedia na voltooiing van inkubasie word ook in figuur 4 verstrek. Inkubasie in media met 5,5 mM glukose het nie die tempo van insulienvrystelling vanuit geïsoleerde eilandjies betekenisvol beïnvloed nie en die insulien-



FIGUUR 3: Oneweredige verspreiding van sekresiegranules in twee B-selle. Die sekresiegranules konsentreer aan die kapillêre pool van die sel (area deur pyle aangedui). Granuulkonsentrasies en Golgi-areas (G) word aan teenoorgestelde kante van die selkern aangetref. K, kapillêr (x4 600).

konsentrasie het gevolglik konstant gebly (selfs na 20 minute). Glukosestimulasie (inkubasie in 16,5 mM KRB\*) daarenteen, het die vrystelling van insulien duidelik op 'n bifasiese wyse verhoog.

#### Totale mikrotubulêre verspreidingsdigtheid

Teenstrydig met die resultate verkry vir biochemiese bepalings, het die outeurs se resultate nie 'n statisties beduidende verhoging in totale mikrotubulêre inhoud van glukosegestimuleerde B-selle aangetoon nie. Insgelyks het vas ook nie die mikrotubulêre inhoud van selle beduidend verlaag nie. In der waarheid was die totale mikrotubulêre volumedigtheid marginaal verlaag na glukosestimulasie (in vivo asook in vitro, fig. 5). Die oenskynlike teenstrydigheid in resultate kan toegeskryf word aan die verskil in benaderings by biochemiese en morfometriese metodes vir kwantifisering van die mikrotubulêre inhoud van selle. Die bevindinge suggereer dat 'n verhoogde tempo van insulienvrystelling nie noodwendig gepaardgaan met 'n verhoging van sellulêre mikorubuli-inhoud nie. Veranderinge in die sitoplasmiese verspreiding van mikrotubuli na aanleiding van glukosestimulasie mag inderdaad plaasvind, sonder dat die totale mikrobulêre inhoud van die B-selle beïnvloed word. Daar is egter besluit om die voorkoms van mikrotubuli in verskillende sitoplasma-areas van elke sel met mekaar te vergelyk.



FIGUUR 4: Insulienkonsentrasies gedurende die tydperk van weefselfiksering. Die boonste blokdiagram toon die plasma-insulienkonsentrasies van proefdiere gevoer met 'n standaardlaboratoriumrantsoen (Kontrole), gevas vir 72 uur (Vastend) of vir 72 uur op 'n hoëglukosedieet (Glukose). In die onderste blokdiagram word die insulienkonsentrasies van die inkubeermedia na 2,5, 5,5 en 20 minute inkubasie van geïsoleerde eilandjies in 5,5 mM en 16,5 mM glukose KRB\* aangetoon. Elke waarde verteenwoordig die rekenkundige gemiddeld van 5 eksperimente  $\pm$ SFG (n = 25).

#### Relatiewe verspreiding van mikrotubuli

Mikrotubuli was nie gelykmatig deur sitoplasma-areas (soos gedefinieer) versprei nie. 'n Digter verspreiding van mikrotubuli het in die omgewing van die selkern en selmembraan voorgekom, met relatief minder tubuli in die sentrale gebied van die sitoplasma. Figuur 6 dui die relatiewe verspreiding van mikrotubuli in die perinukleêre, subplasmalemma asook sentrale sitoplasma-areas van B-selprofiele (in vivoeksperiment) aan. Daar is 'n merkbare ooreenkoms tussen die kontrole en vastende mikrotubulêre verspreidingspatrone, terwyl glukosestimulasie 'n resiproke patroon veroorsaak. Vergelyking van mikrotubulêre verspreiding in die perinukleêre en subplasmalemma-areas van die kontrolegroep toon 'n laer teenwoordigheid van mikrotubuli in die omgewing van die selkern. Vas het geen verandering in hierdie verband teweeggebring nie. Glukosestimulasie het egter daartoe aanleiding gegee dat relatief meer mikrotubuli rondom die selkern as in die omgewing van die selmembraan voorkom. Herorganisasie van die mikrotubulêre stelsel het klaarblyklik plaasgevind in soverre 'n verskuiwing van die mikrotubuli vanaf die subplasmalemma-area na die perinukleêre area voorgekom het.

Die relatiewe mikrotubulêre verspreidingspatrone van Bselle geïnkubeer in laeglukosemedia kom direk ooreen met die van ongestimuleerde selle in vivo (fig. 7). Waarskynlik het laeglukosekonsentrasies nie noemenswaardige effek op lokalisasie van mikrotubuli nie. Wanneer inkubasies in hoëglukosemedia (16,5 mM) uitgevoer is, is gevind dat oor verloop van tyd, glukosestimulasie in vitro, die mikrotubulêre verspreiding wel beïnvloed. Die onderste blokdiagram in figuur 7 toon die hoër konsentrasie tubuli in die selmembraanarea in vergelyking met die perinukleêre area na 2,5 minute inkubasie in 16,5 mM glukosemedium. Sodanige verspreidingspatroon is vergelykbaar met dié van ongestimuleerde selle. Na 5,5 minute wil dit voorkom asof gering minder mikrotubuli in die selmembraanarea aanwesig is. Voortgesette inkubasie het die verspreidingspatroon gewysig, tot die effek dat na 20 minute, 'n groter persentasie mikrotubuli in die perinukleêre as in die subplasmalemma-area aanwesig is. Die verhoogde insulienvrystellingsgeassosieerde, intrasellulêre herorganisasie van die mikrotubulêre stelsel waargeneem in vivo, kom dus ook voor indien geïsoleerde eilandjies met glukose gestimuleer word.



FIGUUR 5: Sitoplasmiese, mikrotubulêre verspreidingsdigthede van B-selle by verskillende tempo's van sekretoriese aktiwiteit. Die boonste blokdiagram toon die mikrotubulêre verspreidingsdigthede in vivo verkry, waar proefdiere 'n standaardlaboratoriumrantsoen ontvang het (Kontrole), gevas is vir 72 uur (Vastend), of vir 72 uur op 'n hoëglukosedieet onderhou is (Glukose). Mikrotubulêre verspreidingsdigthede bepaal na inkubasie van geïsoleerde eilandjies in 5,5 mM of 16,5 mM glukose KRB\* vir 2,5, 5,5 en 20 minute word in die onderste blokdiagram aangetoon. Elke waarde verteenwoordig die rekenkundige gemiddeld van 5 eksperimente  $\pm$ SFG (n = 25). In teenstelling met die glukose-afhanklike veranderinge van die mikrotubulêre verspreiding in die perinukleêre en subplasmalemma-areas, toon die voorkoms van mikrotubuli in die sentrale sitoplasma-areas blykbaar geen opvallende gevoeligheid teenoor glukosestimulasie nie. In elke eksperimentele reeks het die relatiewe mikrotubulêre verspreiding in hierdie area onveranderd gebly.

Die geleidelike tydafhanklike verskuiwing in die verspreiding van mikrotubuli as gevolg van glukosestimulasie, word aangedui deur veranderinge in die verhouding van mikrotubulêre verspreiding in die perinukleêre tot subplasmalemma-areas (fig. 8). Na 20 minute inkubasie in 16,5 mM glukose het 'n statisties beduidende verskuiwing van mikrotubuli na die selkern plaasgevind.

#### BESPREKING

Dit wil voorkom asof redelike konsensus rakende die rol van mikrotubuli in die proses van insuliensekresie bereik is.<sup>11</sup> Presies hoe mikrotubuli insulienvrystelling moduleer, of by welke stadium die mikrotubulêre stelsel betrokke raak, is steeds onduidelik (komplekse selfisiologie betrokke). Huidige resultate faal om die korrelasie tussen tempo van insulienvrystelling en kwantiteit gepolimeriseerde tubulien<sup>23,26</sup> te verantwoord. Biochemiese metodes bepaal alle geaggregeerde tubulien (ongeag die mate van aggregasie), terwyl morfologiese metodes slegs sigbare (? funksionele) mikrotubuli beoordeel. Met die voorlegging van hierdie verduideliking het Reaven<sup>28</sup> ook die moontlikheid geopper dat die basale mikrotubulêre inhoud van 'n sel onveranderd mag bly, terwyl die vrystelling van insulien wel verhoog.

Hoewel morfologie 'n tydrowende tegniek is, maak dit die kwantifisering van mikrotubuli in verskillende gebiede van die sitoplasma haalbaar. Uitbreiding van hierdie voorde**el n**a



FIGUUR 6: Voorkoms van mikrotubuli in die perinukleêre, sentrale en subplasmalemma-areas van B-selle teen verskillende tempo's van sekretoriese aktiwiteit. Die mikrotubulêre verspreiding tussen hierdie areas word relatief tot mekaar uitgedruk as persentasies van die totaal. Elke groep van drie kolomme verteenwoordig die mikrotubulêre verspreidingspatroon van weefselmonsters in vivo geneem, waar proefdiere 'n standaardlaboratoriumrantsoen ontvang het (Kontrole), gevas is vir 72 uur (Vastend), of vir 72 uur op 'n hoëglukosedieet onderhou is (Glukose). Elke waarde verteenwoordig die rekenkundige gemiddeld van 5 eksperimente  $\pm$ SFG (n = 25).



FIGUUR 8: 'n Grafiese voorstelling van die verhoudings tussen die persentasie mikrotubuli in die perinukleêre en subplasmalemmale areas van geïsoleerde eilandjies na inkubasie in 5,5 mM (diamantmerkers) en 16,5 mM (driehoekmerkers) glukose KRB\*. Die onderskeie punte is verbind om die lineêre verandering in die mikrotubulêre verspreidingspatroon gedurende glukosegestimuleerde insulienvrystelling te illustreer. Elke punt verteenwoordig die gemiddeld van 25 berekende verhoudings ±SFG.

die analise van volledige seldeursnitte (in stede van die algemene kleiner, dikwels lukraak geselekteerde sitoplasmaareas<sup>22</sup>) maak 'n vergelyking van relatiewe veranderinge in die mikrotubulêre verspreiding binne sodanige selmembraanafgebakende area moontlik. Ultrastruktuurmorfometrie van lukraak geselekteerde areas van B-selsitoplasma het geen voorkeur-oriëntasie van organelle, insluitend mikrotubuli, aangetoon nie.<sup>7</sup> Nietemin is intrasellulêre regionale lokalisasie van mikrotubuli aangetoon waar meer selektiewe monste-

ringneming aangewend is. In epiteelselle van die dunderm is 'n hoër konsentrasie mikrotubuli in die Golgi-area asook apikale sitoplasma teenwoordig, as in die basale areas.<sup>30</sup> In ag genome dat isotropie van mikrotubulêre verspreiding nie bloot aanvaar kan word nie, is besluit dat die ondersoek van volledige selprofiele 'n voorvereiste is. Vergelyking van relatiewe veranderinge in mikrotubulêre verspreidings in dieselfde selprofiel verminder ook die effek van klein wisselings in snitdikte op die morfometriese analise. In die huidige eksperimente is die totale mikrotubulêre inhoud van selle nie deur vas of glukosestimulasie beïnvloed nie. Die vraag ontstaan of glukosestimulasie wel enige effek op die mikrotubulêre stelsel van B-selle uitoefen, <sup>17, 19, 21, 24</sup> oftewel, vind insulienvrystelling onafhanklik van mikrotubuli plaas. Die bevinding dat die mikrotubulêre stelsel inderdaad op glukosestimulasie gereageer het, alhoewel verskillend van vorige bevindings, het nogmaals mikrotubuli as 'n integrale deel van die insuliensekresieproses uitgewys. In 'n kwalitatiewe ondersoek het Bolton et al.<sup>3</sup> die mikrotubulêre netwerk in B-selkulture beskryf as radiaal uitstralend vanaf die perinuklêêre area na die selmembraan. Dit impliseer dat mikrotubuli nie ondoelmatig versprei is nie, maar wel volgens funksionele behoeftes van die sel georden word.

Veranderinge in die intrasitoplasmiese lokalisering van mikrotubuli is nie ongewoon nie. Die sitoskelet van Sertoliselle ondergaan herorganisasie (insluitend 'n verandering in mikrotubulêre verspreiding), gedurende spermatogenese.<sup>2</sup> In vroeë agtsel-muisblastomere word mikrotubuli hoofsaaklik in die omgewing van selkerne asook selkortekse aangetref. Gedurende die ontwikkeling van selpolariteit, akkumuleer mikrotubuli geleidelik in die apikale pool waar mikrovilli ontwikkel, terwyl die getal mikrotubuli afneem in die basale sitoplasma.9 In pinealosiete van die bobbejaan vind sikliese toenames in mikrotubulêre inhoud plaas. Die toenames, wat gedurende die donkerfase van 'n sirkadiese lig-donkersiklus voorkom, korreleer positief met die toename in melatonieninhoud van die pineaalklier. Die moontlike funksionele betekenis van mikrotubuli in laasgenoemde verband, word toegeskryf aan die daarstel van gerigte vloeikanale vir intrasellulêre vervoer van sekretoriese produkte van die donkerfase.<sup>32</sup> In die huidige ondersoek was verhoogde sekretoriese aktiwiteit gepaar met die intrasellulêre herdistribusie van mikrotubuli van B-selle. 'n Beduidend groter persentasie van mikrotubuli was aanwesig rondom die selkern in vergelyking met die selmembraanarea na glukosestimulasie van die selle in vivo. Dit is presies die teenoorgestelde van die verspreidingspatroon gedurende basale toestande. In vitro word 'n soortgelyke verskuiwing in mikrotubulêre verspreiding na 20 minute glukosestimulasie waargeneem. Die basis waarop die betrokkenheid van mikrotubuli in die proses van insulienvrystelling berus, word afgelei van die bevindinge dat stowwe wat met mikrotubulusfunksie inmeng - depolimerisering van mikrotubuli (kolgisien en nokodasool), vorming van parakristalyne tubulienaggregate (vinblastien) en stabilisering van bestaande tutulien (deuteriumoksied) - sonder uitsondering glukosegestimuleerde insulienvrystelling onderdruk.<sup>10</sup> Derhalwe moet aanvaar word dat die veranderinge wat in die huidige ondersoek in die mikrotubulêre verspreiding (aangebring deur glukosestimulasie en gepaardgaande met 'n verhoogde hormoonsekresie) met die meganisme van insulienvrystelling geassosieer is. Die bevinding dat hierdie veranderinge in mikrotubulêre verspreiding nie waargeneem is na 2,5 of 5,5 minute, maar slegs na 20 minute (in vitro) en langtermynstimulasie (in vivo), ondersteun die voorstel dat mikrotubuli hoofsaaklik by die tweede (volgehoue) fase van insulienvrystelling betrokke is.4.20 Dit is die fase wat afhanklik is van die effektiewe vervoer van sekresiegranules na die selgrens. Die eerste (kortstondige) vrystellingsfase, behels die mobilisering van granules reeds in die nabye omgewing van die selmembraan (nie van mikrotubulêre netwerk afhanklik nie).<sup>34</sup> Selfs 'n variasie van die emiositoseproses vir insulien, waar eksositose deur middel van klein perforasies in die selmembraan plaasvind,<sup>8</sup> sal steeds 'n vervoerfunksie van mikrotubuli ondersteun. Bowendien dui polarisasie van sekresiegranules na glukosestimulasie op doelgerigte motiliteit binne B-selle.

Weens die omkeerbare polimerisasie-depolimerisasieaard van tubulien skyn 'n logiese meganisme waardeur die herdistribusie van mikrotubuli bewerkstellig kan word, lokale aanpassings van die tubulien-mikrotubuli-ewewig in die sitoplasma te wees. Sterk invloede van lokale sitoplasmiese faktore is onlangs voorgestel.<sup>31</sup> Met verhoogde sekretoriese aktiwiteit word die ewewig na links in die subplasmalemmaarea en na regs in die perinukleêre area verskuif. Gevolglik word die vry tubulienkonsentrasie ('n belangrike faktor in mikrotubulusvorming) vir die sel as geheel behou. 'n Ander moontlikheid waardeur die mikrotubulêre verspreiding gewysig kan word, is die fisiese beweging van volledige mikrotubuli deur die sitoplasma.1 Geen verhoging van die persentasie mikrotubuli in die sentrale sitoplasma-area was aantoonbaar nie. Derhalwe is beweging van mikrotubuli vanaf die selmembraan- na die kernmembraanarea nie as 'n moontlikheid beskou nie. Die outeurs is van mening dat die labiele aard van sitoplasmiese mikrotubuli die voorgestelde ewewigverskuiwingsmeganisme ondersteun.

Ten einde voorgelegde resultate te verwerk tot 'n konsep wat die meganisme waarvolgens insulienvrystelling plaasvind, te ondersteun, stel die outeurs voor dat die B-sel in goeie orde behou word deur tubulien-mikrotubulus-ewewig te preserveer. Vir volgehoue aktiewe sekresie is mikrotubuli in 'n mindere mate nodig in die onmiddellike subplasmalemma-area. Met verskeie aspekte van intrasellulêre oordrag verteenwoordig die selkern 'n besondere fisiese hindernis, maar mag nogtans as 'n "sentrale" verwysingspunt dien waarvandaan die distribusie van granules plaasvind. In B-selle, waar 'n mikrotubulêre netwerk vanaf die perinukleêre area uitstraal, is insulienpositiewe granules gerangskik langs die tubuli aangetref.<sup>3</sup> Verhoging van perinukleêre mikrotubuli (ten koste van die subplasmalemma), mag 'n meer effektiewe vervoerstelsel genereer. Dit impliseer dat sekretoriese granules versprei word vanaf die Golgi-area via 'n perinukleêre netwerk van mikrotubuli na spesifieke areas in die sitoplasma. 'n Soortgelyke baan is reeds vir die sekresie van atriale natriuretiese polipeptiede in miosiete voorgestel.<sup>13</sup>

Deur die resultate vanuit 'n praktiese oogpunt te beskou, wil dit voorkom asof faktore (middels) met die vermoë om sodanige mikrotubulêre herdistribusie in B-selle te induseer, die insuliensekresierespons kan potensieer. Spekulasie kan uitgebrei word om mikrotubulusafhanklike prosesse van ander selsoorte ook in te sluit.

#### LITERATUURVERWYSINGS

- Allen, R.D., Weiss, D.G., Hayden, J.H., Brown, D.T., Fujiwake, H. & Simpson, M. (1985). Gliding movement of and bidirectional transport along single native microtubules from squid axoplasm: Evidence for an active role of microtubules in cytoplasmic transport, J. Cell Biol., 100, 1736 – 1752.
- Amlani, S. & Vogl, A.W. (1988). Changes in the distribution of microtubules and intermediate filaments in mammalian Sertoli cells during spermatogenesis, *Anat. Rec.*, 220, 143 – 160.

- Bolton, W.E., Boyd, A.E. (III), Terrell, S.P., Andrews, K.L. & Redwine, W.A. (1982). Human pancreatic B cells *in vitro*: Microtubule and insulin immunofluorescence, *Diabetologia*, 23, 280 – 283.
- Boyd, A.E. (III), Bolton, W.E. & Brinkley, B.R. (1982). Microtubules and beta cell function: Effect of colchicine on microtubules and insulin secretion *in vitro* by mouse beta cells, *J. Cell Biol.*, 92, 425 – 434.
- Crous, A. & De Beer, A.M. (1991). Ultrastrukturele kwantifisering van mikrotubuli in volledige selprofiele, S. Afr. Tydskr. Natuurwet. en Tegnol., 10, 176 – 178.
- Curry, D.L., Bennett, L.L. & Grodsky, G.M. (1968). Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas, *Endocrinology*, 83, 572 - 584.
- Dean, P.M. (1973). Ultrastructural morphometry of the pancreatic β-cell, Diabetologia, 9, 115 – 119.
- Dudek, R.W., Boyne, A.F. & Charles, T.M. (1984). Novel secretory granule morphology in physically fixed pancreatic islets, *J. Histochem. Cytochem.*, 32, 929 – 934.
- Houliston, E., Pickering, S.J. & Maro, B.B. (1987). Redistribution of microtubules and pericentriolar material during the development of polarity in mouse blastomeres, J. Cell. Biol., 104, 1299 – 1308.
- 10. Howell, S.L. (1984). The mechanism of insulin secretion, *Diabetologia*, 26, 319 327.
- Howell, S.L. & Tyhurst, M. (1982). Microtubules, microfilaments and insulin secretion, *Diabetologia*, 22, 301 – 308.
- Howell, S.L. & Tyhurst, M. (1984). Insulin secretion: The effector system, *Experentia*, 40, 1098 – 1105.
- Iida, H., Barron, W.M. & Page, E. (1988). Monensin turns on microtubuleassociated translocation of secretory granules in cultured rat atrial myocytes, *Circ. Res.*, 62, 1159 – 1170.
- Kuo, W.-N., Hodgins, D.S. & Kuo, J.F. (1973). Adenylate cyclase in islets of Langerhans; Isolation of islets and regulation of adenylate cyclase activity by various hormones and agents, J. Biol. Chem., 218, 2705 – 2711.
- Lacy, P.E., Howell, S.L., Young, D.A. & Fink, C.J. (1968). New hypothesis of insulin secretion, *Nature (Lond.)*, 219, 1177 – 1179.
- Lacy, P.E. & Kostianovsky, M. (1967). Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas, *Diabetes*, 16, 35 – 39.
- Lacy, P.E., Walker, M.M. & Fink, C.J. (1972). Perifusion of isolated rat islets *in vitro*: Participation of the microtubular system in the biphasic release of insulin, *Diabetes*, 21, 987 – 998.
- Lacy, P.E., Young, D.A. & Fink, C.J. (1968). Studies on insulin secretion *in vitro* from isolated islets of the rat pancreas, *Endocrinology*, 83, 1155 – 1161.
- Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Walker, M.O. & Lacy, P.E. (1971). The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release V. The participation of a microtubular-microfilamentous sytem, *Diabetes*, 20, 257 – 265.
- 20. Malaisse, W.J., Van Obberghen, E., Devis, G., Somers, G. & Ravazzola,

M. (1974). Dynamics of insulin release and microtubular-microfilamentous system. V. A model for the phasic release of insulin, *Eur. J. Clin. Invest.*, 4, 313 – 318.

- Malaisse-Lagae, F., Amherdt, M., Ravazzola, M., Sener, A., Hutton, J.C., Orci, L. & Malaisse, W.J. (1979). Role of microtubules in the synthesis, conversion, and release of (pro) insulin: A biochemical and radioautographic study in rat islets, *J. Clin. Invest.*, 63, 1284 – 1296.
- Matsuda, Y., Baraona, E., Salaspuro, M. & Lieber, C.S. (1979). Effects of ethanol on liver microtubules and Golgi apparatus: Possible role in altered hepatic secretion of plasma proteins. *Lab. Invest.*, 41, 455 – 463.
- McDaniel, M.L., Bry, C.G., Homer, R.W., Fink, C.J., Ban, D. & Lacy, P.E. (1980). Temporal changes in islet polymerized and depolymerized tubulin during biphasic insulin release, *Metabolism*, 29, 762 – 766.
- Montague, W., Howell, S.L. & Green, I.C. (1975). Insulin release and the microtubular system of the islets of Langerhans, *Biochem. J.*, 148, 237 – 243.
- Montague, W., Howell, S.L. & Green, I.C. (1976). Insulin release and the microtubular system of the islets of Langerhans: Effects of insulin secretagogues on microtubule subunit pool size, *Horm. Metab. Res.*, 8, 166 – 169.
- 26. Pipeleers, D.G., Pipeleers-Marichal, M.A. & Kipnis, D.M. (1976). Microtubule assembly and the intracellular transport of secretory granules in pancreatic islets, *Science*, 191, 88 – 90.
- Pipeleers, D.G., Pipeleers-Marichal, M.A., Sherline, P. & Kipnis, D.M. (1977). A sensitive method for measuring polymerized and depolymerized forms of tubulin in tissues, J. Cell. Biol., 74, 341 – 350.
- Reaven, E. (1982). Stereological analysis of microtubules in cells with special reference to their possible role in secretion, *Methods. Cell. Biol.*, 25, 273 – 283.
- Reaven, E.P., Cheung, Y. & Miller, M.D. (1977). Quantitive analysis of tubulin and microtubule compartments in isolated rat hepatocytes, *J. Cell. Biol.*, 75, 731 – 742.
- 30. Reaven, E.P. & Reaven, G.M. (1977). Distribution and content of microtubules in relation to the transport of lipid: An ultrastructural quantitative study of the absorptive cell of the small intestine, J. Cell. Biol., 75, 559 – 572.
- Schulze, E. & Kirschner, M. (1988). New features of microtubule behaviour observed *in vivo*, *Nature*, 334, 356 – 359.
- 32. Theron, J.J., Biagio, R. & Meyer, A.C. (1981). Circadian changes in microtubules, synaptic ribbons and synaptic ribbon fields in the pinealocytes of the baboon (*Papio ursinus*), *Cell Tissue. Res.*, 217, 405 - 413.
- 33. Tilney, L.G., Bryan, J., Bush, D.J., Fujiwara, K., Mooseker, M.S., Murphy, D.B. & Snyder, D.H. (1973). Microtubules: Evidence for 13 protofilaments, J. Cell Biol., 59, 267 – 275.
- 34. Yorde, D.E. & Kalkhoff, R.K. (1987). Morphometric studies of secretory granule distribution and association with microtubules in β-cells of rat islets during glucose stimulation, *Diabetes*, 36, 905 – 913.