

INSTITUTO GREGORIO MARAÑÓN  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, MADRID  
(Director: Prof. J. L. R-CANDELA)

EFFECT OF 2-DEOXYGLUCOSE ON ISLET CELL MORPHOLOGY  
AND INSULIN SECRETION

ROBERTO PARRILLA

OFELIA GARCÍA HERMIDA

JOSÉ GÓMEZ-ACEBO

HOKFELT and HULQUIST<sup>15</sup> reported the morphological alterations observed by light microscopy of A- and B-cells of rat pancreatic islets after 2-deoxyglucose (2-DG) administration. On the basis of their findings, they concluded that 2-DG may cause increased secretion of insulin and glucagon. They also suggested that the concomitant hyperglycemia observed after 2-DG administration was the effective stimulus for the B-cell and they presumed A-cell stimulation to be the result of cellular glycopenia produced by the sugar. Since then, many studies have been published on the action of 2-DG on insulin release. However, conflicting results have been obtained on the effects of 2-DG on insulin secretion (GRODSKY *et al.*<sup>10</sup>, CANDELA *et al.*<sup>2</sup>). It has also recently been reported that the administration of 2-DG *in vivo* (GALANSINO *et al.*<sup>6</sup>) or its presence in the incubation media of isolated islets of Langerhans incubated *in vitro* (VANCE *et al.*<sup>31</sup>) does not produce glucagon release, in contrast to glucagon release by *in vitro* preparations in the presence of small amounts or in the absence of glucose (VANCE *et al.*<sup>31</sup>, NONAKA and FOÀ<sup>24</sup>, GÓMEZ-ACEBO *et al.*<sup>7</sup>). From the foregoing reports, it

EFFETTI DEL 2-DESOSSIGLUCOSIO SULLA MORFOLOGIA DELLE CELLULE INSULARI E SULLA SECREZIONE INSULINICA. HOKFELT e HULQUIST<sup>15</sup> hanno descritto le alterazioni morfologiche osservate al microscopio ottico nelle cellule A e B delle isole pancreatiche di ratto, dopo somministrazione di 2-desossiglucosio (2-DG). Sulla base dei reperti ottenuti, questi AA. concludono che il 2-DG può dar luogo ad aumentata secrezione di insulina e di glucagone. Essi ritengono che l'iperglicemia riscontrabile dopo somministrazione della sostanza rappresenti un efficace stimolo per la cellula B, mentre la presunta stimolazione della cellula A sarebbe il risultato della glicopenia cellulare prodotta da questo zucchero. Da allora, numerosi studi sono stati condotti sull'azione del 2-DG sulla secrezione insulinica, con risultati contrastanti (GRODSKY e Coll.<sup>10</sup>, CANDELA e Coll.<sup>2</sup>). Recentemente, è stato anche segnalato che la somministrazione *in vivo* di 2-DG (GALANSINO e Coll.<sup>6</sup>) o la sua presenza *in vitro* nel mezzo di incubazione di isole di Langerhans isolate (VANCE e Coll.<sup>31</sup>) non provocano liberazione di glucagone, contrariamente a quanto si verifica *in vitro* per effetto di piccole quantità o in com-

*Key-words:* D-cells; 2-Deoxyglucose; Insulin secretion; Islets of Langerhans.

Data di arrivo in Redazione 8-2-1973.

Acta diabet. lat. 10, 819, 1973.

*was deemed desirable to study the effect of 2-DG administration on the fine structure of rabbit pancreatic islet cells. It was anticipated that the results of this investigation would be very helpful in interpreting the action of 2-DG administration on insulin release. In addition, the fine structure of the D-cells was studied with the object of gaining further knowledge as to their behavior following different experimental conditions.*

#### MATERIAL AND METHODS

*Rabbits of both sexes weighing between 1.5-2 kg were used. They were kept in our laboratory for at least 7 days prior to the experiment, maintained on standard diet and water ad libitum. During acute experiments no food was given. Six animals were used in each experimental group. 2-deoxyglucose (obtained from Sigma) was dissolved in saline and administered i.v. (0.5 g/kg body weight), slowly into the marginal vein of the ear. Control animals were injected with saline. The animals were anesthetized with ether; blood was drained from the portal vein and the pancreas removed. Finally they were killed by an overdose of anesthetic. One group of animals was sacrificed 45 min and the other 6 hrs after the injection.*

#### Morphological studies

*For electron microscopy, small pieces of pancreas were fixed in 3% distilled glutaraldehyde (FAHIMI and DROCHMANS<sup>3</sup>) in Millonig's buffer and postfixed for 2 hrs in 2% osmium tetroxide in the same buffer. The fixed tissue was embedded in Epon 812 (LUFT<sup>19</sup>). Sections were prepared in the routine fashion and stained with a combination of uranyl acetate and lead citrate (REYNOLDS<sup>20</sup>). Sections mounted on uncoated grids were examined with a Siemens Elmiskop I microscope.*

*For light microscopic studies, pieces of pancreas were fixed in Bouin's solution. Sections were stained with hematoxylin-eosine, aldehyde-thionine (PAGET<sup>25</sup>) and then counterstained with Gomori's one step trichrome*

*pleta assenza di glucosio (VANCE e Coll.<sup>31</sup>, NONAKA e FOÀ<sup>24</sup>, GÓMEZ-ACEBO e Coll.<sup>7</sup>). Considerati questi dati, ci è sembrato opportuno studiare gli effetti della somministrazione di 2-DG sull'ultrastruttura delle cellule insulari del pancreas di coniglio, in quanto prevedevamo che i risultati di una tale ricerca sarebbero stati assai utili ai fini dell'interpretazione dell'azione del 2-DG stesso sulla secrezione insulinica. Abbiamo inoltre studiato l'ultrastruttura delle cellule D, allo scopo di ottenere ulteriori informazioni circa il comportamento di tali elementi in differenti condizioni sperimentali.*

#### MATERIALI E METODI

Sono stati impiegati conigli di entrambi i sessi, del peso di 1,5-2 kg. Gli animali venivano mantenuti nel nostro laboratorio, per almeno 7 giorni prima dell'esperimento, ad una dieta standard ed acqua *ad libitum*. Durante gli esperimenti acuti, gli animali erano tenuti a digiuno. Ciascun gruppo sperimentale comprendeva 6 animali. Il 2-desossiglucosio (*Sigma*) veniva disciolto in soluzione fisiologica ed iniettato lentamente nella vena marginale dell'orecchio (0,5 g/kg). Ai conigli di controllo veniva somministrata i.v. soluzione fisiologica. In anestesia eterea, si procedeva al prelievo di sangue dalla vena porta e all'asportazione del pancreas. Infine, gli animali venivano uccisi per mezzo di una dose eccessiva di anestetico. I due gruppi di animali venivano sacrificati rispettivamente 45 min e 6 h dopo l'iniezione.

#### Studi morfologici

Per gli studi al microscopio elettronico, piccoli frammenti di pancreas venivano fissati in glutaraldeide distillata al 3% (FAHIMI e DROCHMANS<sup>3</sup>) in tampone di Millonig e successivamente post-fissati per 2 h in tetrossido di osmio al 2% nello stesso tampone. Il tessuto fissato veniva incluso in Epon 812 (LUFT<sup>19</sup>). Le sezioni venivano allestite nella maniera consueta e colorate con una combinazione di acetato di uranile e citrato di piombo (REYNOLDS<sup>20</sup>). Le sezioni, montate su griglie non ricoperte da membrana, venivano esaminate al microscopio elettronico Siemens Elmiskop I.

Per l'esame al microscopio ottico, frammenti di pancreas venivano fissati in soluzione di Bouin. Le sezioni, colorate con ematosilina-eosina ed aldeide-tionina (PAGET<sup>25</sup>), erano quindi sottoposte a colorazione di con-

stain (GOMORI<sup>8</sup>) and with the silver technique of HELLMAN and HELLERSTRÖM<sup>12</sup>

#### Histochemical studies

For electron microscopy 10  $\mu$  cryostat sections of glutaraldehyde fixed material were incubated at 37 °C in medium of GOMORI<sup>8</sup> for 30 min with  $\alpha$ -glycerophosphate as substrate or with sodium fluoride as inhibitor. For light microscopy 10  $\mu$  cryostat sections of formaldehyde fixed tissue were incubated in the same conditions as described above.

#### Chemical determinations

Plasma samples were centrifuged, frozen and assayed within one week for insulin, using the double antibody technique of HALES and RANDLE<sup>11</sup>. Plasma glucose was determined in all samples by the Somogyi-Nelson method<sup>23</sup> and 2-deoxyglucose by the method of WARAVDEKAR and SASLAW<sup>22</sup>.

## RESULTS

### Normal rabbit pancreatic islet cells

The cells in the normal rabbit islets of Langerhans have been described several times previously (LACY<sup>17</sup>, MEYER and BENCOSME<sup>20</sup>, PARRILLA and GÓMEZ-ACEBO<sup>26</sup>), which is why they are not going to be described in detail. The D-cells have round secretory granules which usually are less dense than the A-cell secretory granules. In our material, we have observed that these cells contain also a smaller amount of secretory granules with an electron density similar to that of the A-cell secretory granules (fig. 1).

The B-cell cytoplasm contains a few homogeneous dense bodies, surrounded by a membrane, which stain positively for acid phosphatase (LAZARUS et al.<sup>18</sup>), presumably lysosomes. Cilia have been identified in B-cells of pancreatic islets in embryonal and young mice by MUNGER<sup>22</sup> and in the islet cells of rabbit pancreas by MEYER and BENCOSME<sup>20</sup>. In our material we have also very occasionally found these organelles in the islet cells (fig. 2).

trasto con il metodo tricromico rapido di Gomori (GOMORI<sup>8</sup>) e con la tecnica dell'argento di HELLMAN e HELLERSTRÖM<sup>12</sup>.

#### Studi istochimici

Per gli studi al microscopio elettronico, sezioni dello spessore di 10  $\mu$  di materiale fissato in glutaraldeide ottenute con il criostato venivano incubate a 37 °C in soluzione di GOMORI<sup>8</sup> per 30 min, usando  $\alpha$ -glicerofosfato quale substrato o fluoruro di sodio quale inibitore. Per l'esame al microscopio ottico, sezioni dello spessore di 10  $\mu$  di materiale fissato in formaldeide ottenute con il criostato venivano incubate nelle stesse condizioni descritte sopra.

#### Determinazioni chimiche

Campioni di plasma venivano centrifugati e congelati e su di essi veniva eseguita, entro una settimana dal prelievo, la determinazione dell'insulina mediante la tecnica del doppio anticorpo di HALES e RANDLE<sup>11</sup>. In tutti i campioni, il glucosio veniva dosato con il metodo di Somogyi-Nelson<sup>23</sup> ed il 2-desossiglucosio con quello di WARAVDEKAR e SASLAW<sup>22</sup>.

## RISULTATI

### Cellule insulari normali di coniglio

Le cellule delle isole di Langerhans del coniglio normale sono state oggetto di numerose precedenti descrizioni (LACY<sup>17</sup>, MEYER e BENCOSME<sup>20</sup>, PARRILLA e GÓMEZ-ACEBO<sup>26</sup>), e per tale motivo non ne forniremo qui una illustrazione dettagliata. Le cellule D possiedono granuli di secrezione rotondi, generalmente meno densi di quelli delle cellule A. Nel nostro materiale, abbiamo osservato che queste cellule contengono anche un minor numero di granuli di secrezione aventi densità elettronica simile a quella dei granuli delle cellule A (fig. 1).

Il citoplasma delle cellule B contiene pochi corpi densi omogenei, circondati da una membrana e con reazione positiva per la fosfatasi acida (LAZARUS e COLL<sup>18</sup>); essi sono presumibilmente dei lisosomi. Presenza di ciglia è stata evidenziata da MUNGER<sup>22</sup> nelle cellule B delle isole pancreatiche di embrioni di topo e di topi giovani e da MEYER e BENCOSME<sup>20</sup> nel pancreas di coniglio. Anche noi abbiamo osservato eccezionalmente, nel nostro materiale, tali organelli (fig. 2).

Rabbit pancreatic islet cells, 45 min  
after the i.v. administration of 2-DG

*In the saline-treated control group of animals glucose was  $154 \pm 19$  mg/100 ml and insulin  $21 \pm 6$   $\mu$ U/ml. Forty five min after 2-DG administration glucose was  $444 \pm 55$  mg/100 ml, 2-DG  $44 \pm 14$  mg/100 ml and insulin  $13 \pm 5$   $\mu$ U/ml. In spite of the high glucose values the B-cells were well granulated and did not show any visible alterations in their fine structure. The only significant change found in individual cells (fig. 3) was a moderate increase in the number of dense bodies. These bodies gave a positive reaction for acid phosphatase (fig. 4).*

*There were no visible morphological changes in the A-cells. The majority of these cells were filled with granules. Only very rarely could we observe emiocytosis of a whole granule.*

*Many of the D-cells examined were partially degranulated and showed an increase in lamellar ergastoplasm and free ribosomes (figs 5 and 6). On occasion, some of the D-cell secretory granules were lying free in the extracellular spaces (fig. 7). Many of these cells showed plasma membrane microvilli projecting into the intracellular and pericapillary spaces (fig. 6). Also, these cells showed a moderate increase in the number of dense bodies.*

Rabbit pancreatic islet cells, 6 hrs  
after the i.v. administration of 2-DG

*Glucose was  $344 \pm 63$  mg/100 ml, 2-DG  $2 \pm 0.8$  mg/100 ml and insulin  $33 \pm 3$   $\mu$ U/ml. The majority of B-cells were degranulated showing an increase in the amount of lamellar ergastoplasm and free ribosomes (fig. 8). In many of them there was an increase in the plasma membrane microvilli projecting*

*Cellule insulari di coniglio, 45 min  
dopo la somministrazione i.v. di 2-DG*

Nel gruppo di animali di controllo trattati con soluzione fisiologica, la concentrazione del glucosio era di  $154 \pm 19$  mg/100 ml e quella dell'insulina di  $21 \pm 6$   $\mu$ U/ml; 45 min dopo la somministrazione di 2-DG, tali valori erano rispettivamente di  $444 \pm 55$  mg/100 ml e di  $13 \pm 5$   $\mu$ U/ml, mentre la concentrazione del 2-DG era di  $44 \pm 14$  mg/100 ml. Malgrado gli elevati livelli glicemici, le cellule B apparivano ricche di granuli e non presentavano alterazioni visibili della loro ultrastruttura. La sola modificazione significativa, osservata in singole cellule (fig. 3), era costituita da modesto aumento nel numero dei corpi densi, i quali davano reazione positiva per la fosfatasi acida (fig. 4).

A carico delle cellule A non erano osservabili evidenti modificazioni morfologiche. La maggior parte di questi elementi apparivano ripieni di granuli. Solo in rarissime occasioni abbiamo potuto osservare emiocitosi di un intero granulo.

Molte delle cellule D esaminate erano parzialmente degranulate e mostravano aumento dell'ergastoplasma lamellare e dei ribosomi liberi (figg. 5 e 6). Talora, alcuni dei granuli di secrezione si trovavano liberi negli spazi extracellulari (fig. 7). Numero di queste cellule presentavano microvilli della membrana plasmatica, sporgenti negli spazi intracellulari e pericapillari (fig. 6). Inoltre, era osservabile modesto aumento nel numero dei corpi densi.

*Cellule insulari di coniglio, 6 h  
dopo la somministrazione i.v. di 2-DG*

Le concentrazioni di glucosio, 2-DG ed insulina erano pari rispettivamente a  $344 \pm 63$  mg/100 ml,  $2 \pm 0,8$  mg/100 ml e  $33 \pm 3$   $\mu$ U/ml. La maggior parte delle cellule B apparivano degranulate e mostravano aumento dell'ergastoplasma lamellare e dei ribosomi liberi (fig. 8). In molte di esse era riscon-

into the intracellular and pericapillary spaces. Also there was an apparent increase in dense bodies (figs 9 and 10).

*The A-cells, well granulated, did not show any alterations in their fine structure.*

*Although less marked, the D-cells showed changes similar to those described 45 min after 2-DG administration.*

#### Light microscopy

*Six hrs after the administration of 2-DG some of the B-cells were observed to be moderately degranulated. Silver staining was of no help in detecting differences in D-cell granularity between controls and 2-DG-treated animals.*

## DISCUSSION

Forty five min after i.v. administration of 2-DG the B-cells did not show any alterations in their fine structure and were well granulated. These findings correlate well with the low plasma insulin values found in the portal blood at that time, but it is surprising that this occurs in the presence of high blood sugar levels, which implies that the mechanism of glucose-mediated insulin release from the B-cells is inhibited. To account for this inhibition, two main possibilities may be considered. First, an indirect effect of 2-DG on the B-cells through the catecholamine secretion it produces (HOKFELT and BYDGEMAN<sup>14</sup>), since adrenalin and noradrenalin are known to be very potent inhibitors of insulin secretion (PORTE et al.<sup>28</sup>, COORE and RANDLE<sup>4</sup>, PORTE and WILLIAMS<sup>29</sup>); and second, a direct effect of 2-DG on B-cells which blocks glucose metabolism. However, we know that 2-DG does not block insulin secretion in vitro (GRODSKY et al.<sup>10</sup>, COORE and

trabile aumento dei microvilli della membrana plasmatica, sporgenti negli spazi intracellulari e pericapillari. Vi era, inoltre, apparente aumento dei corpi densi (figg. 9 e 10).

Le cellule A, ben granulate, non presentavano alcuna modificazione della loro ultrastruttura.

Le cellule D mostravano, seppure in minor grado, modificazioni simili a quelle osservabili 45 min dopo la somministrazione del 2-DG.

#### Microscopia ottica

Dopo 6 h dalla somministrazione di 2-DG, alcune cellule B apparivano moderatamente degranulate. Con la tecnica dell'argento non era possibile mettere in evidenza differenze tra gli animali di controllo e quelli trattati con 2-DG, per quanto riguarda la granulazione delle cellule D.

## DISCUSSIONE

Dopo 45 min dalla somministrazione i.v. di 2-DG, le cellule B non presentavano alcuna modificazione della loro ultrastruttura ed apparivano ben granulate. Questi reperti concordano con i bassi livelli plasmatici di insulina riscontrabili in quel momento nella vena porta; tuttavia, è sorprendente che ciò si verificasse in presenza di valori glicemici elevati, il che implica l'inibizione del meccanismo della liberazione insulinica mediata dal glucosio nelle cellule B. Per spiegare tale inibizione possono essere considerate due principali possibilità. La prima è che il 2-DG eserciti un effetto indiretto sulle cellule B attraverso la liberazione di catecolamine cui tale sostanza dà luogo (HOKFELT e BYDGEMAN<sup>14</sup>), in quanto l'adrenalina e la noradrenalina sono notoriamente potenti inibitori della secrezione insulinica (PORTE e COLL.<sup>28</sup>, COORE e RANDLE<sup>4</sup>, PORTE e WILLIAMS<sup>29</sup>); la seconda è che il 2-DG agisca direttamente sulle cellule B, bloccando il metabolismo del glucosio.

RANDLE<sup>4</sup>); therefore the first hypothesis seems to be more plausible.

*We could not find any morphological alterations indicating a toxic effect of 2-DG on islet cells at any time after its administration. The only difference as compared to the controls was the apparent increase in the number of lysosomes which are known to be rich in phosphatases. The relationship between resistance to the toxic action of 2-DG and phosphatases has been pointed out by several authors (BARBAN<sup>1</sup>, HEREDIA and SOLS<sup>13</sup>). In our case, we consider the lysosome increase in the B-cells likely to be a non specific defensive reaction of the cells against a foreign substance.*

*The degranulation observed in B-cells 6 hrs after 2-DG administration is in accordance with previous results (PARRILLA et al.<sup>27</sup>) showing a late rise in insulin levels after 2-DG administration and with the plasma insulin levels which were found to be above basal values. Apparently the blocking effect of 2-DG on insulin secretion whatever it is mediated by, has been overcome at that time.*

*The A-cells did not show any morphological alterations after 2-DG administration. This could be interpreted in the same sense that 2-DG is not capable of producing intracellular glycolipemia in A-cells or that a mechanism other than glycolipemia is involved in triggering the release of its secretory products by the A-cell.*

*The fact that microvilli are increased on the D-cell plasma membrane, along with the increase of lamellar ergastoplasma and free ribosomes in these cells and their degranulation, might be interpreted in the sense that these cells are functionally active and that the in vivo*

Tuttavia, poiché è noto che il 2-DG non inibisce *in vitro* la secrezione insulinica (GRODSKY e Coll.<sup>10</sup>, COORE e RANDLE<sup>4</sup>), la prima ipotesi sembra maggiormente plausibile.

Nelle nostre ricerche, non siamo riusciti ad evidenziare alcuna modificazione morfologica indicativa di un effetto tossico del 2-DG sulle cellule insulari, e ciò in nessun momento dopo la somministrazione della sostanza. L'unica differenza rilevata tra animali trattati e controlli è stato l'apparente aumento del numero di lisosomi, che sono notoriamente ricchi di fosfatasi. Numerosi AA. (BARBAN<sup>1</sup>, HEREDIA e SOLS<sup>13</sup>) hanno sottolineato i rapporti esistenti tra resistenza all'azione tossica del 2-DG e fosfatasi. Nel nostro caso, consideriamo l'aumento dei lisosomi nelle cellule B come probabile espressione di una reazione difensiva aspecifica delle cellule stesse contro una sostanza estranea.

Il rilievo, a distanza di 6 h dalla iniezione del 2-DG, di degranulazione delle cellule B è in accordo con i risultati di precedenti ricerche (PARRILLA e Coll.<sup>27</sup>), in cui si dimostrava un aumento tardivo dei livelli insulinemici dopo la somministrazione della sostanza, nonché con il riscontro di concentrazioni plasmatiche dell'ormone superiori a quelle basali. Trascorso un tale periodo di tempo dall'iniezione, l'effetto bloccante del 2-DG sulla secrezione insulinica, da qualunque meccanismo sia esso mediato, sembrerebbe pertanto superato.

Nelle cellule A non è stata osservata, dopo somministrazione di 2-DG, alcuna alterazione morfologica; ciò potrebbe essere interpretato nel senso che il 2-DG non è in grado di provocare glicopenia intracellulare in tali elementi oppure che un meccanismo diverso dalla glicopenia è responsabile della liberazione dei loro prodotti di secrezione.

L'aumento dei microvilli sulla membrana plasmatica, dell'ergastoplasma lamellare e dei ribosomi liberi nelle cellule D, nonché la degranulazione di tali elementi, potrebbero essere interpretati quali segni di attività funzionale di queste cellule; la somministrazione *in vivo*

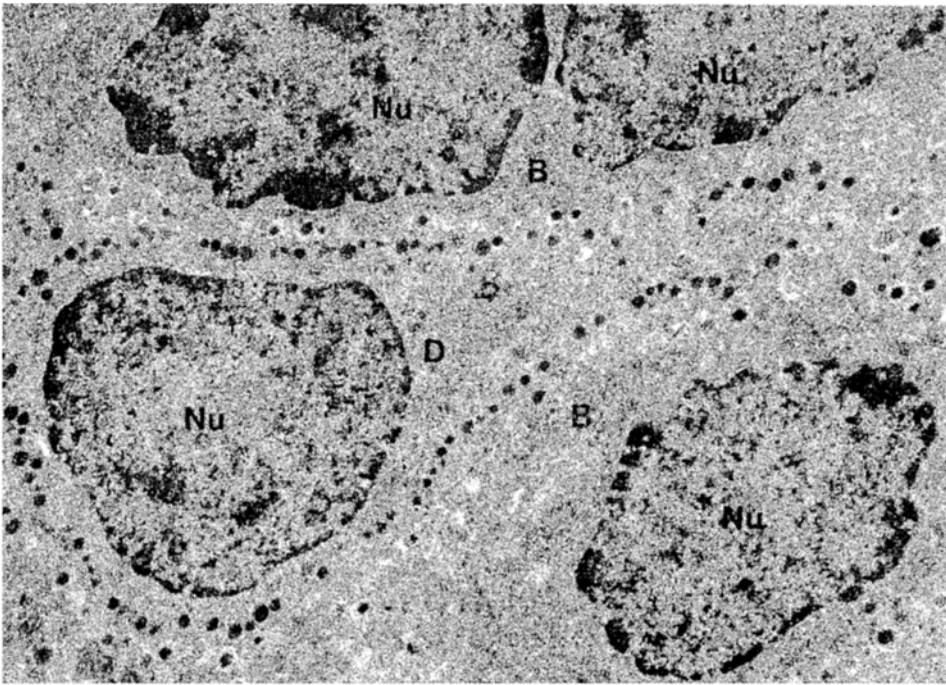


Fig. 1 - D- and B-cells of normal rabbit. Differences in secretory granule density are evident in the D-cell. D = D-cell; B = B-cell; Nu = nucleus. X 10,600.

Cellule D e B di coniglio normale. Nella cellula D si rilevano evidenti differenze nella densità dei granuli di secrezione. D = cellula D; B = cellula B; Nu = nucleo. 10.600 X.

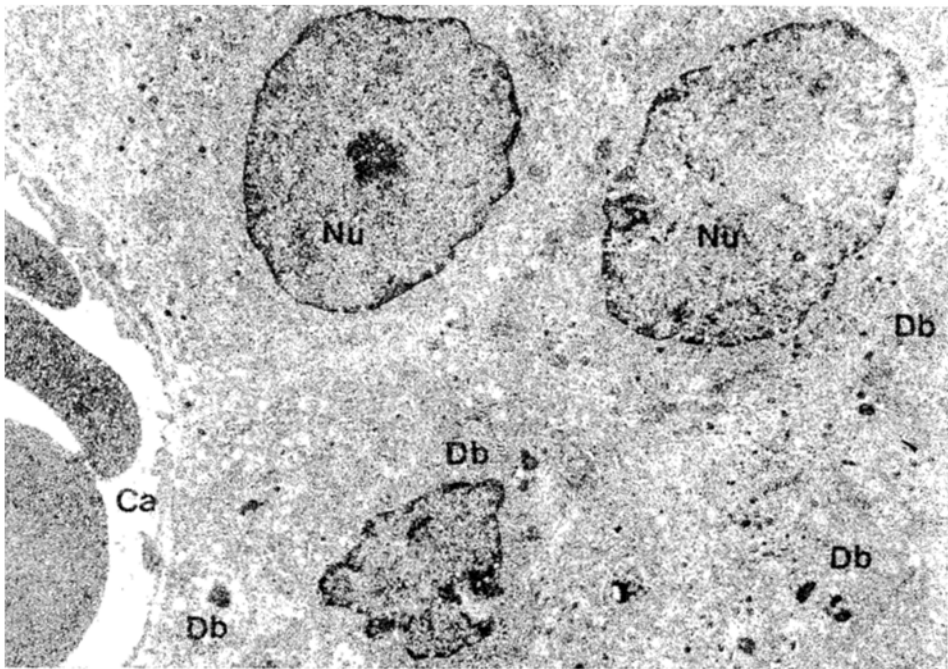
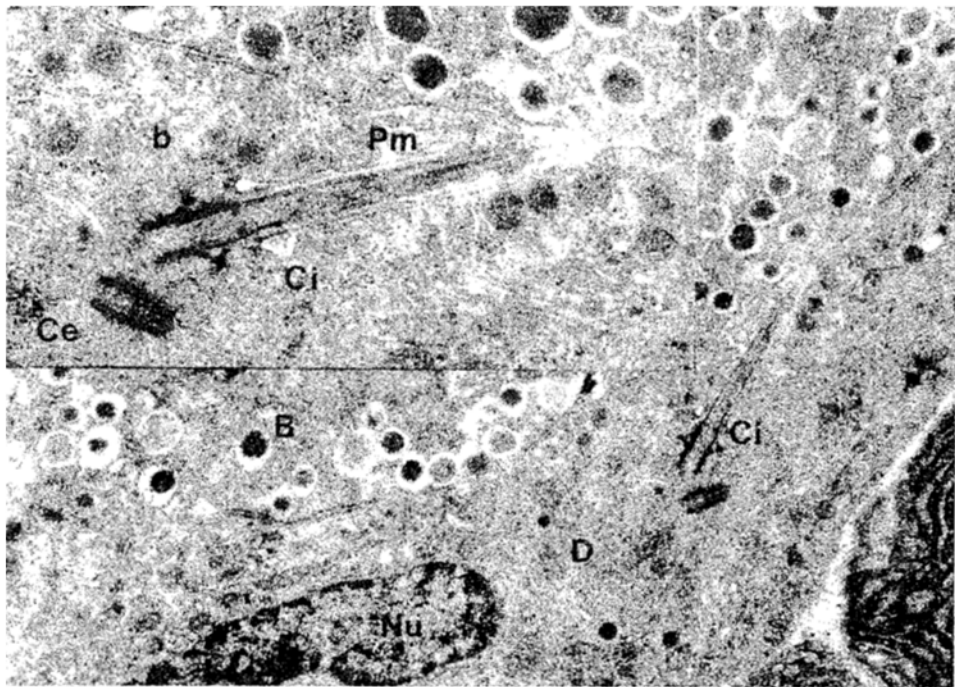
Fig. 2 - *D- and B-cells of normal rabbit. A cilium from the D-cell is also shown at higher magnification. Ci = cilium; Pm = plasma membrane; b = basal body; Ce = centriole; B = B-cell; D = D-cell; Nu = nucleus. X 16,000; X 36,000.* ▶

Cellule D e B di coniglio normale. A più forte ingrandimento si osserva un ciglio nella cellula D. Ci = ciglio; Pm = membrana plasmatica; b = corpo basale; Ce = centriolo; B = cellula B; D = cellula D; Nu = nucleo. 16.000 X; 36.000 X.

Fig. 3 - *B-cells, 45 min after 2-DG administration. The B-cells show numerous dense bodies in their cytoplasm. Db = dense bodies; Nu = nucleus; Ca = capillary. X 5,950.* ▶

Cellule B, 45 min dopo la somministrazione di 2-DG. Le cellule B contengono nel loro citoplasma numerosi corpi densi. Db = corpi densi; Nu = nucleo; Ca = capillare. 5.950 X.





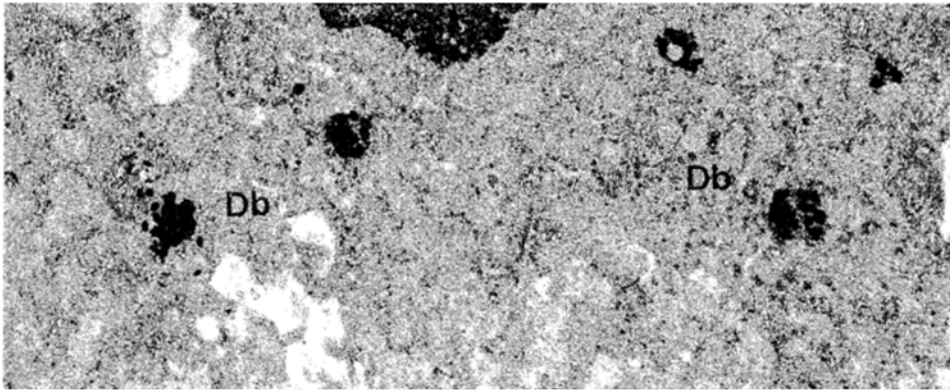


Fig. 4 - B-cell, 45 min after 2-DG administration showing positive reaction for acid phosphatase localized in the dense bodies. Db = dense bodies. X 9,300.

Cellula B, 45 min dopo la somministrazione di 2-DG, mostrante reazione positiva per la fosfatasi acida, localizzata nei corpi densi. Db = corpi densi. 9.300 X.

Fig. 5 - *D-cells*, 45 min after 2-DG administration. Nu = nucleus; Er = lamellar ergastoplasm; ▶  
Ri = ribosomes; Db = dense bodies. X 11,900.

Cellule D, 45 min dopo la somministrazione di 2-DG. Nu = nucleo; Er = ergastoplasma lamel-  
lare; Ri = ribosomi; Db = corpi densi. 11.900 X.

Fig. 6 - *D-cells*, 45 min after 2-DG administration. Nu = nucleus; Er = lamellar ergastoplasm; ▶  
Ri = ribosomes; Mv = microvilli; Ca = capillary. X 11,400.

Cellule D, 45 min dopo la somministrazione di 2-DG. Nu = nucleo; Er = ergastoplasma lamel-  
lare; Ri = ribosomi; Mv = microvilli; Ca = capillare. 11.400 X.

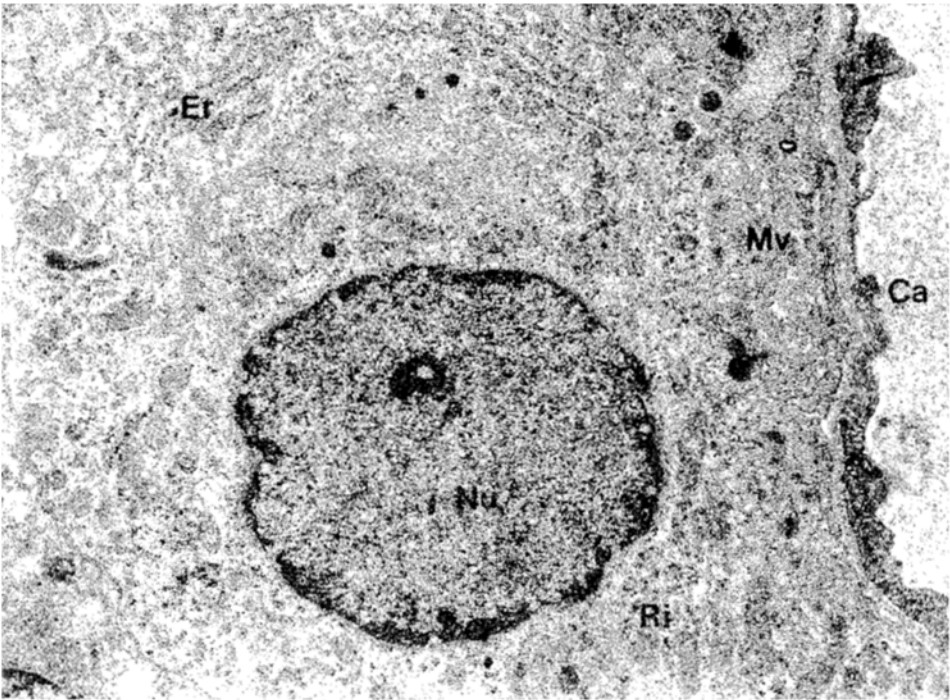
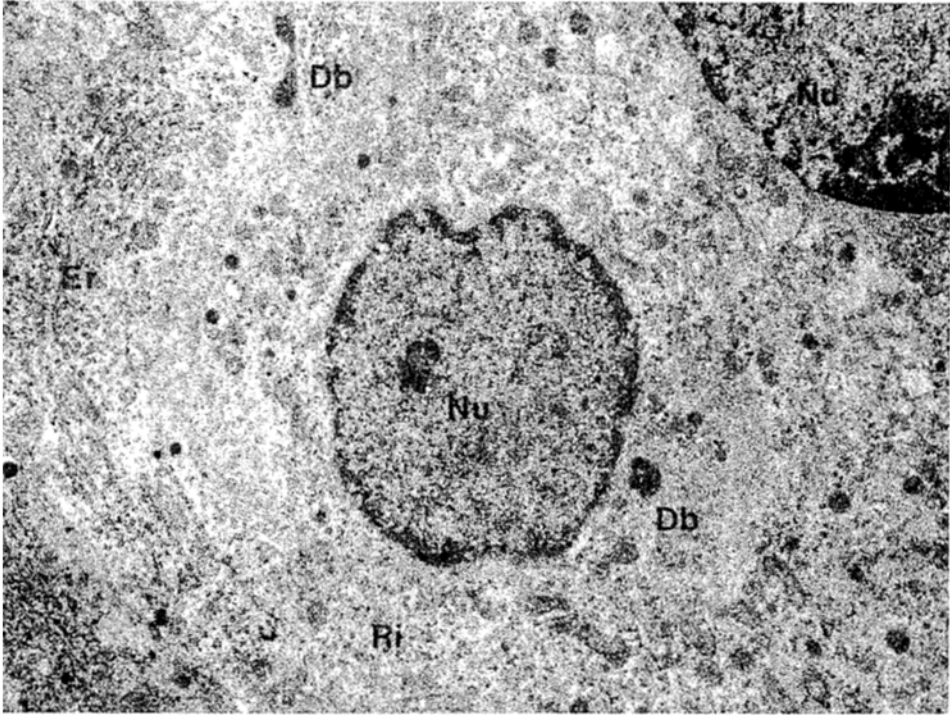


Fig. 7 - D-cells, 45 min after 2-DG administration. Ec = extracellular space; D = D-cell; ▶ arrow =  $\delta$ -secretory granule. X 19,000.

Cellule D, 45 min dopo la somministrazione di 2-DG. Ec = spazio extracellulare; D = cellula D; freccia = granulo di secrezione  $\delta$ . 19.000 X.

Fig. 8 - Degranulation of B-cells, 6 hrs after 2-DG administration. Nu = nucleus; Ri = ribosomes; Er = lamellar ergastoplasm; Db = dense bodies. X 11,400.

Degranulazione delle cellule B, 6 h dopo la somministrazione di 2-DG. Nu = nucleo; Ri = ribosomi; Er = ergastoplasma lamellare; Db = corpi densi. 11.400 X.

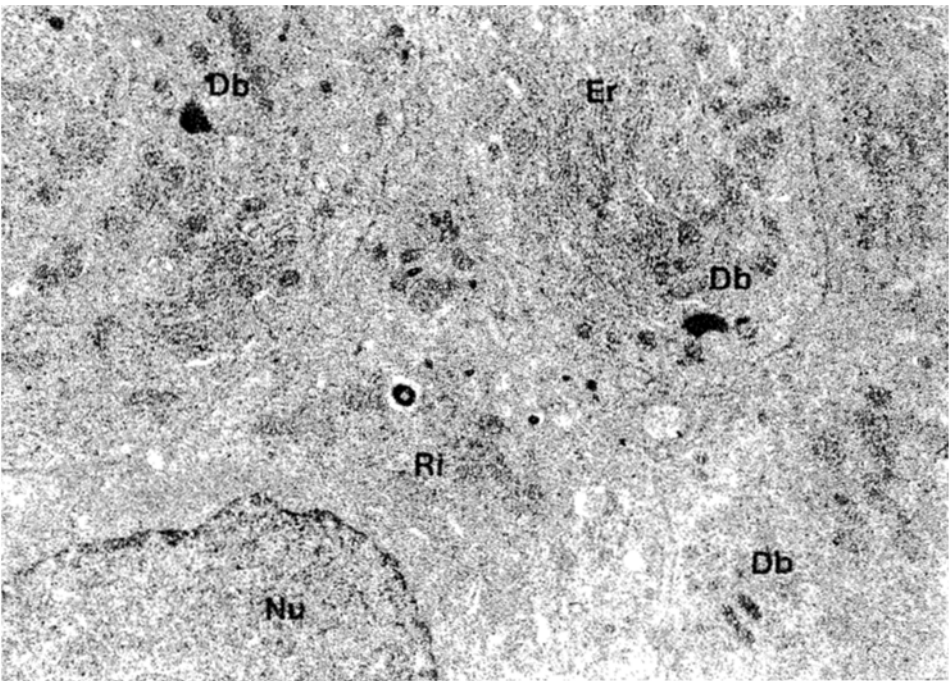
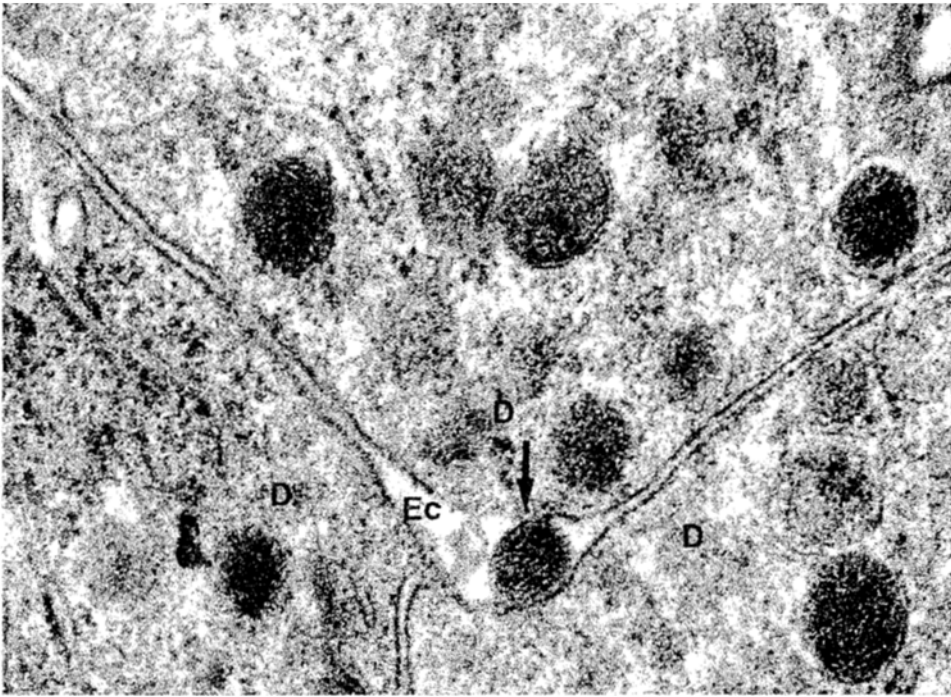
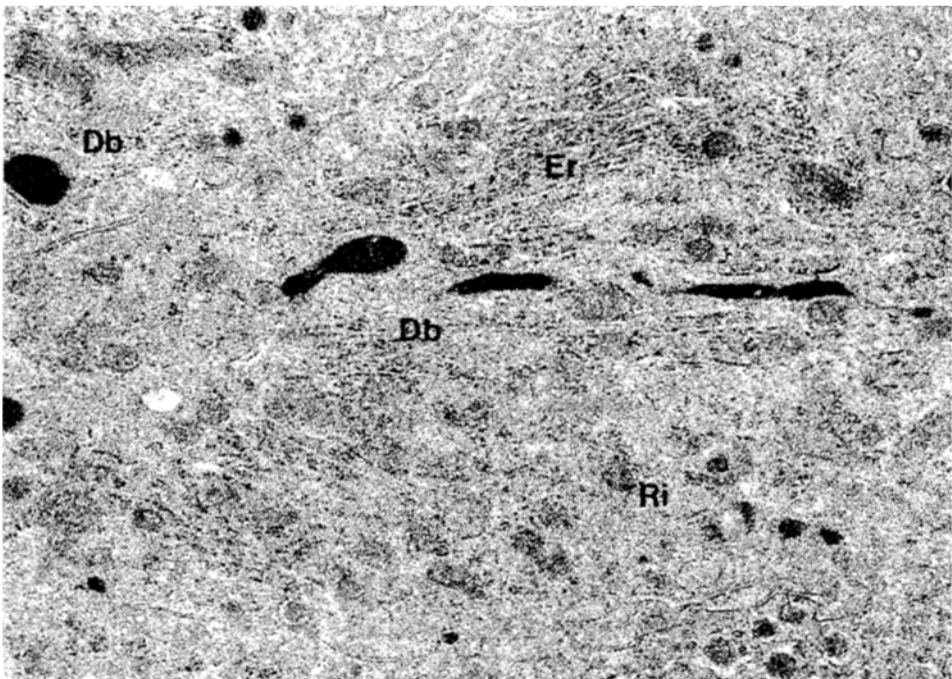
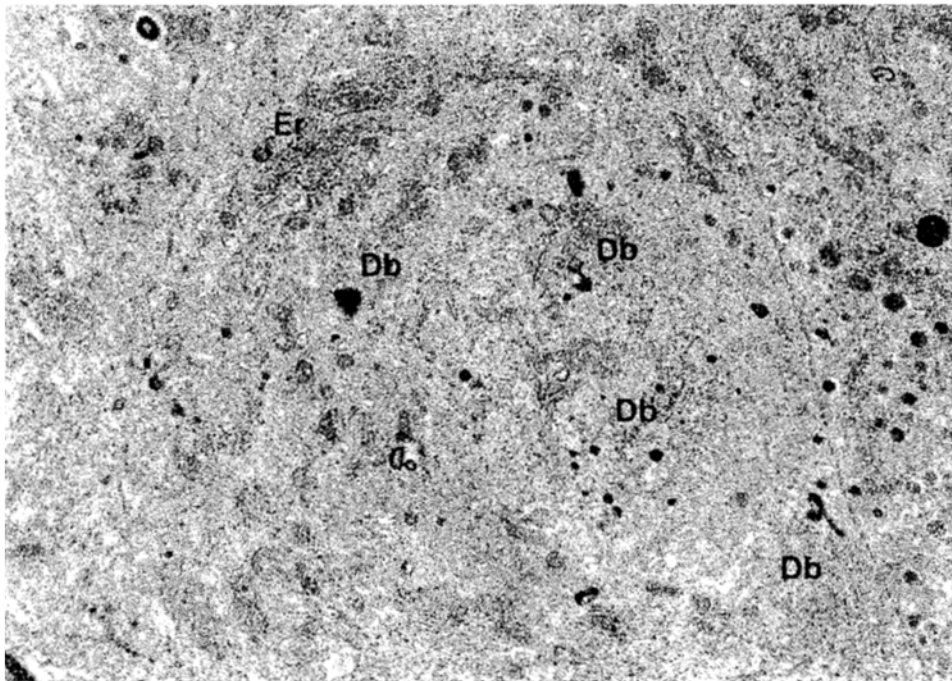


Fig. 9 - *B-cells, 6 hrs after 2-DG administration showing degranulation and increase in dense bodies. Er = lamellar ergastoplasm; Db = dense bodies. X 5,950.* ▶

Cellule B, 6 h dopo la somministrazione di 2-DG. Si osservano degranulazione ed aumento dei corpi densi. Er = ergastoplasma lamellare; Db = corpi densi. 5.950 X.

Fig. 10 - *B-cells, 6 hrs after 2-DG administration. Er = lamellar ergastoplasm; Ri = ribosomes; Db = dense bodies. X 16,200.* ▶

Cellule B, 6 h dopo la somministrazione di 2-DG. Er = ergastoplasma lamellare; Ri = ribosomi; Db = corpi densi. 16.200 X.





administration of 2-DG is capable of inducing the release of their secretory products. The mechanism involved is unknown but in any event it is interesting to recall that 2-DG induces hydrochloric acid secretion<sup>21</sup> and that D-cell tumors have been reported to contain gastrin or gastrin-like substances. The first effect then could be mediated through these substances released from cells like the D-cells of the pancreas. Another possibility which may be considered could be that this secretion is mediated through catecholamine secretion or that D-cell secretory products are substances of the amine type. In this contest it is interesting that amino substances have been reported to exist in normal islets of Langerhans<sup>3</sup>.

Emiocytosis as a mechanism of granule release from the D-cells has been previously suggested by us<sup>7</sup> and later on confirmed by KOBAYASHI and FUJITA<sup>18</sup>. In the present paper new evidence is presented supporting the role of that mechanism.

## CONCLUSIONS

2-DG, when injected into rabbits in vivo (0.5 g/kg body weight), produced intense hyperglycemia without a parallel rise in plasma insulin levels. B-cell granulation was closely correlated to plasma insulin levels. Six hrs after 2-DG was injected, when its plasma concentration was negligible and glucose values were still high, B-cells showed degranulation and plasma insulin values were above control levels. The results seem to indicate that the administration of 2-DG in the rabbit produces a temporary impairment of the glucose-mediated insulin release mechanisms. This deterioration could be very well produced by the catecholamine release triggered by the drug.

The hyperactivity of the D-cells of the islets of Langerhans induced by 2-DG

di 2-DG sarebbe in grado di indurre la liberazione dei loro prodotti di secrezione. Il meccanismo responsabile di detta azione non è noto, ma è comunque interessante ricordare che il 2-DG provoca secrezione di acido cloridrico<sup>21</sup> e che nei tumori D-cellulari è stata riscontrata presenza di gastrina o di sostanze gastrino-simili. Il primo effetto potrebbe essere quindi mediato da queste sostanze liberate da cellule simili alle cellule D del pancreas. Un'altra possibilità da prendere in considerazione è che questa attività secretoria sia mediata attraverso la liberazione di catecolamine o che i prodotti di secrezione delle cellule D siano sostanze di tipo aminico. In questo contesto, appare interessante la segnalazione della presenza di sostanze amminiche in isole di Langerhans normali<sup>3</sup>.

L'ipotesi dell'emiocitosi quale meccanismo di liberazione dei granuli dalle cellule D è stata da noi formulata in precedenza<sup>7</sup> e successivamente confermata da KOBAYASHI e FUJITA<sup>18</sup>. Nel presente lavoro abbiamo fornito nuove prove in favore del ruolo di questo meccanismo.

## CONCLUSIONI

L'iniezione *in vivo* nel coniglio di 2-DG (0,5 g/kg) determina marcata iperglicemia, non accompagnata da parallelo aumento dei livelli plasmatici di insulina. La granulazione delle cellule B appare strettamente correlata con i valori dell'insulinemia. Dopo 6 h dall'iniezione del 2-DG, allorché la concentrazione plasmatica della sostanza è trascurabile e quella del glucosio ancora elevata, le cellule B appaiono degranulate e i livelli insulinemici si dimostrano superiori a quelli presenti nei controlli. Questi risultati sembrano indicare che nel coniglio la somministrazione di 2-DG danneggia temporaneamente i meccanismi della liberazione insulinica mediata dal glucosio. Tale alterazione potrebbe essere in rapporto con la liberazione di catecolamine indotta dal farmaco.

L'iperattività delle cellule D delle isole di Langerhans indotta dal 2-DG non

*has not been observed previously. This opens new possibilities to the study of their physiological role. New evidence is presented in support of the role of emiocytosis in the excretion of D-cell secretory granules.*

era stata prima d'ora osservata; questo reperto apre nuove possibilità per quanto concerne lo studio del ruolo fisiologico di tali elementi. Sono state presentate nuove prove in favore dell'importanza dell'emiocitosi nella estrusione dei granuli di secrezione dalle cellule D.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Miss Patrocínio López, Mrs Marta Gallardo and Mr Eloy Blanco for their invaluable technical assistance. Supported in part by a grant in aid from the Juan March Foundation.

#### RIASSUNTO

Gli AA. hanno studiato gli effetti del 2-desossiglucosio (2-DG) sulla morfologia delle cellule insulari e sui livelli di insulina nel sangue portale. Le cellule B non hanno mostrato alcuna alterazione della loro ultrastruttura, se si eccettua un aumento dei corpi densi. Degranolazione è stata osservata, in alcune di queste cellule, 6 h dopo la somministrazione del 2-DG. Dopo 45 min dalla iniezione del 2-DG, i livelli insulinemici apparivano bassi, nonostante la notevole iperglicemia; dopo 6 h, essi erano lievemente superiori alla norma. Le cellule A rimanevano ben granulate per tutta la durata dell'esperimento. Le cellule D mostravano segni di attività funzionale, quali formazione di microvilli ed aumento dell'ergastoplasma lamellare e dei ribosomi liberi. Gli AA. discutono il significato di tali reperti.

#### RÉSUMÉ

On a étudié l'effet du 2-deoxyglucose (2-DG) sur la morphologie des cellules insulaires et sur le niveau de l'insuline dans le sang portal. Les cellules B n'ont présenté aucune altération de leur ultra-structure, à l'exception d'une augmentation des corps denses. Six heures après l'administration de 2-DG, une dégranulation a été observée dans quelques cellule. Quarante-cinq minutes après l'administration, la concentration de l'insuline était faible, malgré la forte hyperglycémie; après six heures elle était à peine inférieure à la normalité. Les cellules A sont restées toujours bien granulees. Les cellules B ont présenté des signes d'activité fonctionnelle, comme, par exemple, la formation de microvillosités, l'augmentation de l'ergastoplasme lamellaire et du nombre des ribosomes libres. On discute la signification de ces résultats.

#### RESUMEN

Los autores han estudiado los efectos de la 2-deoxiglucosa (2-DG) en la morfología de las células insulares y en los niveles de insulina de la sangre portal. Las células B, si se exceptúa un aumento de los cuerpos denses, no han presentado ninguna alteración en su ultraestructura. En algunas de esas células se observó degranulación a las 6 horas del suministro del 2-DG. A los 45 minutos de la inyección de 2-DG, los niveles insulinémicos aparecían bajos a pesar de la notable hiperglucemia y después de las 6 horas ya se habían elevado levemente por encima de la normalidad. Las células A seguían bien granuladas durante toda la duración del experimento. Las células D acusaron indicios de actividad funcional, tales como la formación de microvellosidades, el aumento de ergastoplasma lamellar y de los ribosomas libres. Los autores exponen el significado de sus observaciones.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Wirkung von 2-Deoxyglukose (2-DG) auf die Morphologie der Inselzellen und auf den Insulinspiegel im Pfortaderblut untersucht. Die B-Zellen zeigten keinerlei Veränderungen ihrer Feinstruktur, wenn man von einer Zunahme der dichten Körper absieht. Einige B-Zellen zeigten 6 Stunden nach Verabreichung von 2-DG Degranulationserscheinungen. Trotz ausgesprochener Hyperglykämie war der Insulinspiegel 45 min nach 2-DG-Verabreichung niedrig, nach 6 Stunden dagegen war er etwas der Norm gegenüber erhöht. Die A-Zellen blieben nach 2-DG durchwegs normal granuliert. Die D-Zellen wiesen Zeichen von Aktivität auf, nämlich Bildung von Mikrovilli, vermehrtes lamelläres Ergastoplasma und freie Ribosomen. Die Bedeutung dieser Befunde wird besprochen.

## SUMMARY

The effect of 2-deoxyglucose (2-DG) on islet cell morphology and portal vein insulin levels was studied. The B-cells did not show any alteration in their fine structure, except for an increase in dense bodies. Six hrs after 2-DG administration degranulation was observed in some of these cells. Insulin levels were low 45 min after 2-DG administration, in spite of the marked hyperglycemia, and slightly higher than normal after 6 hrs. The A-cells remained well granulated at all times after 2-DG injection. The D-cells showed signs of functional activity, such as microvilli formation, increased lamellar ergastoplasm and free ribosomes. The significance of these findings is discussed.

## REFERENCES

- 1) BARBAN S.: Studies on the Mechanism of Resistance to 2-Deoxy-D-Glucose in Mammalian Cell Cultures - *J. biol. Chem.* 237, 291, 1962.
- 2) CANDELA J. L., CASTRILLÓN A. M., MARTÍN-HERNANDEZ D., CASTILLA-CORTAZAR T.: Effect of Glucose and Citrate on Insulin Secretion in Vitro by the Pancreas Pretreated with 2-Deoxyglucose - *Med. Exp.* 11, 47, 1964.
- 3) CEGRELL L.: Monoamine-Containing Cells in the Fetal and Newborn Guinea-Pig Pancreas - *Life Sci.* 6, 1647, 1967.
- 4) COORE H. G., RANDLE P. J.: Regulation of Insulin Secretion Studied with Pieces of Rabbit Pancreas Incubated in Vitro - *Biochem. J.* 93, 66, 1964.
- 5) FAHIMI H. D., DROCHMANS P.: Essais de standardization de la fixation au glutaraldéhyde - *J. Microsc.* 4, 725, 1965.
- 6) GALANSINO G., PARNIEGGIANI A., FROMM D. G., BOGARTZ L. J., FOÀ P. P.: Studies on 2-Deoxy-D-Glucose-Induced Hyperglycemia - *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* 116, 1005, 1964.
- 7) GÓMEZ-ACEBO J., PARRILLA R., CANDELA J. L.: Fine Structure of the A- and D-Cells of the Rabbit Endocrine Pancreas in Vivo and Incubated in Vitro. I. Mechanism of Secretion of the A-Cells - *J. Cell Biol.* 36, 33, 1968.
- 8) GOMORI G.: One Rapid One-Step Trichrome Stain - *Amer. J. clin. Path.* 20, 661, 1950.
- 9) GOMORI G.: *Microscopic Histochemistry Principles and Practice* - University of Chicago Press, Chicago, 1952; p. 189.
- 10) GRODSKY G. M., BATTIS A. A., BENNETT L. L., VCELLA C., MCWILLIAMS N. B., SMITH D. F.: Effect of Carbohydrates on Secretion of Insulin from Isolated Rat Pancreas - *Amer. J. Physiol.* 205, 638, 1963.
- 11) HALES C. N., RANDLE P. J.: Immunoassay of Insulin with Insulin-Antibody Precipitate - *Biochem. J.* 88, 137, 1963.
- 12) HELLMAN B., HELLERSTRÖM C.: The Islets of Langerhans in Ducks and Chickens with Special Reference to the Argyrophil Reaction - *Z. Zellforsch.* 52, 278, 1960.
- 13) HEREDIA C. F., SOLS A.: Metabolic Studies with 2-Deoxyhexoses. II. Resistance to 2-Deoxyglucose in a Yeast Mutant - *Biochem. Biophys. Acta* 86, 224, 1964.
- 14) HOKFELT B., BYDGEMAN S.: Increased Adrenaline Production Following Administration of 2-Deoxy-D-Glucose in the Rat - *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* 106, 537, 1961.
- 15) HOKFELT B., HULQUIST C.: Stimulation of Pancreatic Islet Cells by 2-Deoxyglucose - *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* 107, 66, 1961.
- 16) KOBAYASHI S., FUJITA T.: Fine Structure of Mammalian and Avian Pancreatic Islets with Special Reference to D-Cells and Nervous Elements - *Z. Zellforsch.* 100, 340, 1969.
- 17) LACY P. E.: Electron Microscopic Identification of Different Cell Types in the Islets of Langerhans of the Guinea Pig, Rat, Rabbit and Dog - *Anat. Rec.* 128, 255, 1957.
- 18) LAZARUS S. S., VOLK B. W., BARDEN H.: Localization of Acid Phosphatase Activity and Secretion Mechanism in the Rabbit Pancreatic B-Cells - *J. Histochem. Cytochem.* 14, 233, 1966.
- 19) LUFT J.: Improvements in Epoxy Resin Embedding Methods - *J. biophys. biochem. Cytol.* 9, 409, 1961.
- 20) MEYER J., BENCOSME S. A.: The Fine Structure of Normal Rabbit Pancreatic Islet Cells - *Rev. canad. Biol.* 24, 179, 1965.
- 21) MIRSCHOWITZ B. I., SACHS G.: Vagal Gastric Secretory Stimulation by 2-Deoxyglucose - *Amer. J. Physiol.* 209, 452, 1965.
- 22) MUNGER B. L.: A Light and Electron Microscopic Study of the Cellular Differentiation in the Pancreatic Islets of the Mouse - *Amer. J. Anat.* 103, 275, 1958.
- 23) NELSON N.: A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose - *J. biol. Chem.* 153, 375, 1944.

EFFECT OF 2-DEOXYGLUCOSE ON ISLET CELL MORPHOLOGY AND INSULIN SECRETION

- 24) NONAKA K., FOÀ P. P.: A Simplified Glucagon Immunoassay and its Use in the Study of Incubated Pancreatic Islets - Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 130, 330, 1969.
- 25) PAGET G. E.: Aldehyde-Thionin: a Staining Having Similar Properties to Aldehyde-Fuchsin - Stain Technol. 34, 223, 1959.
- 26) PARRILLA R., GÓMEZ-ACEBO J.: Effect of 2-Deoxyglucose on Insulin Secretion in the Rabbit - Hormones 1973. (In press).
- 27) PARRILLA R., GÓMEZ-ACEBO J., CANDELA J. L.: Ultrastructural Evidence for the Presence of Enterochromaffin Type II Cells in the Pancreatic Islets of the Rabbit - J. Ultrastruct. Res. 26, 1, 1967.
- 28) PORTE D. Jr., GRABER A., KUZUYA T., WILLIAMS R. H.: Epinephrine Inhibition of Insulin Release - J. clin. Invest. 44, 1087, 1966.
- 29) PORTE D. Jr., WILLIAMS R. H.: Inhibition of Insulin Release by Norepinephrine in Man - Science 152, 1248, 1966.
- 30) REYNOLDS E. S.: The Use of Lead Citrate at High pH as an Electron Opaque Stain in Electron Microscopy - J. Cell Biol. 17, 208, 1963.
- 31) VANCE J. E., BUCHANAN K. D., CHALLONER D. R., WILLIAMS R. H.: Effect of Glucose Concentration on Insulin and Glucagon Release from Isolated Islets of Langerhans of the Rat - Diabetes 17, 187, 1968.
- 32) WARAVDEKAR V. S., SASLAW L. D.: A Sensitive Colorimetric Method for the Estimation of 2-Deoxy sugars with the Use of the Malonaldehyde-Thiobarbituric Acid Reaction - J. biol. Chem. 234, 1945, 1959.

*Requests for reprints should be addressed to:*

ROBERTO PARRILLA  
*Laboratorio de Morfología  
Instituto G. Marañón  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Velázquez 144, Madrid 6 - Spain*

Traduzione a cura di G.U.