

OPTICKÉ VLASTNOSTI LANGERHANSOVÝCH OSTRŮVKŮ (OPTICAL PROPERTIES OF ISLETS OF LANGERHANS)

*Petr Zvolánek*¹, *Šárka Němcová*¹, *Daniel Hadraba*^{1,2}, *David Habart*³, *David Vondrášek*²,
*Josef Zicha*¹

¹ *České vysoké učení technické v Praze, Fakulta strojní, Praha, Česká republika, petr.zvolanek@fs.cvut.cz*

² *Akademie věd České republiky, v. v. i., Fyziologický ústav, Praha, Česká republika*

³ *Institut klinické a experimentální medicíny, Praha, Česká republika*

Abstrakt—Transplantace Langerhansových ostrůvků je jedna z metod, která slouží k terapii diabetu mellitu 1. typu. Určení objemu a kvality nebarvených ostrůvků před transplantací je přetrvávající problém. Řada přístupů identifikuje ostrůvky pomocí barvení malého vzorku z materiálu určeného k transplantaci, ale odběr vzoru je provázen významnou chybou. Náš projekt má za cíl umožnit hodnocení celého transplantovaného objemu na základě neinvazivních metod jako světelná reflektance nebo autofluorescence a okamžitou klasifikaci ostrůvků za použití segmentačního přístroje. Tento přístup povede k přesnějšímu stanovení parametrů Langerhansových ostrůvků a následnou větší prediktabilitu výsledků transplantace.

Abstract—Transplantation of the islets of Langerhans is one of the methods used for diabetes mellitus type 1 therapy. Estimation of the volume and quality of unstained islets is a longstanding problem. A number of methods identify islets by staining a small sample from the material for transplantation, but this sampling is accompanied with a significant error. Our project aims to enable the evaluation of the whole volume of the transplanted material based on non-invasive methods such as light reflectance or autofluorescence and the immediate classification of the islets using a sorting device. This approach will lead to a more accurate determination of the parameters of islets of Langerhans and a better predictability of transplantation outcomes.

Klíčová slova—*Langerhansův ostrůvek, zobrazování, velikost, reflektance, autofluorescence*

Keywords—*Islet of Langerhans, imaging, size, reflectance, autofluorescence*

1. Úvod

Langerhansovy ostrůvky jsou shluky buněk o velikosti mezi 0,1 a 0,5 mm nacházející se ve slinivce břišní, které mají mimo jiné na starosti produkci glukagonu a inzulínu – 2 hlavních hormonů regulujících hladinu glukózy v krvi. Glukagon zvyšuje hladinu glukózy a je tvořen v tzv. α -buňkách. Inzulín snižuje hladinu glukózy a je produkován v β -buňkách. Diabetes mellitus 1. typu (DM1T) je autoimunitní onemocnění způsobující úplnou ztrátu β -buněk, čímž znemožňuje přirozenou regulaci glukózy v krvi [1]. Transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků byla vyvíjena od 60. let 20. století. Významně se rozšířila po roce 2000, díky nalezení imunosupresivního protokolu. Je převážně určena nemocným s život ohrožující poruchou rozpoznávání hypoglykemie a tam, kde by transplantace celé slinivky byla příliš riziková [2].

Procedura spočívá v infúzi ostrůvků do vrátnicové žíly vedoucí do jater. Ostrůvky se následně zachytí v jaterních sinusoidách a kontinuálně regulují množství glukózy v krvi [3].

Reprodukovatelnost výsledků transplantace Langerhansových ostrůvků vyžaduje klást větší důraz na jejich kvantitu a kvalitu, které by měly být posuzovány v podobném režimu jako krevní transfúze. Jedná se o bezinfekčnost a životaschopnost ostrůvků a také o jejich funkci, objem jednotlivých ostrůvků a míru příměsí zbytkové tláně slinivky. Ta se od ostrůvků odlišuje například pomocí rychlého barvení dithizonem, který se váže na zinek v molekule inzulínu v β -buňkách ostrůvků a způsobuje jejich zbarvení do červena. Tento proces však

způsobuje znehodnocení vzorku [4]. Velice důležitým parametrem ostrůvku je jeho velikost, protože jeho přežití závisí primárně na zásobování kyslíkem pomocí difuze. Z tohoto důvodu jsou hypoxií více ohroženy větší ostrůvky [5].

Cílem našeho projektu je nalézt takové metody hodnocení viability a čistoty ostrůvků, které nebudou škodlivé pro zkoumané ostrůvky a budou tudíž použitelné pro celý objem materiálu určeného k transplantaci, a odstraní problém variability odběru vzorků. Dalším krokem bude návrh přístroje, který bude schopen vzorky měřit a třídít na základě předem stanovených parametrů a dovolí tím doktorům lépe kontrolovat vlastnosti ostrůvků určených k transplantaci, a tudíž i lépe predikovat výsledky terapie.

2. Parametry Langerhansových ostrůvků

2.1 Velikost, objem a tvar

Jak již bylo řečeno výše, velikost ostrůvku je jedním z jeho nejzásadnějších parametrů při odhadování viability [5]. Pro kvalitní zhodnocení tvarových a rozměrových parametrů se využívá například optická projekční tomografie, při které je vzorek zalit do průhledného materiálu (například agarózový gel), osvětlen a snímán kamerou při synchronizovaném otáčení vzorku kolem podélné osy. Výsledkem je velice přesná 3D rekonstrukce. Nevýhodou je složitá příprava vzorku, destrukce vzorku a časová náročnost metody [6].

Často se tedy přistupuje k odhadu rozměrů ostrůvků pomocí nahrazení jeho tvaru elipsoidem, jehož poloosy jsou odhadovány z 2 na sebe kolmých 2D průřezů [7], nebo pomocí sferoidu kdy se využívá pouze 1 průmětu [8]. Současné třídící přístroje fungující na principu průtokové cytometrie často využívají pouze 1D informaci (čas, po který objekt zastíní paprsek světla procházející dráhou objektu) a objem ostrůvku nahrazují koulí [5]. Aproximace složitějšího tvaru ostrůvku sferoidem se ukázala jako relativně nepřesná s velkou systematickou chybou. Tato chyba je větší u ostrůvků větších rozměru, které mají někdy i velice nepravidelný tvar. [6]

2.2 Optické vlastnosti

Výrazná část přístupů, které charakterizují kvalitu Langerhansových ostrůvků, spoléhá na barevné značení sledovaných struktur. Toto barvení probíhá za využití chemických látek, které se naváží do ostrůvků, čímž je další použití ostrůvku znehodnoceno [9].

Pro zobrazení nebo hodnocení ostrůvků však lze využít i velké množství „Label Free“ metod. Autofluorescence využívá fluorescenčních vlastností látek a struktur, které se ve zkoumaném objektu přirozeně vyskytují. Autofluorescence s excitací na 488 nm a detekcí 500–550 nm už byla použita pro zobrazování ostrůvků umístěných do přední komory myšího oka [7]. Autofluorescenci s více fotonovou excitací lze využít ke stanovení tzv. redox poměru – poměru intenzit pro fluorescenci flavinadeninindinukleotidu (FAD) excitovaného světlem okolo 1000 nm a nikotinamidadeninindinukleotidu (NADH) s maximem při excitaci okolo 720nm. Emisní maxima FAD a NADH jsou na 535 a 460 nm [10].

Dále je známo, že intenzita zpětně odraženého signálu při excitaci 633 nm znatelně poklesne, pokud došlo k poškození β -buněk v ostrůvcích [11]. Další metody zahrnují třeba Ramanovu spektroskopii sloužící k detekci inzulinu a glukagonu v ostrůvcích [12] nebo optická koherentní mikroskopie [13].

3. Experiment

Zkoumané ostrůvky byly izolovány z krysí slinivky v laboratoři v IKEMu, následně byly v živném roztoku tkáňové kultury převezeny na oddělení Biomatematické Fyziologického ústavu AV ČR. Po dobu, kdy na nich nebylo prováděno měření byly skladovány v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂ v prostředí. Měřena byla reflektance pro excitační vlnové délky 470–665 nm s krokem 15 nm, intenzita autofluorescence pro excitační vlnové délky 470–660 nm s krokem 10 nm na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP8 (Leica, Německo). Při měření reflektance i autofluorescence byl vždy detekován signál v pásmu vlnových délek o šířce 15 nm. U reflektance bylo toto 15nm

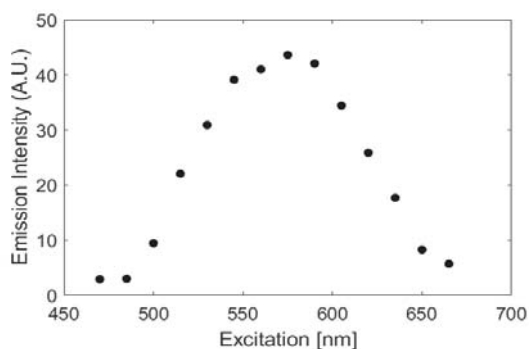
pásma umístěno symetricky okolo excitační vlnové délky, u autofluorescence šlo o na sebe navazující pásma 500-515 nm až 695-710 nm.

Intenzita emise byla stanovena jako průměrná intenzita všech pixelů ve čtverci 300 x 300 pixelů, který se celý nacházel uvnitř ostrůvku.

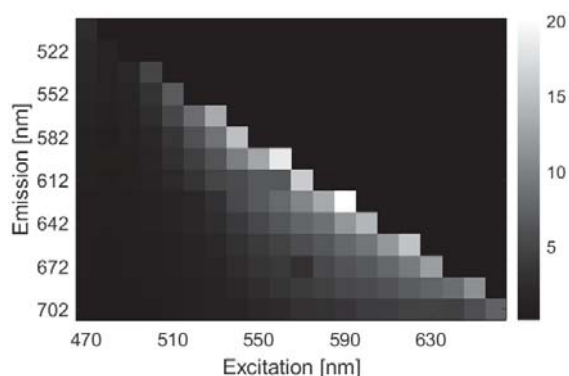
4. Výsledky

Měření zpětně odraženého světla ve viditelném spektru (Obr. 1) mělo maximum mezi vlnovými délkami 545 až 590 včetně (Obr. 2).

Signál při měření autofluorescence (Obr. 3) má 2 výrazná maxima. Jedno pro excitační vlnovou délku 560 nm s emisí 590-605 nm a druhé pro excitaci 590 nm a emisí 620-635 nm. Obecně byl velice slabý.



Obr. 2. Intenzita zpětně odraženého signálu v závislosti na excitační vlnové délce. Intenzita v rozsahu 0-100.



Obr. 3. Intenzita emise autofluorescence v závislosti na excitační a emisní vlnové délce. Intenzita v rozsahu 0-255

5. Diskuze

U měření reflektance byla očekávána větší intenzita signálu pro vlnové délky okolo 633 nm, které se dle literatury používají k hodnocení stavu β -buněk uvnitř ostrůvků [11]. Absence této vlnové délky v naměřeném spektru může znamenat, že měřené ostrůvky již byly poškozené. Poškození mohlo vzniknout během izolace, transportu, nebo následného měření případnou nevhodnou manipulací.

Slabý signál u měření autofluorescence může být zapříčiněn nevhodně zvolenými vlnovými délkami excitace a emise, která mají maxima mírně nad nebo pod viditelným spektrem. Dále třeba úzkými pásmy detekce 15 nm oproti pásmům širokých 50 [7], ale někdy i několik stovek nm [10].

Následně se zaměříme na lepší zreprodukování výsledků již nalezených v literatuře, na jejich využití ke stanovení kvalitativních parametrů ostrůvků a na jejich použitelnost v systému založeném na průtokové cytometrii, který by měl v budoucnosti sloužit k rychlému hodnocení velkého objemu ostrůvků a jejich třídění na základě předem stanovených parametrů.

Poděkování

Autoři článku chtějí poděkovat Studentské grantové soutěži SGS20/055/OHK2/1T/12 a FGU facilitě v rámci MEYS CR (Large RI Project LM2018129 Czech-BioImaging).

Literatura

- [1] HUDÁK, Radovan a David KACHLÍK. *Memorix anatomie*. Praha: Triton, c2013. ISBN978-807-3876-746.
- [2] A. M. J. Shapiro, M. Pokrywczynska, a C. Ricordi, „Clinical pancreatic islet transplantation", *Nat Rev Endocrinol*, roč. 13, č. 5, s. 268–277, kvě. 2017, doi: [10.1038/nrendo.2016.178](https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.178).
- [3] K. B. Rodeman a B. Hatipoglu, „Beta-cell therapies for type 1 diabetes: Transplants and bionics", *CCJM*, roč. 85, č. 12, s. 931–937, pro. 2018, doi: [10.3949/ccjm.85a.17088](https://doi.org/10.3949/ccjm.85a.17088).
- [4] T. Yamamoto *et al.*, „Quality control for clinical islet transplantation: organ procurement and preservation, the islet processing facility, isolation, and potency tests", *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, roč. 16, č. 2, s. 131–136, bře. 2009, doi: [10.1007/s00534-009-0064-z](https://doi.org/10.1007/s00534-009-0064-z).
- [5] A. Steffen, B. Ludwig, C. Krautz, S. Bornstein, a M. Solimena, „Functional assessment of automatically sorted pancreatic islets using large particle flow cytometry", *Islets*, roč. 3, č. 5, s. 267–270, zář. 2011, doi: [10.4161/isl.3.5.15939](https://doi.org/10.4161/isl.3.5.15939).
- [6] J. Švihlík, J. Kybic, D. Habart, H. Hlushak, J. Dvořák, a B. Radochová, „Langerhans Islet Volume Estimation from 3D Optical Projection Tomography", in *Computer Vision – ACCV 2016 Workshops*, roč. 10117, C.-S. Chen, J. Lu, a K.-K. Ma, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2017, s. 583–594.
- [7] E. Ilegems *et al.*, „Light scattering as an intrinsic indicator for pancreatic islet cell mass and secretion", *Sci Rep*, roč. 5, č. 1, s. 10740, zář. 2015, doi: [10.1038/srep10740](https://doi.org/10.1038/srep10740).
- [8] J. Jo, M. Y. Choi, a D.-S. Koh, „Size Distribution of Mouse Langerhans Islets", *Biophysical Journal*, roč. 93, č. 8, s. 2655–2666, říj. 2007, doi: [10.1529/biophysj.107.104125](https://doi.org/10.1529/biophysj.107.104125).
- [9] A. Pisania. "Development of quantitative methods for quality assessment of islets of Langerhans", Ph.D., Massachusetts Institute of Technology. Dept. of Chemical Engineering., 2007.
- [10] B. Wu, G. Li, M. Hao, a S. Mukherjee, „Non-invasive discrimination between pancreatic islets and exocrine cells using multiphoton microscopy", San Francisco, California, United States, dub. 2015, s. 932935, doi: [10.1117/12.2083555](https://doi.org/10.1117/12.2083555).
- [11] H. Chmelova *et al.*, „Distinct Roles of β -Cell Mass and Function During Type 1 Diabetes Onset and Remission", *Diabetes*, roč. 64, č. 6, s. 2148–2160, čer. 2015, doi: [10.2337/db14-1055](https://doi.org/10.2337/db14-1055).
- [12] J. Hilderink *et al.*, „Label-Free Detection of Insulin and Glucagon within Human Islets of Langerhans Using Raman Spectroscopy", *PLoS ONE*, roč. 8, č. 10, s. e78148, říj. 2013, doi: [10.1371/journal.pone.0078148](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078148).
- [13] M. Villiger *et al.*, „In vivo imaging of murine endocrine islets of Langerhans with extended-focus optical coherence microscopy", *Diabetologia*, roč. 52, č. 8, s. 1599–1607, srp. 2009, doi: [10.1007/s00125-009-1383-y](https://doi.org/10.1007/s00125-009-1383-y).



Selected article from
Tento dokument byl publikován ve sborníku
**Nové metody a postupy v oblasti přístrojové
techniky, automatického řízení a informatiky 2020**
**New Methods and Practices in the Instrumentation,
Automatic Control and Informatics 2020**
14. 9. – 16. 9. 2020, Zámek Lobeč

ISBN 978-80-01-06776-5

Web page of the original document:
<http://iat.fs.cvut.cz/nmp/2020.pdf>

Obsah čísla/individual articles:
<http://iat.fs.cvut.cz/nmp/2020/>

Ústav přístrojové a řídicí techniky, FS ČVUT v Praze, Technická 4, Praha 6