

Received: 2013.03.23
Accepted: 2014.08.19
Published: 2015.01.09

Amylina w badaniach eksperymentalnych. Fibrylotwórczy polipeptyd amyloidu trzustkowego

Amylin under examination. Fibrillogenic polypeptide of pancreatic amyloid

Małgorzata Marszałek

Zakład Biofizyki Medycznej, Katedra Biofizyki Ogólnej, Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

W przebiegu cukrzycy typu 2 (diabetes mellitus type 2 DM2, non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM) oraz w rozwoju guza insulinowego trzustki, obserwuje się w obrębie wysp Langerhansa patologiczne depozyty zwane amyloidem. W skład amyloidu trzustki wchodzi m.in. polipeptyd wytwarzany przez komórki beta, zwany amyliną. Nieprawidłowo zwinięta, fibrylująca cząsteczka amyliny, w postaci nierozpuszczalnych fibryli powoduje dysfunkcję, niszczenie i utratę komórek wysp, postępującą destrukcją narządu i tym samym postęp choroby. W pracy przedstawiono skład amyloidu trzustki, wyspy Langerhansa jako mikrośrodowisko formowania amyloidu, występowanie amyliny i amyloidu w świecie zwierząt i u człowieka, a także kryteria uznania formowanych depozytów za amyloid.

Słowa kluczowe:

amylina • fibrylotwórczy polipeptyd amyloidu trzustkowego

Summary

In patients or animals affected by 2 type diabetes mellitus (diabetes mellitus type 2, DM2, non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM) or pancreatic tumor disease e.g., insulinoma, some pathological deposits, called amyloid, are observed among cells of islets of Langerhans. Among other constituents, pancreatic deposits consist of an insoluble, fibrillar form of peptide neurohormone termed amylin, produced by pancreatic beta cells. It is thought that formation of fibrillar deposits of misfolded and aggregated peptide is highly toxic to beta cells and leads to cell dysfunction, cell loss, pancreas destruction and progress of the disease.

This relatively small, 37-amino acid peptide constitutes a serious scientific, research and to some extent a medical problem. This article presents amylin as a fibrillating molecule which participates in formation of amyloid deposits in human and animal pancreas, Langerhans islets as a microenvironment of pancreatic amyloid formation, occurrence of amylin and amyloid in animals and humans, and physico-chemical requirements to meet to name amylin deposit as amyloid.

Keywords:

amylin • pancreatic amyloid • type 2 diabetes mellitus • aggregation • fibrillation

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1135414>

Word count: 4596
Tables: –
Figures: 4
References: 88

Adres autorki: dr Małgorzata Marszałek, Zakład Biofizyki Medycznej, Katedra Biofizyki Ogólnej, Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki, ul. Pomorska 143, Łódź; e-mail: mtmarsz@wp.pl

Wykaz skrótów: **AFM** – technika mikroskopii sił atomowych (atomic force microscopy); **CGRP** – neuropeptyd związany z genem kalcytoniny (calcitonine gene related peptide); **EM** – technika mikroskopii elektronowej (electron microscopy); **IAPP** – amyloidowy polipeptyd wysp trzustkowych (islet amyloid polypeptide); **ThS** – tioflawina S (thioflavine S), **ThT** – tioflawina T (thioflavine T).

WSTĘP

Amyloid trzustkowy, który jest cechą patomorfologiczną cukrzycy typu 2, występuje u ponad 90% chorych, przynajmniej w jednej wyspie trzustkowej [15]. Mechanizm odpowiadający początkowo za zaburzenia w funkcjonowaniu wysp Langerhansa, a następnie za ich samodestrukcję nie jest znany, ale wiadomo, że głównym jej sprawcą jest stosunkowo mały, liczący 37 aminokwasów, polipeptyd – amyлина. W czasie badań prowadzonych na różnych gatunkach zwierząt stwierdzano, że obecność amyliny nie zawsze wiązała się jednak z formowaniem złogów amyloidu w trzustce. Czasem, mimo stanu chorobowego organizmu, depozytów w trzustce w ogóle nie wykrywano.

Wyniki przeprowadzanych eksperymentów stawały nowe wymagania metodyczne. Rozwijano i udoskonalano metody badań amyloidu, zwłaszcza techniki jego detekcji. Wypracowano kanon postępowania eksperymentalnego i ustalono kryteria, pozwalające uznać formowane depozyty za amyloid. Stworzono podstawy do dalszych badań samego procesu fibrylacji amyliny. Nie było to jednak łatwe w chwili odkrywania amyliny i nadal pozostaje problemem. Wyjątkowa nierozpuszczalność i szybka, po wyizolowaniu, fibrylacja amyliny w warunkach *in vitro* stanowi poważne wyzwanie metodyczne. Jest to polipeptyd niezwykle trudny do badań i dlatego liczne prace eksperymentalne prowadzi się na polipeptydzie syntetycznym lub jego syntetycznych fragmentach.

HISTORIA BADAŃ AMYLOIDU TRZUSTKOWEGO I ODKRYCIE AMYLINY

Pierwsze prace eksperymentalne z 1890 r., wykonane przez Josepha von Mehringa i Oskara Minkowskiego, polegające na uszkodzeniu lub całkowitym usunięciu trzustki psa, dowiodły, że istnieje związek między tym narządem a zaburzeniami w metabolizmie cukrów [cyt. za 67]. Prowadzono także badania, głównie histologiczne, wykonywane *post mortem* i analizowano obserwowane zmiany patologiczne w obrębie trzustki u osób cierpią-

cych z powodu cukrzycy. Obecność u pacjentów chorych na cukrzycę nieregularnych, rozproszonych, ale homogennych, nierozpuszczalnych i szklistych depozytów zwanych hyaliną (*hyaline* z greckiego – szklisty), lokujących się jedynie w obrębie wysp Langerhansa słusznie wiązano z przebiegiem tej choroby, ale traktowano je jako wynik degeneracyjnych zmian patologicznych wysp [68]. Korelację między obecnością złogów a cukrzycą potwierdzono, ale do pewnego stopnia. Zauważono, że u 1/3 osób chorych na cukrzycę złogów nie było, ale czasem odnawiano je w trzustkach osób niecierpiących na cukrzycę. W tym ostatnim, zaskakującym przypadku rozważano rolę nadciśnienia i choroby nerek, a także uwikłanie w proces tworzenia amyloidu dodatkowo jeszcze etapu zachodzącego w naczyniach krwionośnych. Było to niezwykle kompleksowe i głębokie, wręcz nowatorskie – nie tylko na owe czasy – podejście do problemu formowania amyloidu u osób chorych. Zdarzało się, że depozyty odnawiano w trzustce osób zdrowych, ale częściej u osób w starszym wieku [14,49]. Obecnie sądzi się, że nie jest to związane z procesem starzenia się organizmu [15]. W przeprowadzanych badaniach zwrócono także uwagę na niezwykle istotny szczegół, a mianowicie na ograniczone wyłącznie do komórek trzustki umiejscowienie wykrywanych złogów. W tym przypadku należało zastosować termin amyloidozą miejscową (zlokalizowaną), w przeciwieństwie do amyloidozы uogólnionej (systemowej, układowej), gdy depozyty amyloidu są rozproszone w różnych miejscach organizmu [27].

Złogi, z czasem określane jako amyloid, odnawiano także w trzustce zwierząt w przebiegu cukrzycy spontanicznej, np. u kota, u wielu małych wąskonosych – makaków [37,41,70]. Zdarzało się, że amyloid był obecny w trzustce np. kota, choć nie było objawów choroby [87]. Niekiedy u zwierząt, mimo ich stanu chorobowego nie wykrywano amyloidu, np. u psa chorego na cukrzycę z poważnymi zmianami patologicznymi trzustki i degeneracji komórek wysp Langerhansa złogów takich nie odnawiano [46]. Uzyskiwane sprzeczne wyniki były trudne do wyjaśnienia i zrozumienia.

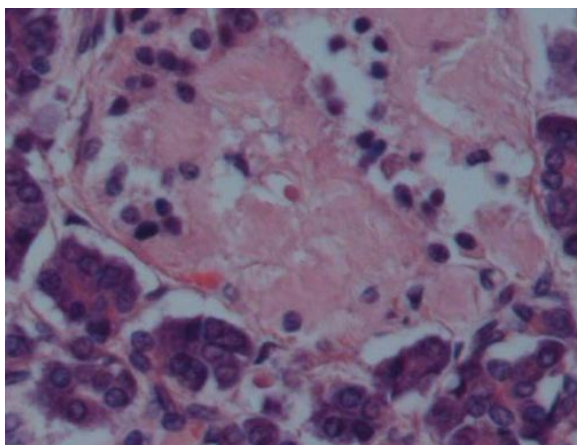
Z czasem próbowano wyjaśnić też naturę chemiczną odnajdowanych depozytów. Ich niewielkie ilości i to, że były nierozpuszczalne, nie ułatwiało badań. W 1961 r. Ehrich i Ratner wykazali, że materiał wyodrębniony z obszaru wysp Langerhansa cechuje wiązanie zasadowego barwnika – czerwieni Kongo [25]. Towarzyszyły temu pojawiająca się dwójłomność i dichroizm w świetle spolaryzowanym. Dotąd mechanizm wiązania tego i innych barwników, choć obecnie już na poziomie molekularnym, nie jest rozpoznany. Następnie włóknisty charakter amyloidu wykazano w badaniu na włókna srebrochłonne (argyrofilne, argentofilne). W mikroskopie świetlnym amyloid wydawał się substancją amorficzną, homogenną, przezroczystą, nawet szklistą, a w barwieniu hematoksyliną-eozyną był eozynofilny, przybierając różowe zabarwienie (ryc.1). Fibrylną naturę amyloidu potwierdzono w badaniach techniką mikroskopii elektronowej. Fibryle, ułożone w pęczki, deponowane zazwyczaj jako twory zewnątrzkomórkowe, prowadziły do uszkodzenia otaczających je tkanek (ryc.2).

W 1986 r. Westermarck i wsp. i w 1987 r. Cooper i wsp. wykazali, że w amyloidzie odnajdywanym u ludzi w obrębie guzów typu insulinoma (guz insulinowy trzustki wywodzący się z komórek beta), u osób chorych na cukrzycę typu 2 i u kota, także chorego na cukrzycę, białkową część depozytu stanowi 37-aminokwasowy monomer o masie około 3905 Da, zawierający na swym N-końcu wewnątrzłańcuchowy mostek dwusiarczkowy, utworzony między 2 a 7 aminokwasem [17,18,82,83]. Niewątpliwym sukcesem było rozpuszczenie wyjątkowo opornego białka. Cooper nadał mu wówczas nazwę diabetes associated peptide (DAP). Ten sam autor zmienił ją w 1988 r. na amylinę, słusznie sugerując, że pełni ona funkcję hormonu [16]. Zmieniono również nazwę (funkcjonującą od 1986 r.) insulinoma amyloid peptide (IAP) na: islet amyloid peptide, a następnie na: islet amyloid polypeptide (IAPP). Nazwa ta wraz z terminem „amyлина” funkcjonuje obecnie w piśmiennictwie, ale jest kojarzona z przemysłem farmaceutycznym i często (celowo) zastępowany skrótem IAPP [94]. W pracy obie nazwy są stosowane zamiennie. Jednocześnie udowodniono, że immunoreaktywność przeciwciał skierowanych wobec amyliny jest ujawniana zarówno w obrębie amyloidu trzustki, jak i w komórkach beta wysp Langerhansa człowieka, a także w komórkach guzów typu insulinoma u człowieka i w amyloidzie u kotów [18,56,82].

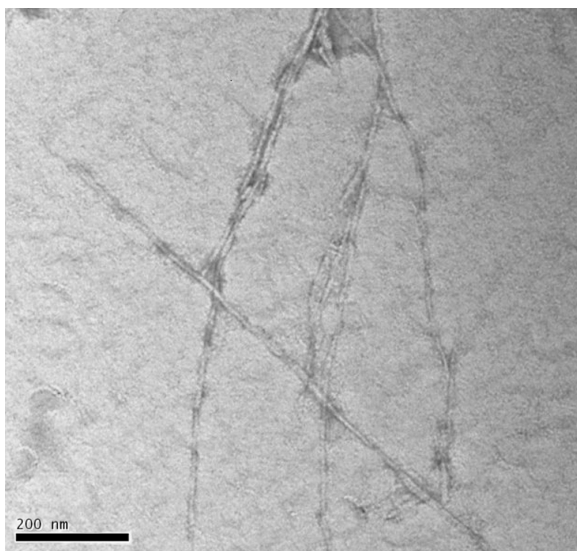
SKŁAD AMYLOIDU TRZUSTKI

Obecnie wiadomo, że w skład amyloidu trzustki, oprócz zasadniczego polipeptydu jakim jest amyлина i jej proforma, wchodzi także inne białka, określane terminem „patologiczne chaperony”. Są to: białko A (serum amyloid A, SAA), białko P surowicy (serum amyloid component P, SAP), któremu jest przypisywana rola ochronna przed degradacją i usuwaniem amyloidu z komórki, apolipoproteina E (Apo E) i glikozoaminoglikan (GAG) – proteoglikan – siarczan heparanu zwany Perlecanem, którego reszty cukrowe odpowiadają za reakcję amylo-

idu z jodem [30]. Perlecan jest stosunkowo powszechnym białkiem i głównym składnikiem błony podstawnej komórek śródbłonna, gdzie jest syntetyzowany. Być może ma to znaczenie w akceleracji procesu fibrylacji, zwłaszcza że w warunkach *in vitro* perlecan może nasilać proces fibrylacji [9]. W skład amyloidu trzustki wchodzi także jony wapnia obecne w postaci nierozpuszczalnych agregatów. Składniki te, być może, mają znaczenie w stabilizacji struktury amyloidu. Niezwykle istotną cechą amyloidu trzustki jest stosunkowo niewielka zawartość tryptofanu w porównaniu z zawartością tego aminokwasu w innych depozytach amyloidowych w organizmie [63,80]. Złogi amyloidu są odnajdywane głównie pozakomórkowo, choć zaobserwowano także wewnątrzkomórkowe formowanie depozytów, np. u myszy z ekspresją amyliny ludzkiej, a także w ludzkich komórkach wysp trzustki transplantowanych myszom [20,71].



Ryc. 1. Amyloid w obrębie ludzkich wysp Langerhansa w przebiegu zaawansowanej cukrzycy, barwienie hematoksyliną i eozyną. Zdjęcie otrzymano dzięki uprzejmości Prof. G. Westermarck



Ryc. 2. Fibryle syntetycznej amyliny ludzkiej widziane w mikroskopie elektronowym. Zdjęcie otrzymano dzięki uprzejmości Prof. L.Serpell

WYSPI LANGERHANSA MIKROŚRODOWISKIEM FORMOWANIA AMYLOIDU TRZUSTKOWEGO

Wyspy Langerhansa, stanowiące około 1-2% masy trzustki, mają złożoną budowę i dlatego często są określane w piśmiennictwie jako mikronarząd. Owalne bądź okrągłe skupiska komórek, o średnicy około 50-250 μm , otacza torebka kolagenowa i powłoka glejowa sprawiając, że jawią się one jako wyspy w otaczającej je, przeważającej masie komórek egzokrynych, które budują około 98% masy trzustki. Wyspy są zatem rozproszonym gruczołem wydzielania wewnętrznego. Zbudowane są z komórek endokrynych pochodzenia nabłonkowego oraz nielicznych komórek o pochodzeniu nienabłonkowym, tj. komórek tkanki łącznej, komórek nerwowych sieci współczulnej, przywspółczulnej, komórek zwojowych, perycytów, makrofagów i komórek dendrytycznych oraz komórek bogatej sieci naczyń krwionośnych wysp [5,10,26,32,57,79].

Wszelkie miejscowe zaburzenia funkcji poszczególnych komórek czy cytoarchitektoniki wysp niekorzystnie wpływają na pracę mikronarządu, całej trzustki, a w konsekwencji całego organizmu. Pierwsze, nieuchwytnie etapy fibrylacji amyliny prowadzą początkowo do dysfunkcji komórek beta z powodu ich stopniowego uszkodzenia. Z czasem postępujący proces fibrylacji ujawnia się odkładaniem rosnących fibryli w postaci złogów amyloidu. Zaburzają one pracę także innych komórek wysp trzustki [19,32].

W 1977 r. Capella i wsp. podjęli próbę uporządkowania nazewnictwa odnoszącego się do komórek endokrynych wysp trzustki, a także do wywodzących się z tych komórek nowotworów [7]. Wyróżniono wówczas następujące typy komórek endokrynych: A, B, D, D₁, F, Ec, G i S. Komórki te oznaczono dużymi literami alfabetu łacińskiego i/lub małymi literami alfabetu greckiego, funkcjonującymi jako starsze, choć częściej spotykane nazewnictwo. W nieco archaicznej wersji komórki endokryne określano także cyframi obu alfabetów [26,48,55,57].

Komórki A wysp trzustki (komórka α) (α -cell of pancreatic islets, glucagon-secretin cell) stanowią około 15-20% masy wysp trzustki, wydzielają glukagon, uwalniają też pankreostatynę, produkt trawienia chromograniny A. Komórki B wysp trzustki (komórka β) (β -cell of pancreatic islets, insulin, amylin-secretin cell), opisane już w 1907 r., stanowią szacunkowo 50-80% masy wysp trzustki, tj. około 500-1500 mg, co odpowiada liczbie około 10^9 komórek. Uwalniają insulinę, amylinę i ich proformy, peptyd C, a także np. neuroprzekaznik GABA (kwas γ -aminomasłowy). Komórki D wysp trzustki (komórka δ lub komórka typu III) (D-cell of pancreatic islets) opisano nieco później, bo w 1931 r. i stanowią około 3-10% masy wysp. Uwalniają somatostatynę (dawna nazwa somatotropin release inhibitor factor). Pozostałe, wymienione na wstępie, typy komórek stanowią mniej niż 1% masy trzustki. Są to: komórki D₁ (IV

typu wysp trzustki) (D₁-cell of pancreatic islets), które uwalniają wazoaktywny peptyd jelitowy (vasoactive intestinal peptide, VIP) stąd też noszą nazwę: VIP-cells, komórki F wysp trzustki (nazywane też komórkami PP, pancreatic polypeptide cells, PP-cells), których obecność ujawniono dopiero w 1971 r. Uwalniają polipeptyd trzustkowy PP (pancreatic polypeptide) i hormon adrenomedullinę (adrenomedullin, AM) a są umiejscowione głównie w wyspach głowy trzustki. Do komórek stosunkowo nielicznie występujących w wyspach należą: komórki argentofilne EC (enterochromaffin cells, EC), uwalniające serotoninę (5-hydrokсыtryptamina) i motylinę; komórki S wysp trzustki (S-cell, secretin cell), uwalniające sekretynę; komórki C wysp trzustki (C-cell of pancreatic islets) i komórki typu P [3,26,48]. Komórki G (gastrin cells, G-cells, G-type cells producing gastrin), które wytwarzają gastrynę, wykryto w wyspach Langerhansa szczurów w okresie płodowym [47,84].

Niektóre komórki wysp trzustki zidentyfikowano stosunkowo niedawno, na podstawie badań immunocytochemicznych. Należą do nich komórki E wysp trzustki (komórka ϵ) (epsilon cells, ghrelin cells), stanowiące zaledwie około 1% masy wysp trzustki, wytwarzające hormon grelinę (ghrelin, wywodząca się od praindoeuropejskiego słowa „ghre” – rosnać i relin – pobudzać wydzielanie). Ich obecność wykazano w wyspach Langerhansa w 2002 r. u myszy i w 2009 r. ujawniono je także u ludzi [2,5,31,72,84]. Obecność w obrębie wysp Langerhansa zwierząt i człowieka subpopulacji komórek progenitorowych: wielopotencjalnych i/lub prekursorów, m.in. prekursorów komórek β , jest przedmiotem badań. W 2010 r. opisano nowy typ komórek, wykrytych w ludzkich wyspach Langerhansa. Subpopulację tę stanowią nieliczne komórki pochodzenia mezenchymalnego, nieujawniające cech komórek endokrynych, stanowiące – zdaniem autorów – formy prekursorowe komórek endokrynych wysp trzustki [8].

Liczba wysp, ich rozmieszczenie i cytoarchitektonika to cechy bardzo swoiste gatunkowo. Szacuje się, że w trzustce gryzoni jest około kilkaset tysięcy wysp, u człowieka około miliona. U człowieka są one rozmieszczone w trzustce nierównomiernie, więcej jest ich w trzonie i ogonie, mniej w głowie trzustki. Ich skład komórkowy zależy od umiejscowienia w obrębie trzustki. Przypuszczalnie ma to związek z pochodzeniem narządu [75].

W poszczególnych wyspach nie muszą występować wszystkie wymienione typy komórek. U człowieka w wyspach umiejscowionych w trzonie i ogonie trzustki więcej jest komórek α , a mniej komórek PP. Komórki β i D są rozmieszczone w trzustce równomiernie. Komórkom β czasami nie towarzyszą inne komórki i wówczas są traktowane jako jednostki morfologiczne, określane terminem „single β cells”. Jest to istotne z powodu postępującego w komórkach β procesu fibrylacji amyliny, który z czasem obejmuje cały narząd. U gryzoni komórka β jest więcej (77%) niż u człowieka (55%) i lokuje się w centralnej części wyspy, otoczone przez inne typy

komórek, ułożone peryferyjnie. U człowieka komórki β są równomiernie rozproszone w masie innych komórek wyspy, ale pozostają w bliskim sąsiedztwie z komórkami α [12,32,39,48,57].

Choć funkcjonalnie komórki wysp są podobne, to jednak opisane różnice gatunkowe wpływają na ich ukrwienie. Szacuje się, że komórki wysp otrzymują 5-10 razy więcej krwi niż otaczające je obszary egzokrynne i, nie mając własnych przewodów, pozostają w bezpośrednim kontakcie z naczyniami krwionośnymi. Mikrocyrkulacja w obrębie wysp jest niezwykle istotnym czynnikiem środowiskowym dla prawidłowej funkcji komórek budujących nie tylko te mikroorgany, ale także dla innych komórek trzustki. Naczynia włosowate wysp łączą się z siecią naczyń części zewnątrzwydzielniczej trzustki. Krew zaopatrzona w hormony uwalniane przez komórki wysp Langerhansa dociera najpierw do komórek części egzokrynicznej trzustki. Sprawna mikrocyrkulacja warunkuje zatem prawidłowe działanie całego narządu, a w konsekwencji i organizmu.

Wymienione komórki wysp wytwarzają i uwalniają także inne niż już wymienione, liczne neuroprzekazniki, neurohormony i hormony peptydowe, np.: acetylocholinę, norepinefrynę, galaninę, enkefalinę, hydrolazę tyrozynową, tlenek azotu, substancję P, peptyd uwalniający gastrynę (gastrin releasing peptide), białko PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide), met-enkefalinę (methionine-enkephalin), peptyd CART (cocaine amphetamine regulated transcript, CART), cholecystokininę (cholecystokinin CCK), białko CGRP (calcitonin gene related peptide, CGRP), czynnik wzrostu IGF (insulin growth factor, IGF), peptyd YY (peptide YY, PYY), hormon uwalniający tytropinę (thyrotropin releasing hormone, TRH), bombezynę, neuropeptyd Y. Mają one wpływ na leżące w ich pobliżu czy sąsiadujące z nimi komórki trzustki i na komórki całego organizmu. We wszystkich stanach patologicznych trzustki, również w amyloidozie miejscowej, zmiany dotyczą także mikrokrążenia. Obecność złogów amyloidu utrudnia ukrwienie i wpływa na pracę narządu [5,6,10,26,30,31,32,57,60,75,79].

Formowanie amyloidu trzustkowego towarzyszy także chorobie nowotworowej trzustki. Z komórek endokrynych wysp trzustki serii APUD, gromadzących i dekarboksylujących aminy i prekursorów amin katecholowych (amine precursor uptake and decarboxylation), zwanych także systemem rozsianych komórek endokrynych (diffuse neuroendocrine system, DNES), wywodzi się grupa nowotworów stanowiąca około 10% wszystkich guzów trzustki. Określa się je terminem wyspiaki, choć nie jest to nazwa poprawna [45,48,58]. Tylko niektóre z nowotworów mają charakter guzów hormonalnie czynnych, tj. uwalniają wytwarzany hormon w ilości wywołującej efekt biologiczny. Nazwy poszczególnych nowotworów wskazują na typ komórki, z której się wywodzą. Do nazwy wydzielanego przez daną komórkę hormonu dodaje się przyrostek - oma. Do zmian czynnych należą

guzy insulinowe trzustki, wywodzące się z komórek beta wysp trzustki (insulinoma, beta cell tumour), określane także terminem insulinoma [66,85].

Guz insulinowy trzustki to nowotwór stosunkowo rzadko występujący u ludzi. W ciągu roku odnotowuje się 2-4 przypadki na milion mieszkańców. Stanowią one jednak aż 73% nowotworów wysp trzustki. Około 10% tych guzów ma charakter złośliwy, daje przerzuty do węzłów chłonnych i do wątroby. Guz, o stosunkowo małych rozmiarach 1-2 cm, umiejscawia się w miarę równomiernie w obrębie trzustki, choć czasem odnajdywany jest także w innych miejscach organizmu, np. w układzie pokarmowym [21,24].

Cukrzyca często jest pierwszym objawem toczącego się w obrębie wysp trzustki procesu nowotworowego [25,51,76]. Podobnie jak w cukrzycy typu 2, także w przebiegu tej choroby, w około 50% jej przypadków w obrazie mikroskopowym, w obrębie guza są odnajdywane obfite złogi amyloidu. U pacjentów chorych na ten nowotwór nie stwierdza się zaburzeń na etapie trawienia prekursorów amyliny i nie obserwuje się podwyższonego stężenia polipeptydu we krwi krążącej. Wydaje się, że zaburzenie sekrecji amyliny powoduje jej akumulację w komórkach beta i formowanie amyloidu [45,78]. Rolę komórek beta trzustki w patogenezie cukrzycy typu 2 omówiono w pracy [53].

AMYLINA I AMYLOID W ŚWIECIE ZWIERZĄT I U CZŁOWIEKA

Amylinę zidentyfikowano u wielu gatunków zwierząt należących do ssaków łozyskowych. Są nimi - zaczynając od naczelnych - człowiek, z małp starego świata - makak, z drapieżnych - pies, kot, puma, szop, z zającowatych - zając i królik i z gryzoni - koszatniczka pospolita, świnka morska, chomik syryjski, mysz i szczur. Zbadano także amylinę świni - udomowionego zwierzęcia pochodzącego od dzika. Dla człowieka i niektórych zwierząt konsekwencje obecności tego polipeptydu w komórce, poza pożądanymi dla organizmu funkcjami fizjologicznymi jakie ten hormon pełni, mogą być bardzo niekorzystne czy wręcz zgubne. Sytuacja taka zdarza się wtedy, gdy z powodu różnych, nierozpoznanych przyczyn cząsteczka amyliny wykazuje zdolność do formowania fibryli, a następnie wchodzi w skład depozytów amyloidowych. Złogi fibrylującej amyliny odnaleziono w organizmach: człowieka, wielu małp wąskonosych, np. makaka czubatego i makaka lapundera, także u pumy i kota [17,36,37,41,42,82]. Kota wykorzystuje się do badań wyjątkowo często, ponieważ cukrzyca typu 2 w swym przebiegu, objawach i patomorfologii najbardziej przypomina symptomy odnajdywane u ludzi, a złogi amyloidu są odnajdywane u kota zanim wystąpią objawy i rozwinie się choroba [35,66,87]. Z punktu widzenia medycyny ciekawe i w pewnym sensie obiecujące jest, że amylinę świni, w porównaniu z amyliną ludzką, ma obniżoną skłonność do formowania fibryli. Może to być istotne przy przeszczepie trzustki świni [88]. Amylinę ujawniono także w depozytach wyizolowanych z guzów

typu insulinoma odnajdywanych u człowieka i u psa [43,65,82].

Ten sam polipeptyd, wytwarzany przez komórki trzustki innych przebadanych zwierząt, np. przez inne drapieżniki: psa, szopa, a także przez wszystkie wymienione gatunki gryzoni nie formuje fibrylarnych złożeń. Do wyjątków nie należy także koszatniczka, u której odnaleziono złoże amyloidu, jednak są one formowane przez insulinę a nie amylinę. Jest to jedyny taki przypadek w świecie zwierząt [33,64,65]. Wydaje się, że amyлина tych gatunków nie wykazuje cechy fibrylotwórczości także w warunkach *in vitro* [4,42]. Jednak u dwóch przedstawicieli zajęcowatych: u nowozelandzkiego królika białego i zajęca europejskiego, mimo iż nie odnaleziono w organizmie depozytów fibrylującej amyliny, jednak wykazano, że cecha zdolności do fibrylacji polipeptydu jest ujawniana w warunkach *in vitro*. Brak depozytów amyloidu w komórkach trzustki królika i zajęca autorzy tłumaczą niewielkim stężeniem polipeptydu w komórkach trzustki tych gatunków [11].

AMYLOIDOWE DEPOZYTY AMYLINY

Badania depozytów amyloidowych amyliny

Do analizy uformowanych depozytów amyliny w postaci amyloidu wykorzystuje się dwa związki: czerwień Kongo (Congo Red) i czasami tioflawinę S (thioflavine S, ThS), których mechanizm działania nie jest do końca poznany.

Czerwień Kongo (sól disodowa kwasu 4-amino-3-[4-(1-amino-4-sulfonatonaftalen-2-yl)diazenylofenylo]fenylo]diazenylo-naftaleno-1-sulfonowego) należy do grupy barwników azowych, o których wiadomo, że silnie wiąże się z włóknami celulozy, włóknami amyloidu i, jak ostatnio stwierdzono, z niektórymi białkami. Skutki dwójłomności i dichroizmu, obserwowane po zastosowaniu czerwieni Kongo, pozwalają na wykrycie złożeń, którym jest przypisywana natura amyloidowa. Uwidoczniane są one po poddaniu badanej próbki działaniu światła spolaryzowanego, w którym jawią się jako złoże zielono-żółte lub przypominające kolor zielonego jabłka. Czerwień Kongo w stanie wolnym, niezwiązanym z amyloidem, cechuje widmo absorpcji z maksimum przy $\lambda = 498$ nm, które w wyniku związania barwnika z włóknem fibryli ulega przesunięciu do $\lambda = 541$ nm, dając w mikroskopie świetlnym wrażenie barwy czerwonej.

Tioflawina S jest homogenną mieszaniną heterogennych związków z grupy barwników benzotiazolowych i w zakresie pH 5-9 funkcjonuje w postaci anionu. Silna fluorescencja własna cząsteczki eliminuje ten związek z badań kinetycznych procesu fibrylacji. Może być jednak wykorzystywany w patomorfologii i w badaniach podstawowych depozytów amyloidu. W postaci metyloowanej barwnik funkcjonuje pod nazwą prymulina (primuline) i cechują go odmienne od tioflawiny T właściwości spektralne i fluorescencyjne. Tioflawina S w roztworze wodnym jako związek wolny, niezwią-

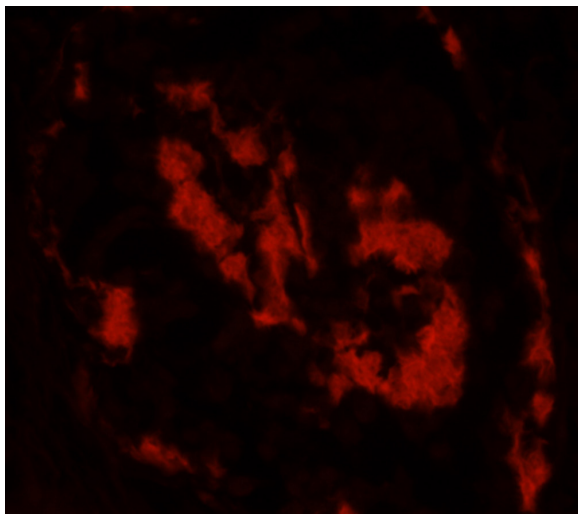
zany z amyloidem wykazuje fluorescencję z maksimum 455 nm przy wzbudzeniu falą o długości 360 nm. Po związaniu do fibryli amyloidu następuje przesunięcie hiperchromowe o około 45 nm i związek wykazuje silną niebieską fluorescencję [15,29,40,44,50].

Kryteria uznania formowanych agregatów za amyloid

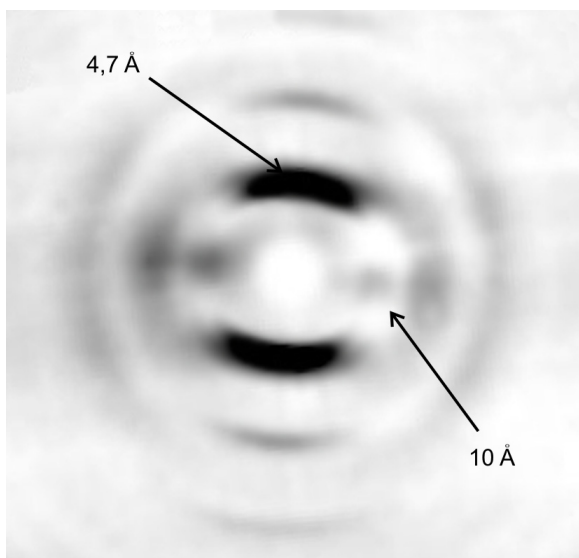
Aby formowane w różnych warunkach eksperymentalnych depozyty amyliny zostały uznane za fibryle, muszą spełniać pewne kryteria morfologiczne i fizykochemiczne. Są nimi dodatnie testy barwne: test na etapie fibrylacji peptydu/białka z tioflawiną T oraz test uformowanych depozytów w badaniu czerwieni Kongo (ryc.3) i tioflawiną S. Należy uwzględnić to, że te testy nie są całkowicie swoiste dla amyloidu, zwłaszcza test z ThT. Informacje uzyskiwane techniką mikroskopii elektronowej (electron microscopy, EM) i techniką mikroskopii sił atomowych (atomic force microscopy, AFM) potwierdzają fibrylarną postać depozytów. Obrazują one wielkość fibryli, tj. ich długość, szerokość, kształt, odzwierciedlający typ procesu fibrylacji, typ skrętu. Uwidaczniają także powtarzające się jednostki strukturalne fibryli (ryc.2).

Bardzo swoista, uporządkowana struktura formowanych fibryli i periodyczność ich struktury może zostać potwierdzona jedynie techniką dyfrakcji promieni X. Następuje to w chwili uzyskania specyficznego obrazu struktury fibrylarniej, tzw. struktury cross-beta (struktury poprzecznej, zwanej także krzyżem beta). Odpowiada ona obecności w badanym materiale jednostki rdzeniowej fibryli, za którą uznaje się tzw. strukturę β -sheet. Badania techniką dyfrakcji promieni Roentgena prowadzają się do analizy dyfraktogramów, obrazujących system plamek interferencyjnych, rozmieszczonych mniej lub bardziej symetrycznie, względem środka pola, które jest śladem padania wiązki promieni nieugiętych. Ich powstawanie to wynik działania na film lub kliszę fotograficzną, interferujących promieni Roentgena, ugiętych na uporządkowanej strukturze fibryli. Na dyfraktogramie pojawiają się dwa koliste refleksy świetlne o różnej intensywności (ryc. 4).

Pierwszy, intensywny, zwany refleksem południkowym, wskazuje na periodyczność badanej struktury, ułożonej prostopadle względem długiej osi fibryli w odległościach co 0,47 nm (4,7 Å). Refleks ten obrazuje odległości w jakiej są rozmieszczone struktury zwane odcinkami lub nićmi beta (β -strands), formowane przez aminokwasy z udziałem wiązań wodorowych. Są one ułożone równolegle względem siebie i to one budują struktury β -sheets. Drugi, mniej intensywny, zwany refleksem równoleżnikowym, może być na tyle słaby, że sprawia wrażenie jedynie rozmytych plam. Obrazuje uporządkowane jednostki β -sheets, ułożone równolegle do długiej osi włókna, a rozmieszczone w odległościach ok. 0,98nm (9,8 Å). Przyjmuje się, że protofilamenty budujące fibrylę amyliny składają się z czterech struktur β -sheets. W przypadku fibryli amyloidowych, w tym i fibryli amy-



Ryc. 3. Amyloid w obrębie ludzkich wysp Langerhansa w przebiegu zaawansowanej cukrzycy; barwienie czerwienią Kongo, obserwacja w mikroskopie fluorescencyjnym przy $\lambda_{EM} = 546$. Zdjęcie otrzymano dzięki uprzejmości Prof. G. Westermark



Ryc. 4. Dyfraktogram fibryli amyliny ludzkiej; na ryc. zaznaczono refleksy świetlne – południkowy (4,7Å) i równoleżnikowy (10Å). Zdjęcie otrzymano dzięki uprzejmości Prof. L.Serpell

liny, refleksy te obrazują przestrzenne ułożenie struktur budujących fibryłę w kierunku równoległym i prostopadłym wobec długiej osi fibryli. Takie wzajemne ułożenie wymienionych struktur daje wrażenie ich przestrzennego krzyżowania się i dlatego zostało określone terminem cross-beta.

Technikę tę zastosowano do badań amyloidu po raz pierwszy w 1968 r. [22]. Ujawniono wówczas, że układ pojawiających się dwóch charakterystycznych refleksów świetlnych odzwierciedla strukturę badanych fibryli amyloidowych, pozyskanych z wątroby i śledziony czło-

wieka. W 1988 r. technikę tę zastosowano do zbadania struktury fibrylującego syntetycznego fragmentu rdzeniowego amyliny, ulokowanego między aminokwasami 20-29. Uzyskany charakterystyczny obraz dyfrakcyjny potwierdził uporządkowaną strukturę badanego materiału, przypisaną fibrylom amyloidowym [28]. Następnie wykazano, że fibryle formowane przez pełnoaminokwasową wersję polipeptydu i przez jego fragmenty, wykazują podobieństwo rejestrowanych sygnałów, choć fibryle formowane np. przez fragment 8-20 amyliny człowieka nie dają tak doskonałych refleksów jak cały polipeptyd. Przyczyną może być to, że fibryle fragmentów amyliny są formowane gwałtowniej i znacznie szybciej [40]. Obraz fibryli amyliny uzupełnia zidentyfikowanie motywu, na który składają się pary elementów strukturalnych β -stands (pair-of-sheets organization), między którymi nie ma cząsteczek wody. Formują one dwie struktury β -sheets, które tworzą tzw. zamek steryczny – strukturalny (steric zipper) [59,98]. Analizę fibryli amyliny, techniką dyfrakcji promieni X przeprowadzili Makin i Serpell, wykazując typową strukturę cross-beta [52].

AMYLYNA W BADANIACH IN VITRO

Jak pozyskać prawidłowy materiał badawczy

O ile badania formowanych w warunkach *in vivo* depozytów amyliny wymagały pozyskania odpowiednich zwierząt bądź w przypadku ludzi – dawców narządu, natomiast przeprowadzanie badań formowanych przez amylinę fibryli w warunkach *in vitro* stwarzało poważne trudności metodyczne. Amylina jest polipeptydem trudnym zarówno do syntezy, jak i do oczyszczania z agregatów. Wyjątkowa nierozpuszczalność polipeptydu, uwarunkowana składem aminokwasowym oraz błyskawiczna fibrylacja w roztworach wodnych powoduje, że bardzo trudne lub wręcz niemożliwe staje się jego badanie. Szczególny problem metodyczny stanowi pozyskanie odpowiedniego syntetycznego materiału do badań. Mogą nim być cały, tj. 37-aminokwasowy polipeptyd lub zsyntetyzowane jego fragmenty. W każdym przypadku występują jednak liczne problemy metodyczne [34,38,56].

Zaproponowano model przygotowania syntetycznej amyliny, rozpuszczając polipeptyd nie w trifluoroetanolu (TFE), ale w heksafluoro-2-izopropanolu (HFIP). W tych warunkach amyлина jest rozpuszczalna w 100%, bez dodatkowych agregatów. Pozwala na zachowanie – przynajmniej przez jakiś czas – stabilnej, helikalnej struktury polipeptydu w roztworze, umożliwia przeprowadzenie badań fibrylującej cząsteczki i zebranie w miarę powtarzalnych wyników. Metoda ma jednak pewne ograniczenia ponieważ HFIP jest toksyczny dla komórek [34].

Nie powiodły się próby ekspresji polipeptydu w komórkach bakterii. Aby uniknąć preagregacji jego całej postaci i/lub fragmentów na etapie ekspresji w komórkach *Escherichia coli*, proponuje się syntezę rekombi-

nowanej postaci amyliny, zawierającej jako element fuzyjny białko wiążące maltozę (maltoze binding protein, MBP). W tym układzie działa ono, nie interferując w procesie fibrylacji, jako białko chaperonowe, chroniące amylinę przed preagregacją. Okazuje się jednak, że fuzja taka nie jest możliwa w przypadku syntetycznych fragmentów amyliny. Konieczne jest wówczas stosowanie pełnoaminokwasowej wersji polipeptydu. Wobec licznych problemów postuluje się także przygotowywanie świeżych preparatów amyliny każdorazowo do eksperymentu [54,86].

Innym rozwiązaniem może być model syntezy fragmentów lub całej ludzkiej amyliny z wykorzystaniem pseudoproliny. Hydrofobowe sekwencje amyliny są niezwykle trudne do otrzymania metodą syntezy w fazie stałej (solid-phase synthesis, SPPS) i sprzyjają formowaniu ubocznych produktów, które interferują w procesie cyklizacji. Stanowi to poważny problem metodyczny, którego rozwiązaniem może być wykorzystanie pseudoproliny w postaci dipeptydowych pochodnych dimetyloksazolidyny (tzw. Fmoc-pseudoprolina-oxazolidyna). Co więcej, wprowadzenie pseudoproliny zapobiega formowaniu na etapie syntezy struktur β -sheet, które sprzyjają agregacji polipeptydu [1,69]. Wprowadzenie do amyliny ludzkiej trzech reszt proliny, obecnych w niefibrylującej amylinie szczura, pozwoliło na zsyntetyzowanie cząsteczki stosowanej jako materiał badawczy i jako lek pod nazwą Symlin.

Wydaje się, że krótsze fragmenty są łatwiejsze do analizy. Syntetyczne „surowe” peptydy wymagają jednak wieloetapowego przygotowania do dalszych badań, by uzyskać preparat o czystości przynajmniej 95%. Na etapie oczyszczania istotne jest eliminowanie istniejących w roztworach agregatów polipeptydu, które inicjują proces fibrylacji, a także uwzględnienie zależności od warunków (pH) rozpuszczalności amyliny [62]. Masy cząsteczkowe otrzymanych peptydów różnią się jednak masą cząsteczkową od mas oczekiwanych, są zazwyczaj nieco większe (np. dla fragmentu amyliny 24-37 masa oczekiwana wynosi 1383,4 g/mol, a faktyczna 1405,8 g/mol). Różnice te tłumaczy wiązanie jonów sodu bądź potasu. Inną metodyczną „pułapką” jest niezbędny etap filtracji. Wymaga on odpowiedniego przygotowania, tj. wielokrotnego przemycia odpowiedniego filtra i strzykawki. Zaniedbanie tego etapu skutkuje wprowadzeniem do prób zanieczyszczeń absorbujących UV. Zmiana warunków eksperymentalnych (np. pH) sprawia, że nieodzowne staje się monitorowanie i eliminowanie pojawiających się w próbkach precypitatów amyliny lub jej fragmentów. Etap rozpuszczania polipeptydu i filtracji jest niezwykle istotny, gdyż eliminuje większość agregatów powstających w roztworze i sprawia, że analizie (np. metodą CD) jest poddawany w miarę stabilny preparat. Jedynie próbki całkowicie rozpuszczone, zupełnie pozbawione agregatów pozwalały na uzyskiwanie powtarzalnych wyników, np. metodą turbidymetryczną. Obecność w badanych próbkach jakichkolwiek form agregatów eliminuje możliwość uzyskania powtarzalnych wyników. Funkcjonują

one w roztworze jako ziarna polimeryzacji („seeds”) i całkowicie zmieniają warunki eksperymentu prowadzonego w czasie, wpływając na wynik końcowy [73,77].

Odrębny problem metodyczny stanowią produkty spontanicznej deamidacji polipeptydu. W tym procesie główną rolę odgrywa reszta kwasu asparaginowego, reszta glicyny, a także obecność fosforanów, które nasilają ten proces. Niezwykle ważny jest także czynnik czasu, powodujący starzenie się preparatu (aging) czego wynikiem jest gromadzenie się produktów deamidacji, traktowanych jako zanieczyszczenie preparatu. Także i one działają jako ziarna polimeryzacji, zapoczątkowując proces fibrylacji. Wykazano, że czyste próbki analizowanego polipeptydu, pozbawione produktów deamidacji nie fibrylują. Natomiast dodanie nawet niewielkich ilości takich produktów, stanowiących mniej niż 5% próbki, wpływa indukująco na proces fibrylacji do tej pory niefibrylującego polipeptydu. Wydaje się, że pewne znaczenie może mieć protonacja produktów deamidacji. Stwierdzono, że ze względu na charakter samego polipeptydu należy zachować szczególnie wysokie parametry czystości przygotowywanych preparatów, które powinny znacznie przewyższać parametry uznane za standardowe i za wystarczające do badań innych białek i peptydów [61].

Powyższe uwagi nie wyczerpują wszystkich problemów, jakie sprawia amyлина w probówce, w kuwecie czy na etapie jej oczyszczania, np. w chwili kontaktu z powierzchnią filtra. Postać w jakiej amyлина pozostaje w roztworze, jest odmienna od tej jaką przyjmuje w zetknięciu z powierzchnią np. kwarcu, kiedy to zmiany konformacyjne są związane z procesami adsorpcji do powierzchni szkła/kryształu. Jest to polipeptyd niezwykle łatwo i nieswoicie, ale silnie adsorbujący się do powierzchni. Niezwykle istotne jest, aby przy pomiarach, każdorazowo sprawdzić stan czystości kuwety, to znaczy wykonać skany kuwety wypełnionej wodą przed badaniem polipeptydu i po jego analizie. Zauważono, że polipeptyd zaadsorbowany na powierzchni ścian kwarcowej kuwety jest na tyle trwały, że nie daje się usunąć przepłukiwaniem kuwety wodą. Jest to niezwykle ważne przy interpretacji wyników badań, gdyż zmienia całkowicie obraz eksperymentu [77]. Poszukiwania nowych metod, rozwiązań i podejścia do zagadnienia syntezy polipeptydu i otrzymywania jego czystych preparatów trwają.

ZAKOŃCZENIE

Wykrycie fibrylującego składnika amyloidu trzustkowego – amyliny otworzyło nowy etap postrzegania i rozumienia zjawiska fibrylacji, a z czasem także rozumienia roli tego procesu w rozwoju cukrzycy typu 2. Odmienne zachowanie amyliny pochodzącej od różnych gatunków, tj. ujawniana bądź nieujawniana cecha zdolności do fibrylacji, stało się trudnym, ale niezwykle ważnym wyzwaniem badawczym. Mimo trudności metodycznych w pozyskaniu amyliny do badań, jej synte-

tyczne analogi umożliwiły postawienie kolejnych pytań badawczych. Uzyskane odpowiedzi pozwoliły poszerzyć wiedzę na temat fizjologicznej roli tego hormonu, a może nawet neurohormonu w regulacji wielu procesów w organizmie, w tym metabolizmu glukozy. Amylina została wpisana jako trzeci, oprócz insuliny i glukagonu istotny czynnik regulujący stężenie cukru.

PODZIĘKOWANIE

All photographs included in the paper have been kindly provided by Professor Louise Serpell, (School of Life Sciences, University of Sussex, Great Britain) and by Professor Gunilla Westermark (Department of Medical Cell Biology, Biomedical Center, Uppsala, Sweden) and have never been published before.

PIŚMIENICTWO

[1] Abedini A., Raleigh D.P.: Incorporation of pseudoproline derivatives allows the facile synthesis of human IAPP, a highly amyloidogenic and aggregation-prone polypeptide. *Org. Lett.*, 2005; 7: 693-696

[2] Andralojc K.M., Mercalli A., Nowak K.W., Albarello L., Calcagno R., Luzi L., Bonifacio E., Doglioni C., Piemonti L.: Ghrelin-producing epsilon cells in the developing and adult human pancreas. *Diabetologia*, 2009; 52: 486-493

[3] Barreto S.G., Carati C.J., Toouli J., Saccone G.T.: The islet-acinar axis of the pancreas: more than just insulin. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2010; 299: G10-G22

[4] Betsholtz C., Christmansson L., Engström U., Rorsman F., Svensson V., Johnson K.H., Westermark P.: Sequence divergence in a specific region of islet amyloid polypeptide (IAPP) explains differences in islet amyloid formation between species. *FEBS Lett.*, 1989; 251: 261-264

[5] Brass B.J., Ablev Z., Liao E.P., Poretsky L.: Endocrine Pancreas. Chapter 3, W: Principles of Diabetes Mellitus. 2, red.: L. Poretsky. Springer Science+Business Media 2010, 37-55

[6] Cabrera O., Berman D.M., Kenyon N.S., Ricordi C., Berggren P.O., Caicedo A.: The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 2334-2339

[7] Capella C., Solcia E., Frigerio B., Buffa R., Usellini L., Fontana P.: The endocrine cells of the pancreas and related tumours. Ultrastructural study and classification. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histol.*, 1977; 373: 327-352

[8] Carlotti F., Zaldumbide A., Loomans C.J., van Rosenberg E., Engelse M., de Koning E.J., Hoeben R.C.: Isolated human islets contain a distinct population of mesenchymal stem cells. *Islets*, 2010; 2: 164-173

[9] Castillo G.M., Cummings J.A., Yang W., Judge M.E., Sheardown M.J., Rimvall K., Hansen J.B., Snow A.D.: Sulfate content and specific glycosaminoglycan backbone of perlecan are critical for perlecan's enhancement of islet amyloid polypeptide (amylin) fibril formation. *Diabetes*, 1998; 47: 612-620

[10] Cerf M.E.: Islet organogenesis, angiogenesis and innervation. *Cell Biol. Int.*, 2011; 35: 1065-1078

[11] Christmansson L., Betsholtz C., Leckström A., Engström U., Cortie C., Johnson K.H., Adrian T.E., Westermark P.: Islet amyloid polypeptide in the rabbit and European hare: studies on its relationship to amyloidogenesis. *Diabetologia*, 1993; 36: 183-188

I would like to express my the greatest gratitude and appreciation to Professor L. Serpell and Professor G. Westermark.

Wszystkie zdjęcia ilustrujące artykuł zostały opublikowane dzięki uprzejmości Pani Profesor Louise Serpell (School of Life Sciences, University of Sussex, Wielka Brytania) i Pani Profesor Gunilla Westermark (Department of Medical Cell Biology, Biomedical Center, Uppsala, Szwecja). Zdjęcia te nie były wcześniej publikowane.

Składam wyrazy najserdeczniejszego podziękowania i szczerzej wdzięczności Pani Profesor L. Serpell i Pani Profesor G. Westermark.

[12] Christopher R.J., Takeuchi K., Lee B.: Rodent Models of Diabetes. W: Principles of Diabetes Mellitus, red.: L. Poretsky. Springer Science+Business Media, 2010: 165-178

[13] Clark A., Cooper G.J., Lewis C.E., Morris J.F., Willis A.C., Reid K.B., Turner R.C.: Islet amyloid formed from diabetes-associated peptide may be pathogenic in type-2 diabetes. *Lancet*, 1987; 2: 231-234

[14] Clark A., Nilsson M.R.: Islet amyloid: a complication of islet dysfunction or an aetiological factor in Type 2 diabetes? *Diabetologia*, 2004; 47: 157-169

[15] Clark A., Saad M.F., Nezzar T., Uren C., Knowler W.C., Bennett P.H., Turner R.C.: Islet amyloid polypeptide in diabetic and non-diabetic Pima Indians. *Diabetologia*, 1990; 33: 285-289

[16] Cooper G.J., Leighton B., Dimitriadis G.D., Parry-Billings M., Kowalchuk J.M., Howland K., Rothbard J.B., Willis A.C., Reid K.B.: Amylin found in amyloid deposits in human type 2 diabetes mellitus may be a hormone that regulates glycogen metabolism in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988; 85: 7763-7766

[17] Cooper G.J., Willis A.C., Clark A., Turner R.C., Sim R.B., Reid K.B.: Purification and characterisation of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987; 84: 8628-8632

[18] Cooper G.J., Willis A.C., Reid K.B., Clark A., Baker C.A., Turner R.C., Lewis C.E., Morris J.F., Howland K., Rothbard J.B.: Diabetes-associated peptide. *Lancet*, 1987; 2: 966

[19] Czako L., Hegyi P., Rakonczay Z. Jr., Wittmann T., Otsuki M.: Interactions between the endocrine and exocrine pancreas and their clinical relevance. *Pancreatol.*, 2009; 9: 351-359

[20] de Koning E.P.J., Morris E.R., Hofhuis F.M., Posthuma G., Höpener J.W., Morris J.F., Capel P.J., Clark A., Verbeek J.S.: Intra- and extracellular amyloid fibrils are formed in cultured pancreatic islets of transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 8467-8471

[21] Dumoulin K., Rosate E.F.: The Pancreas. W: The clinical review: an integrated basic and clinical science study guide. Red.: P. Tluri, C. Karakousis, P.M. Porrett, L.R. Kaiser. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2006, 480

[22] Eanes E.D., Glenner G.G.: X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J. Histochem. Cytochem.*, 1968; 16: 673-677

[23] Ehrlich J.C., Ratner I.M.: Amyloidosis of the islets of Langerhans.

- A restudy of islet hyalin in diabetic and non-diabetic individuals. *Am. J. Pathol.*, 1961; 38: 49-59
- [24] Fendrich V., Langer P., Bartsch D.K.: Sporadic pancreatic endocrine tumors. W: *Pancreatic Cancer*, red.: J.P. Neoptolemo, R. Urrutia, J.L. Abbruzzese, M.W. Büchler. Springer Science + Business Media, 2010: 201-227
- [25] Fonseca V., John-Kalarickal J.: Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, genetics, pathogenesis, and clinical manifestations. W: *Principles of Diabetes Mellitus*. red.: L. Poretzky. Springer Science+Business Media, 2010: 203-220
- [26] Fritsch H.: Endocrine system: pancreatic islets. W: *Color atlas of human anatomy. Internal organs. Tom 2*, red.: H. Fritsch. Kuehnel Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2009, 354-355
- [27] Glenner G.G., Eanes D., Bladen H.A., Linke R.P., Termine J.D.: β -pleated sheet fibrils. A comparison of native amyloid with synthetic protein fibrils. *J. Histochem. Cytochem.*, 1974; 22: 1141-1158
- [28] Glenner G.G., Eanes E.D., Wiley C.A.: Amyloid fibrils formed from a segment of the pancreatic islet amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988; 155: 608-614
- [29] Groenning M.: Binding mode of thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils – current status. *J. Chem. Biol.*, 2010; 3: 1-18
- [30] Hayden M.R., Tyagi S.C.: "A" is for amylin and amyloid in type 2 diabetes. *J. Pancreas*, 2002, 2: 124-139
- [31] Heller R.S.: The comparative anatomy of islets. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2010; 654: 21-37
- [32] Heller R.S., Jenny M., Collombat P., Mansouri A., Tomasetto C., Madsen O.D., Mellitzer G., Gradwohl G., Serup P.: Genetic determinants of pancreatic ϵ -cell development. *Dev. Biology*, 2005; 286: 217-224
- [33] Hellman U., Wernstedt C., Westermark P., O'Brien T.D., Rathbun W.B., Johnson K.H.: Amino acid sequence from degu islet amyloid-derived insulin shows unique sequence characteristics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990; 169: 571-577
- [34] Higham C.E., Jaikaran E.T., Fraser P.E., Gross M., Clark A.: Preparation of synthetic human islet amyloid polypeptide (IAPP) in a stable conformation to enable study of conversion to amyloid-like fibrils. *FEBS Lett.*, 2000; 470: 55-60
- [35] Hoenig M., Hall G., Ferguson D., Jordan K., Henson M., Johnson K., O'Brien T.: A feline model of experimentally induced islet amyloidosis. *Am. J. Pathol.*, 2000; 157: 2143-2150
- [36] Howard C.F.Jr.: Diabetes in *Macaca nigra*: metabolic and histologic changes. *Diabetologia*, 1974; 10: 671-677
- [37] Howard C.F.Jr., Van Bueren A.: Changes in islet cell composition during development of diabetes in *Macaca nigra*. *Diabetes*, 1986; 35: 165-171
- [38] Hubbard J.A., Martin S.R., Chaplin L.C., Bose C., Kelly S.M., Price N.C.: Solution structures of calcitonin-gene-related-peptide analogues of calcitonin-gene-related peptide and amylin. *Biochem. J.*, 1991; 275: 785-788
- [39] In't Veld P., Marichal M.: Microscopic anatomy of the human islets of Langerhans. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2010; 654: 1-19
- [40] Jaikaran E.T., Higham C.E., Serpell L.C., Zurdo J., Gross M., Clark A., Fraser P.E.: Identification of a novel human islet amyloid polypeptide β -sheet domain and factors influencing fibrillogenesis. *J. Mol. Biol.*, 2001; 308: 515-525
- [41] Johnson K.H., Stevens J.B.: Light and electron microscopic studies of islet amyloid in diabetic cats. *Diabetes*, 1973; 22: 81-90
- [42] Johnson K.H., Wernstedt C., O'Brien T.D., Westermark P.: Amyloid in the pancreatic islets of the cougar (*Felis concolor*) is derived from islet amyloid polypeptide (IAPP). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 1991; 98: 115-119
- [43] Jordan K., Murtaugh M.P., O'Brien T.D., Westermark P., Betsholtz C., Johnson K.H.: Canine IAPP cDNA sequence provides important clues regarding diabetogenesis and amyloidogenesis in type 2 diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990; 169: 502-508
- [44] Kelenyi G.: On the histochemistry of azo group-free thiazole dyes. *J. Histochem. Cytochem.*, 1967; 15: 172-180
- [45] Kos-Kudła B., Bolanowski M., Hubalewska-Dydejczyk A., Krzakowski M., Marek B., Nasierowska-Guttmejer A., Lampe P., Sworczak K.: Guzy endokrynne trzustki (zasady postępowania rekomendowane przez Polską Sieć Guzów Neuroendokrynnych). *Endokrynol. Pol.*, 2008; 59: 68-86
- [46] Krumbhaar E.B.: Spontaneous diabetes in a dog. *J. Exp. Med.*, 1916; 24: 361-366
- [47] Larsson L.I., Rehfeld J.F., Sundler F., Hakanson R.: Pancreatic gastrin in foetal and neonatal rats. *Nature*, 1976; 262: 609-610
- [48] Lauwers G.Y., Mino-Kenduson M., Rubin R.: The Pancreas. W: *Rubin's Pathology. Clinicopathologic Foundations in Medicine*. red.: R. Rubin, D.S. Strayer. Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer 2008, 675-691
- [49] Leffert J.D., Newgard C.B., Okamoto H., Milburn J.L., Luskey K.L.: Rat amylin: cloning and tissue-specific expression in pancreatic islets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989; 86: 3127-3130
- [50] LeVine H.3rd.: Quantification of β -sheet amyloid fibril, structures with thioflavin T. *Methods Enzymol.*, 1999; 309: 274-284
- [51] Li D.: Diabetes and pancreatic cancer. *Mol. Carcinogenesis*, 2012; 51: 64-74
- [52] Makin O.S., Serpell L.C.: Structural characterisation of islet amyloid polypeptide fibrils. *J. Mol. Biol.*, 2004; 335: 1279-1288
- [53] Małeckki M.T., Klupa T.: Rola komórki beta trzustki w patogenezie cukrzycy typu 2. *Diabetologia Praktyczna*, 2007; 8 (Suppl. B): B1-B10
- [54] Mazor Y., Gilead S., Benhar I., Gazit E.: Identification and characterization of a novel molecular-recognition and self-assembly domain within the islet amyloid polypeptide. *J. Mol. Biol.*, 2002; 322: 1013-1024
- [55] Mianownictwo histologiczne i cytofizjologiczne polskie angielskie łańciskie. Red.: W. Sawicki, PZW, Warszawa 1998
- [56] Moriarty D.F., Raleigh D.P.: Effects of sequential proline substitutions on amyloid formation by human amylin₂₀₋₂₉. *Biochemistry*, 1999; 38: 1811-1818
- [57] Moskalewski S.: Trzustka. W: *Histologia*. Red.: K. Ostrowski, PZW, Warszawa 1988, 52
- [58] Nasierowska-Guttmejer A., Malinowska M.: Guzy neuroendokrynne układu pokarmowego (GEP NET) – dyskusja wokół nazewnictwa i klasyfikacji. *Przegl. Gastroenterol.*, 2006; 1: 16-21
- [59] Nelson R., Sawaya M.R., Balbirnie M., Madsen A.O., Riekel C., Grothe R., Eisenberg D.: Structure of the cross- β spine of amyloid-like fibrils. *Nature*, 2005; 435: 773-778
- [60] Nicolls M.R.: The clinical and biological relationship between type II diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.*, 2004; 1: 47-54
- [61] Nilsson M.R., Driscoll M., Raleigh D.P.: Low levels of asparagine deamidation can have a dramatic effect on aggregation of amyloidogenic peptides: implications for the study of amyloid formation. *Protein Sci.*, 2002; 11: 342-349
- [62] Nilsson M.R., Raleigh D.P.: Analysis of amylin cleavage products provides new insights into the amyloidogenic region of human amylin. *J. Mol. Biol.*, 1999; 294: 1375-1385
- [63] Nishi M., Chan S.J., Nagamatsu S., Bell G.I., Steiner D.F.: Conservation of the sequence of islet amyloid polypeptide in five mammals is consistent with its putative role as an islet hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989; 86: 5738-5742

- [64] Nishi M., Steiner D.F.: Cloning of complementary DNAs encoding islet amyloid polypeptide, insulin, and glucagon precursors from a New World rodent, the degu, *Octodon degus*. *Mol. Endocrinol.*, 1990; 4: 1192-1198
- [65] O'Brien T.D., Hellman U., Westermark P., Wernstedt C., Rathbun W.B., Johnson K.H.: Pancreatic islet amyloid in the degu is derived from insulin. W: *Amyloid and Amyloidosis 1990*, red.: J.B. Natvig O. Forre, G. Husby, A. Husebekk, B. Skogen, K. Sletten, P. Westermark. Kluwer Academic Publishers Dordrecht The Netherlands 1991, 462-465
- [66] O'Grady H.L., Conlon K.C.: Pancreatic neuroendocrine tumors. *Eur. J. Surg. Oncol.*, 2008; 34: 324-332
- [67] Opie E.L.: Pathological changes affecting the islands of Langerhans of the pancreas. *J. Boston Soc. Med. Sci.*, 1900; 4: 251-260
- [68] Opie E.L.: The relation of diabetes mellitus to lesions of the pancreas. Hyaline degeneration of the islands of Langerhans. *J. Exp. Med.*, 1901; 5: 527-540
- [69] Page K., Hood C.A., Patel H., Fuentes G., Menakuru M., Park J.H.: Fast Fmoc synthesis of hAmylin₁₋₃₇ with pseudoproline assisted on-resin disulfide formation. *J. Pept. Sci.*, 2007; 13: 833-838
- [70] Palotay J.L., Howard C.F.Jr.: Insular amyloidosis in spontaneously diabetic nonhuman primates. *Vet. Pathol. Suppl.*, 1982; 19 (Suppl. 7): 181-192
- [71] Paulsson J.F., Andersson A., Westermark P., Westermark G.T.: Intracellular amyloid-like deposits contain unprocessed pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP) in beta cells of transgenic mice overexpressing the gene for human IAPP and transplanted human islets. *Diabetologia*, 2006; 49: 1237-1246
- [72] Prado C.L., Pugh-Bernard A.E., Elghazi L., Sosa-Pineda B., Sussel L.: Ghrelin cells replace insulin-producing β cells in two mouse models of pancreas development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 2924-2929
- [73] Rhoades E., Agarwal J., Gafni A.: Aggregation of an amyloidogenic fragment of human islet amyloid polypeptide. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000; 1476: 230-238
- [74] Sawaya M.R., Sambashivan S., Nelson R., Ivanova M.I., Sievers S.A., Apostol M.I., Thompson M.J., Balbirnie M., Wiltzius J.J., McFarlane H.T., Madsen A.O., Riek C., Eisenberg D.: Atomic structures of amyloid cross- β spines reveal varied steric zippers. *Nature*, 2007; 447: 453-457
- [75] Scharfmann R., Xiao X., Heimberg H., Mallet J., Ravassard P.: Beta cells within single human islets originate from multiple progenitors. *PLoS One*, 2008; 3: e3559
- [76] Szczablowska D., Grys I.: Zaburzenia wewnętrzzydzielnicze w przebiegu chorób trzustki. *Pol. Merkur. Lekarski*, 2009; 26: 542-544
- [77] Tenidis K., Waldner M., Bernhagen J., Fischle W., Bergmann M., Weber M., Merkle M., Voelter W., Brunner H., Kapurniotu A.: Identification of a penta- and hexapeptide of islet amyloid polypeptide (IAPP) with amyloidogenic and cytotoxic properties. *J. Mol. Biol.*, 2000; 295: 1055-1071
- [78] van Hulst K.L., Oosterwijk C., Born W., Vroom T.M., Nieuwenhuis M.G., Blankenstein M.A., Lips C.J., Fischer J.A., Höppener J.W.: Islet amyloid polypeptide/amylin messenger RNA and protein expression in human insulinomas in relation to amyloid formation. *Eur. J. Endocrinol.*, 1999; 140: 69-78
- [79] Wang X., Meloche M., Verchere C.B., Ou D., Mui A., Warnock G.L.: Improving islet engraftment by gene therapy. *J. Transplant.*, 2011; 2011: 594851
- [80] Westermark P., Johnson K.H.: The polypeptide hormone-derived amyloid forms: nonspecific alterations or signs of abnormal peptide-processing? *APMIS*, 1988; 96: 475-483
- [81] Westermark P., Wernstedt C., O'Brien T.D., Hayden D.W., Johnson K.H.: Islet amyloid in type 2 human diabetes mellitus and adult diabetic cats contains a novel putative polypeptide hormone. *Am. J. Pathol.*, 1987; 127: 414-417
- [82] Westermark P., Wernstedt C., Wilander E., Hayden D.W., O'Brien T.D., Johnson K.H.: Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987; 84: 3881-3885
- [83] Westermark P., Wernstedt C., Wilander E., Sletten K.: A novel peptide in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986; 140: 827-831
- [84] Wierup N., Svensson H., Mulder H., Sundler F.: The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul. Pept.*, 2002; 107: 63-69
- [85] Wilander E.: Diagnostic pathology of gastrointestinal and pancreatic neuroendocrine tumours. *Acta Oncol.*, 1989; 28: 363-369
- [86] Wiltzius J.J., Sievers S.A., Sawaya M.R., Cascio D., Popov D., Riek C., Eisenberg D.: Atomic structure of the cross- β spine of islet amyloid polypeptide (amylin). *Protein Sci.*, 2008; 17: 1467-1474
- [87] Yano B.L., Hayden D.W., Johnson K.H.: Feline insular amyloid: incidence in adult cats with no clinicopathologic evidence of overt diabetes mellitus. *Vet. Pathol.*, 1981; 18: 310-315
- [88] Zhang X., Cheng B., Gong H., Li C., Chen H., Zheng L., Huang K.: Porcine islet amyloid polypeptide fragments are refractory to amyloid formation. *FEBS Lett.*, 2011; 585: 71-77

Autorka deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.