

تمایز بن‌یاخته‌های جنینی انسان به سلولهای مولد انسولین

دکتر حسین بهاروند*، هانیه جعفری^۱، محمد معصومی^۲، سپیده ملامحمدی^۳

چکیده

مقدمه: دیابت نوع I، بیماری خود ایمنی می باشد که در نتیجه تخریب سلولهای بتای مولد انسولین ایجاد می شود. از جمله روش های بالقوه درمانی جدید برای درمان این بیماری استفاده از بن‌یاخته های جنینی انسانی و تمایز آنها به سمت سلولهای مولد انسولین است. **روش بررسی:** در این مطالعه از بن‌یاخته‌های جنین انسانی (رویان HI) استفاده شد. با استفاده از روش تمایز مستقیم بن‌یاخته‌های جنینی بعد از تشکیل اجسام شبه جنینی به سمت سلولهای مولد انسولین متمایز شدند. به دنبال آن با استفاده از محیط کشت انتخابی، سلولهای بیان کننده نستین انتخاب شدند. در مرحله نهایی نیز ابتدا با استفاده از فاکتور رشد فیبروبلاستی (bFGF) سلولهای مذکور تکثیر و بعد با افزودن نیکوتین آمید القای تمایز به سوی سلولهای مولد انسولین انجام شد. سلولهای حاصل مورد ارزیابی ایمونوسیتوشیمی، RT-PCR، سنجش میزان ترشح انسولین با استفاده از رادیوایمونواسی و میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) قرار گرفتند، در مرحله انتهایی سلولهای تمایز یافته نهایی به منظور ارزیابی پیوند زیر پوست موش تزریق گردید.

نتایج: ارزیابی ایمونوسیتوشیمی سلولهای تمایز یافته وجود سلولهای بیان کننده انسولین، گلوکاگون، سوماتوستاتین و پلی پتید پانکراسی را نشان داد. در ضمن RT-PCR سلولها، تجلی ژنهای بخش اندوکرینی پانکراس را در مرحله نهایی تمایز مشخص نمود. با افزودن گلوکز به محیط کشت، انسولین از سلولهای تمایز یافته رها شد. البته با افزایش غلظت گلوکز، میزان رهائش انسولین بیشتر نشد. سلولها در ناحیه تزریق رگهای خونی تشکیل دادند در مقطع بافت انسولین مثبت مشاهده شد فراساختار سلولهای متمایز شده اند دستگاه گلژی، در شبکه آندوپلاسمی دانه دار و گرانولهای متعدد را نشان داد ولی ظاهر گرانولها مشابه گرانولهای سلولهای بتا نبود. **نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که امکان تمایز بن‌یاخته‌های جنینی انسانی به سلولهای مولد انسولین وجود دارد ولی به مطالعات بیشتری برای تولید سلولی بتای حقیقی نیاز است.

واژه‌های کلیدی: بن‌یاخته‌های جنین انسانی، سلولهای مولد انسولین، تمایز، دیابت

مقدمه

در خون قادر به تنظیم قند خون نمی‌باشد. روش دیگر برای درمان این بیماری پیوند می‌باشد، اما پیوند پانکراس نیز مشکلات دیگری دارد از آن جمله محدودیت تعداد افرادی می‌باشد که قادر به دادن سلولهای بتای پانکراسی می‌باشد، نیز رد پیوند توسط گیرنده پیوند مشکل دیگر این روش است^(۱). محققین به دنبال روش های دیگری برای درمان دیابت نوع I، به توانایی سلولهای بنیادی برای تمایزشان به سلولهای مولد انسولین

دیابت نوع I (غیر وابسته به انسولین) بیماری خود ایمنی است که در نتیجه تخریب سلول های بتای مولد انسولین توسط سیستم ایمنی به وجود می‌آید. روش رایج برای درمان دیابت، تزریق مرتب انسولین می‌باشد اما گاهی اوقات، مقدار انسولین موجود

* ۱- استادیار گروه سلولهای بنیادی، پژوهشکده رویان - تهران

صندوق پستی ۴۶۴۴ - ۱۹۳۹۵ E.mail: Baharvand50@yahoo.com

۳ و ۲- کارشناس پژوهشکده رویان - تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۴/۴/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۴/۱۲/۱۸

ICM (Inner Cell Mass) جنینی که در مرحله بلاستوسیت می‌باشد مشتق می‌شود. این سلولها قابلیت تمایز خود به خودی را دارند. سلولهای بنیادی جنینی انسانی چشم‌انداز جدیدی را در درمان بیماریهایی مانند دیابت نوع I به وجود آورده اند.^(۷) دانشمندان سلولهای بنیادی جنینی انسانی و موشی را در محیط آزمایشگاه به طور خود به خود به سلولهای مولد انسولین تمایز دادند اما تنها درصد کمی از این سلولها به سلولهای مولد انسولین تمایز پیدا کردند^(۸،۹). در روش چند مرحله‌ای دیگری که با استفاده از یک فاکتور رونویسی سلولها انجام شد تعداد سلولهای بتای تمایز یافته از سلولهای بنیادی موشی به طور قابل توجهی افزایش پیدا کرد. این روش یک روش تمایز مستقیم است که در آن سلولهایی که ابتدا نستین را بیان می‌کنند تکثیر می‌شوند و بعد سلولهایی که Pax4 (بیان ژن Pax4 برای تکوین سلولهای مولد انسولین لازم است) مثبت می‌باشند زیاد می‌شوند. سلولهای مولد انسولین تولید شده هنوز مقدار انسولین کمی نسبت به سلولهای بتای موجود در بدن جاندار تولید می‌کنند و در عین حال این سلولها قابلیت پیوند زدن را به دلیل تشکیل تراوما ندارند^(۱۰،۱۱،۱۲).

روش انجام شده در این مطالعه، یک روش تمایز مستقیم است که در آن سلولهای بنیادی Royan H1 به سلولهای مولد انسولین تمایز پیدا می‌کنند، ابتدا پیش سازهای نستین مثبت تکثیر شده و در نهایت این سلولها به سلولهای انسولین ساز تمایز پیدا می‌کنند. بعد از آزمونهای تکمیلی ثابت شد که سلولهای حاصل قادر به ترشح انسولین می‌باشند و نیز مشخصه‌های ویژه سلولهای انسولین ساز را در سطح خود بیان می‌کنند. امید است که بتوان در آینده با استفاده از سلولهای بنیادی گام‌های مهمی در راه شناخت مسیر تکوین پانکراس و تأثیر فاکتورهای مختلف بر این مسیر و در نهایت درمان دیابت برداشت.

روش بررسی

کشت سلولهای بنیادی جنینی انسانی در این مطالعه از سلولهای بنیادی جنینی انسانی رویان (Royan H1) استفاده گردید^(۱۳). سلولهای فوق روی فیبروبلاست‌های جنینی موش

پی بردند^(۲). پانکراس دارای دو بخش آگزوکرینی و اندوکرینی است. در بخش آگزوکرینی پانکراس مجراهایی وجود دارد که در بین سلولهای آن سلولهای بنیادی قرار گرفته است این سلولها قابلیت تمایز به سلولهای بتای پانکراسی را دارند^(۳). این سلولها بعد از جداسازی از محل خود چه از پانکراس انسانی چه از پانکراس موشی^(۴) قادر می‌باشد که به سلولهای مولد انسولین تمایز پیدا کنند. از معایب این روش درمانی می‌توان به مصرف طولانی مدت داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی و تعداد کم افراد مناسب، دهنده پیوند اشاره کرد^(۴).

از جمله راهکردهای دیگر برای درمان دیابت و تولید سلولهای بتای انسولین ساز استفاده از سلولهای بنیادی سایر بافتها است. این طور به نظر می‌رسد که سلولهای بنیادی سایر بافتها مخصوص همان بافت می‌باشند و می‌توانند فقط در صورت صدمه آن بافت، جایگزین سلولهای صدمه دیده آن شوند، اما مطالعات اخیر نشان می‌دهد که این سلولهای بنیادی قابلیت تبدیل به انواع مختلف سلولهای دیگر را دارند، به طور مثال در موش و زنبوپوس سلولهای کبدی می‌تواند بیان ژنهای سلولهای بتا مانند Pdx1 را که یک فاکتور هومئوباکس است و در تکوین پانکراس نقش مهمی ایفاء می‌کند، را تحریک کند. مطالعاتی که بر روی سلولهای کبدی موش صورت گرفته است معلوم کرده که سلولهای بنیادی پیش ساز کبدی انسان قابلیت تبدیل به سلولهای مولد انسولین را دارند^(۵).

منبع دیگری که برای سلولهای مولد انسولین وجود دارد، سلولهای استروما یا مزانشیمال مغز استخوان است. پیوند این سلولها به هر یک از بافت‌هایی که منشأ آن اکتودرم، اندودرم و یا مزودرم باشد، باعث تمایز این سلولها به سلولهای بافت مورد نظر می‌گردد، این تجربه هم در موش و هم در انسان صورت گرفته است. البته این موفقیت مرهون پتانسیل این سلولها برای فیوز شدن آنها با یکدیگر باشد. در دو تحقیقی که در این زمینه صورت گرفته است سلولهای بنیادی مغز استخوان پیوند خورده به پانکراس موش توانسته به سلولهای اندوکرینی پانکراس تمایز پیدا کنند^(۶). سلولهای بنیادی دیگر سلولهای بنیادی جنینی هستند. سلولهای بنیادی جنینی سلولهای پرتوانی می‌باشند که از

قبل با پلی - لامی نین (invitrogen) $1 \mu\text{g/ml}$ و پلی - ال - اورنی تین ۱٪، 15mg/ml (Sigma) پوشیده شده، کشت داده شدند. محیط کشت مورد استفاده در این مرحله DMEM/F12 به همراه افزودنی های ذیل بود: لامی نین $1 \mu\text{g/ml}$ ، 2ng/ml (Gibco) B27، 1ng/ml (Gibco) N2، 10ng/ml (Sigma) bFGF.

در پایان این مرحله سلولهای پیش ساز بخش اندوکروینی پانکراس تکثیر می گردند و آماده اند تا وارد مرحله نهایی که تمایز آنها می باشد وارد شوند. در این مرحله محیط کشت به صورت یک روز در میان تعویض می گردد. مدت کشت ۶ روز است. N2 شامل انسولین $500 \mu\text{g/ml}$ ، ترانسفرین 10mg/ml ، پروژسترون 0.63mg/ml ، پوترسین $1/611 \text{mg/ml}$ و سلنایت $0.52 \mu\text{g/ml}$ می باشد.

در روز ۴+۱۴ محیط کشت DMEM/F12 به همراه 2B27 ، 1N2 ، نیکوتینامید 1mM (Sigma)، سرم جنین گوساله ۱۵٪ جایگزین محیط قبلی گردید و یک روز در میان محیط کشت عوض شد.

ایمونوسیتوشیمی: برای ارزیابی سلولهای تمایز یافته، در روز ۴+۲۱، سلولها با پارافرمالدهید ۴٪ تثبیت شده سپس با سرم بز ۱۰٪ به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شدند. از آنتی بادیهای مونوکلونال اولیه انسولین (۱:۱۰۰) (Sigma)، گلوکاگون (۱:۵۰۰) (Sigma)، سوماتوستاتین (۱:۱۰) (Chemicon)، پلی پپتیک پانکراسی (۱:۲۰) (Chemicon) استفاده شد. بعد از یک ساعت تیمار با آنتی بادی اولیه، سلولها دو بار با PBS شستشو شدند. برای شناسایی از آنتی بادی ثانویه (۱:۱۰۰) (Sigma, FITC-Conjugated anti mouse IgG) استفاده شد. سلولها یک ساعت با آنتی بادی ثانویه تیمار شدند. بعد از تیمار با آنتی بادی ثانویه، سلولها دو بار با PBS شسته و بعد مورد ارزیابی قرار گرفتند. آنتی بادی ثانویه ای که در طی ایمونوسیتوشیمی مورد استفاده قرار گرفت به ترتیب زیر بود:

Flourescence isothiocyanate (FITC) – conjugated anti-mouse IgG Sigma

Flourescence isothiocyanate (FITC) – conjugated anti-Rabbit IgG

که توسط میتومایسین (Sigma) به صورت غیرفعال در آورده اند و در محیط کشت Knockout D-MEM (Gibco) که شامل افزودنی های زیر بود کشت شدند:

سرم جنین گوساله ۲۰٪ (Fetal Calf Serum) ال - گلوتامین 2mM (Gibco) اسیدهای آمینه غیر ضروری ۱٪ (Gibco)، بتا - مرکاپتواتانل 0.1mM (Sigma)، پنی سیلین 10iu/ml (Gibco) استریتومایسین 100mg/ml (Gibco)، انسولین - ترانسفرین - سدیم سلنایت (Gibco).

تمایز سلولهای بنیادی جنینی: در ابتدا کلنی های سلولهای بنیادی جنینی انسان به صورت قطعات 300 تا 500 سلولی برش داده می شوند. قطعات برش خورده در قطرات آویزان که هر قطره آن 20 میکرولیتر است و محیط کشت آن همان محیط کشت سلولهای بنیادی جنینی است، کشت داده می شوند. هر قطعه در یک قطره قرار می گیرد. بعد از دو روز کشت، اجسام شبه جنینی (Embryoid body) تشکیل می شود. در اجسام شبه جنینی ژنهای سه لایه زاینده جنینی یعنی اکتودرم، اندودرم، مزودرم بیان می شود. در پایان دو روز اجسام شبه جنینی تشکیل شده به پلیت باکتریایی (Ginger) به مدت دو روز به صورت سوسپانسیون در محیط کشت مزبور کشت داده می شوند. بعد از دو روز، سی عدد جسم شبه جنینی به یک خانه از ظرف ۶ خانه (TPP) منتقل گردیدند تا اجسام جنینی به کف ظرف چسبیده و رشد کنند. محیط کشت مورد استفاده در این مرحله همان محیط کشت فوق است. انتخاب سلولهای پیش ساز انسولینی براساس روش Lumelsky^(۱۰) و همکارانش در سال ۲۰۰۱ صورت گرفت. روز بعد که اجسام شبه جنینی به کف پلیت چسبیدند محیط کشت Dulbecc's MEM/Nut MIX F12 (Gibco) با افزودنی های ذیل جایگزین محیط قبلی گردید: انسولین (Fluka) با غلظت $5 \mu\text{g/ml}$ ، فیبرونکتین $5 \mu\text{g/ml}$ (Sigma)، سدیم سلنایت 30nM (Sigma)، آپوترانسفرین $50 \mu\text{g/ml}$ (Sigma)، در این مرحله، محیط کشت هر دو روز یک بار تعویض گردید. طول مدت این مرحله ۶ روز است. در روز ۴+۸، با استفاده از تریپسین 0.05% EDTA 0.53mM (Gibco)، اجسام شبه جنینی به صورت تک سلولی درآمده و در پلیت ۲۴ خانه (TPP) که از

۰/۵ μl (سیناژن TA8110C) و در نهایت با استفاده از آب دوبار تقطیر به حجم ۲۵ μl رسانده شد. برای پی‌بردن به بیان ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق از پرایمرهای زیر استفاده گردید:

شرایط PCR به صورت: (۱) واسرشتگی اولیه: ۵ دقیقه (۹۳°C)، (۲) واسرشتگی هر سیکل: ۴۵ ثانیه، (۳) Annealing: ۴۵ ثانیه، با توجه به T_m پرایمرهای هر ژن که در بالا ذکر شده است. (۴) Extension هر سیکل: ۴۵ ثانیه (۷۲°C)، (۵) Extension زمانی: ۱۰ دقیقه (۷۲°C) انجام شد. محصولات PCR روی آگارز ۱/۵ درصد جدا شدند و با اتیدیوم بروماید قابل رؤیت گردیدند. پرایمرهای مربوط به Insulin b از لبه‌های اگزونها طراحی شده‌اند و نشان دهنده mRNA پس از splicing هستند.

پیوند سلولهای مولد انسولین به مدل حیوانی: در عمل پیوند موش نژاد Balb/c استفاده گردید. ۲۴ ساعت قبل از عمل پیوند به موش سیکلوسپورین (10mgr/kg S.C) تزریق گردید. حدوداً ۱ تا ۱۰^۶ سلول به موشها تزریق شد، ابتدا سلولهای چسبیده به کف پلیت به کمک ۳ EDTAmM که در بافر کریس - رینگر بدون Ca^{+2} حل شده بود به مدت ۵ دقیقه در ۳۷°C تیمار از کف پلیت کنده شدند. سلولها بعد از شستشو در بافر کریس - رینگر بدون Ca^{+2} به زیر پوست موش تزریق شدند. بعد از گذشت ۱۹ روز از عمل پیوند، از ناحیه پیوند خورده نمونه برداری گردید، قطعات برش خورده از نمونه برداشته شده در پارافرمالدهید ۴٪ پیکریک اسید ۰/۱۵٪ تثبیت شد و بعد مورد ارزیابی ایمونوهیستوشیمی قرار گرفت.

ارزیابی سلولهای ترشح انسولین با استفاده از تکنیک TEM: یک هفته بعد از تیمار سلولها با نیکوتین آمید و ۱۹ روز پس از پیوند این سلولها به زیر پوست موش، سلولها مورد ارزیابی باتکنیک TEM قرار گرفتند. تثبیت اولیه با گلوئارالدهید ۲٪ در بافر PBS 0.1m انجام شد، سپس سلولها دو بار بعد از آن ۳ بار با آب شسته شدند. تثبیت ثانویه بعد از تثبیت اولیه با استفاده از تتراکسید اسموم ۱٪ انجام شد سلولها بعد از تثبیت ثانویه ابتدا دو بار با بافر و بعد ۳ بار با آب شستشو شدند، بعد از مراحل تثبیت، از سلولها به کمک الکل با درجات مختلف ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۹۵ و ۱۰۰٪ آبگیری شد. سلولها بعد از آبگیری، با رزین قالب گیری و در نهایت برش گیری و رنگ آمیزی شدند.

ارزیابی ترشح انسولین: سلولها در روز ۲۲+۴ مورد ارزیابی ترشح انسولین قرار گرفتند. ابتدا سلولها دو بار با بافر کریس - رینگر که شامل:

BSA, (25mM)NaHCO₃ Buffer, 10mM (Mgcl₂), (2.5mM) Cacl₂, (5mM)Kcl, (120mM)Nacl

۰/۱٪ می‌باشد، دوبار شستشو گردید و سپس به سلولها بافر به همراه 0.1%BSA و نیفیدپین (5mM) اضافه گردید. سلولها سی دقیقه انکوبه گردیده و بعد محیط رویی جمع‌آوری گردید^(۱۰)، به سلولها دوباره بافر کریس - رینگر به همراه ۱٪ BSA اضافه شد. سلولها ۵ دقیقه انکوبه شده و محیط رویی آنها جمع‌آوری شد. در مرحله بعدی سلولها به مدت ۵ دقیقه با بافر کریس - رینگر به همراه BSA و گلوکز (۵mM) یا (۵۰mM) انکوبه شدند و ۵ دقیقه بعد محیط رویی برای ارزیابی میزان ترشح انسولین جمع‌آوری گردید. ارزیابی توسط کیت SourceINS-IRMA Kit Bio انجام شد.

RT-PCR: در ابتدا با استفاده از محلول RNX-plusTM (سیناژن)، کل موجودی RNA سلولی از بن‌یاخته‌های جنینی انسانی رویان H1 و سلولهای تمایز یافته به سلولهای مولد انسولین استخراج گردید. قبل از انجام نسخه برداری معکوس، نمونه‌های RNA استخراج شده تحت تیمار با (104132, Roch) Dnase I قرار گرفتند تا آلودگی‌های احتمالی مربوط به DNA ژنومیک از نمونه‌های RNA حذف گردد. سپس غلظت RNA استخراج شده با روش اسپکتروفوتومتری تعیین گردید.

۲ میکروگرم از RNA استخراج شده برداشته و با استفاده از پرایمر Random Hexamer و کیت

(K 1622 Fermentas) Revert AidT^{MH} Minus First Strand cDNA Synthesis

نسخه‌برداری معکوس انجام شد. سپس بر روی cDNA تولید شده PCR صورت گرفت برای این منظور مواد زیر در یک لوله PCR با یکدیگر مخلوط شدند:

MgC12 (۵۰ mM), ۲/۵ μl (۱۰×) PCR Buffer (AMS), ۲μl cDNA, (۵۰ ng/μl)

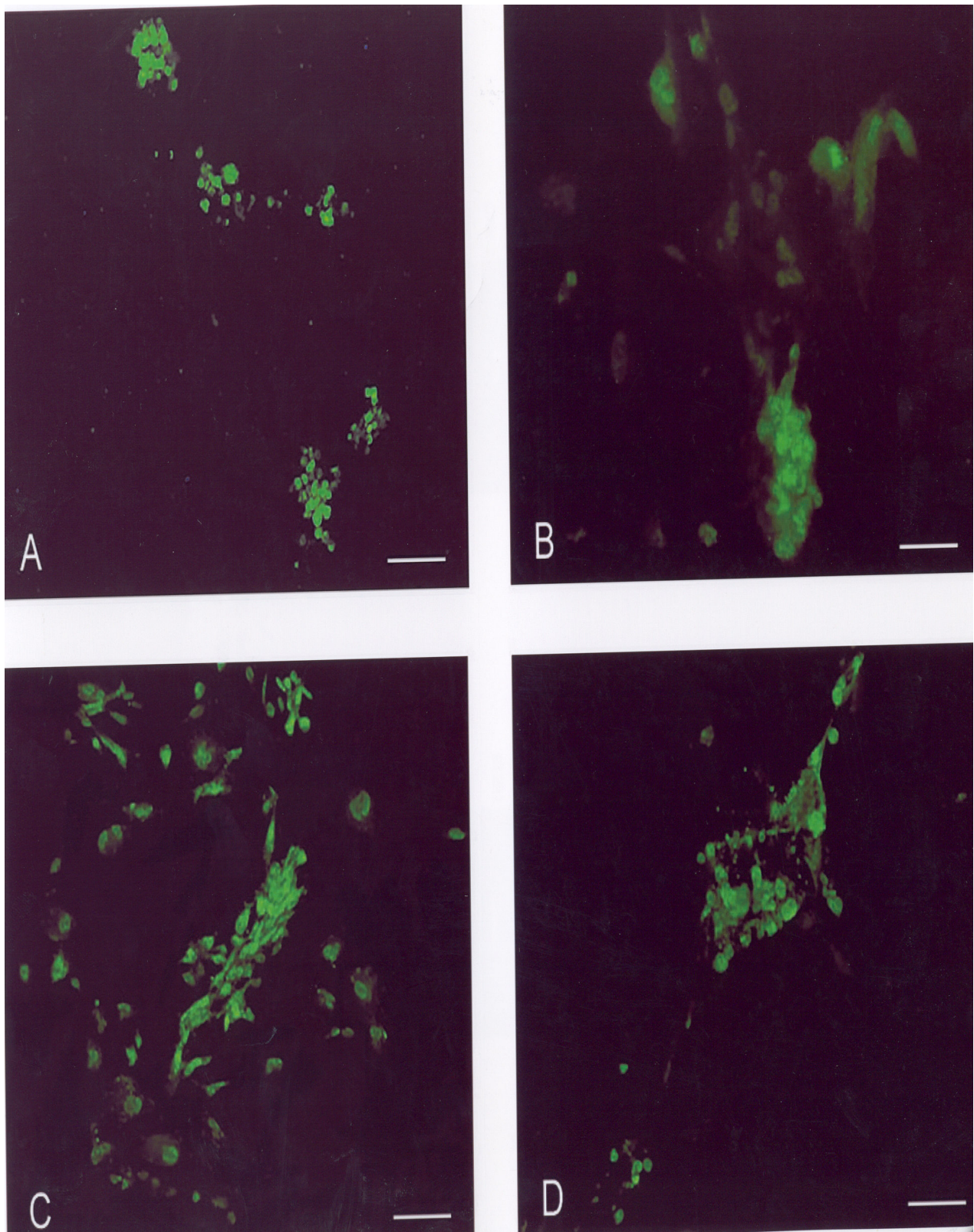
(۵unit/lμl), ۱ μl (۱۰ μM)، ۰/۵ μl dNTPmix (۱۰ mM)، ۰/۵ μl

| Name | Sequence | Size | Annealing |
|--------------|---|--------|-----------|
| Sur1 | 5'CACATCCACCACAGCACATGG3' 5'GTCTTGAAGAAGATGTATCTCCTCA3' | 420 bp | 62° |
| Insulin(a) | 5'AGCCTTTGTGAACCAACACC3' 5'GCTGGTAGAGGGAGCAGATG3' | 245 bp | 62° |
| Glut1 | 5'CCACGAGCATCTTCGAGAA3' 5'GCACATGCCCAATGAAA3' | 374 bp | 55° |
| Glut2 | 05'GGTTTGTAACTTATGCCTAAG3' 5'GCCTAGTTATGCATTGCAG3' | 213 bp | 60° |
| Somatostatin | 5'CTCCGTCAGTTTCTGCAGAAG3' 5'GGATGTGAAAGTCTTCCAGAAG3' | 312 bp | 60° |
| Pax4 | 5'GTGGGCAGTATCCTGATTCAGT3' 5'TGCACTCAGACACCTTCTGG3' | 312 bp | 60° |
| Isl1 | 5'GATTTCCCTATGTGTTGGTTGC3' 5'CTTCCACTGGGTTAGCCTGTAA3' | 827 bp | 60° |
| Nkx6.1 | 5'GTTCCCTCCTCCTCCTTTCCTC3' 5'AAGATCTGCTGTCCGAAAAAAG3' | 381 bp | 60° |
| PC1/3 | 5'TGGCTGAAAGAGAACGGGATACATCT3' 5'ACTTCTTTGGTGATTGCTTTGGCGGTG3' | 457 bp | 60° |
| PC2 | 5'GCATCAAGCACAGACCTACACTCG3' 5'GAGACACAACCACCCTTCATCCTTC3' | 309 bp | 60° |
| Kir6.2 | 5'CGCTGGTGGACCTCAAGTGGC3' 5'CCTCGGGGCTGGTGGTCTTGC3' | 497 bp | 62° |
| Glucokinase | 5'AAGAAGGTGATGAGACGGATGC3' 5'CATCTGGTGTGGTCTTCCAG3' | 230 bp | 60° |
| IAPP | 5'GAGAGAGCCACTGAATTACTTGCC3' 5'CCTGACCTTATCGTGATCTGCCTGC3' | 471 bp | 60° |
| Insulin(b) | 5'GCCTTTGTGAACCAACACCTG3' 5'GCAGTAGTTCTCCAGCTGGTA3' | 258 bp | 61° |

نتایج

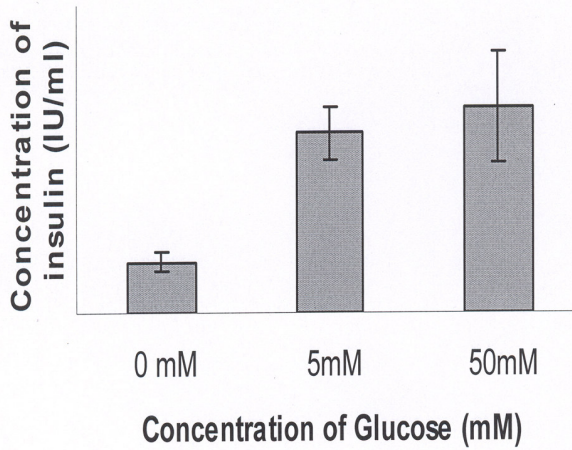
بعد از افزودن گلوکز میزان ترشح انسولین چندان فرقی با زمانی که گلوکز اضافه نمی‌شود ندارد. حتی اختلاف معنی‌داری بین میزان انسولین در غلظت‌های مختلف دیده نمی‌شود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نیز مشخص کرد که سلولهای حاصل دارای شبکه اندوپلاسمی و دستگاه گلژی پیچیده می‌باشند. دو دسته گرانول در این سلولها قابل تشخیص است، یک دسته گرانول‌های مدور می‌باشند و دسته دیگر گرانول‌های چند شکلی اند (شکل ۵) از دسته گرانول‌های مدور سه نوع قابل تشخیص می‌باشند، روشن، تیره، کمرنگ (شکل ۵C) نیز هسته این سلولها را می‌توان در شکل (۵A) ملاحظه کرد. در فاصله بین سلولها اتصالات دسموزوم و Gap Junction را می‌توان مشاهده کرد (شکل ۵B). می‌توان در (شکل ۴A) تشکیل رگهای خونی در اطراف ناحیه‌ای که سلولهای مولد انسانی به موش پیوند خورده است را ملاحظه کرد، برش‌گیری و ایمونوسیتوشیمی معلوم گردید که این سلولها قادر به ترشح انسولین، گلوکاگون می‌باشند.

با ارزیابی ایمونوسیتوشیمی معلوم گردید که با استفاده از روش فوق هر ۴ دسته سلولهای α, β, γ و pp بخش اندوکراین پانکراس تولید شده‌اند (شکل ۱).
نتایج RT-PCR معلوم کرد که سلولهای تمایز یافته حاصل قادر به بیان ژن‌های انسولین، گلوکاگون، Glut-1، Glut-2، PC1/3، PC2، سوماتوستاتین، Pax4، Isl1، NKX6.1، گلوکوکیناز، Kir6.2، IAPP، Sur1 می‌باشند (شکل ۲). انسولین و گلوکاگون از شاخص‌های سلولهای اندوکراین پانکراسی‌اند در حالی که کربوکسی پپتیداز و آمیلاز از دسته آنزیم‌های شاخص بخش اندوکراین پانکراسی‌اند. در حالی که این سلولها ژن Oct-4 را که از ژن‌های شاخص بن یاخته‌های جنینی است بیان نکردند. سلولها در روز ۲۲+۴ مورد ارزیابی ترشح انسولین قرار گرفتند. در غلظت‌های مختلف ۵ mM و ۵۰ mM گلوکز میزان ترشح انسولین سنجیده شدند مقادیر ترشح انسولین از سلولهای مولد انسولینی را در روز ۲۲+۴ می‌توانید در نمودار (۱) ملاحظه کنید.

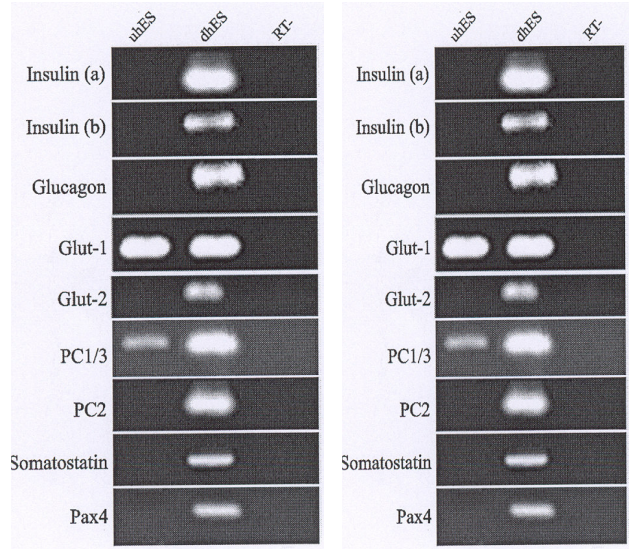


شکل ۱: تمایز سلولهای بنیادی انسانی Royan H1 به سلولهای مولد انسولین در طی یک روش چند مرحله‌ای صورت می‌گیرد. ارزیابی ایمونوسیتوشیمی این سلولها ثابت کرد که سلولهای حاصل قادر به بیان مشخصه‌های سلولهای انسولین (A) سلولهای گلوکاگون (B) سلولهای سوماتوستاتین (C) سلولهای پلی پپتید پانکراسی (D) می‌باشند.

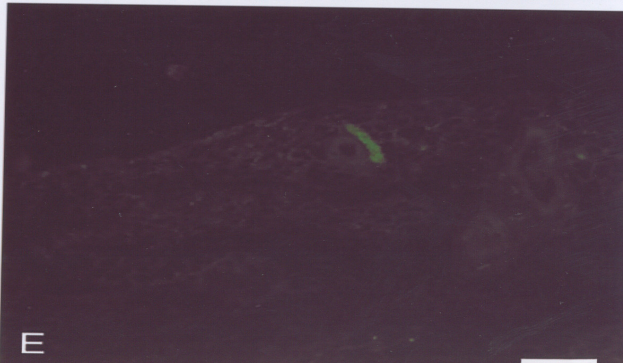
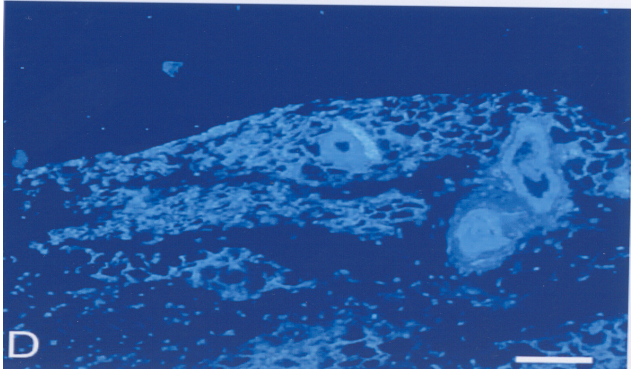
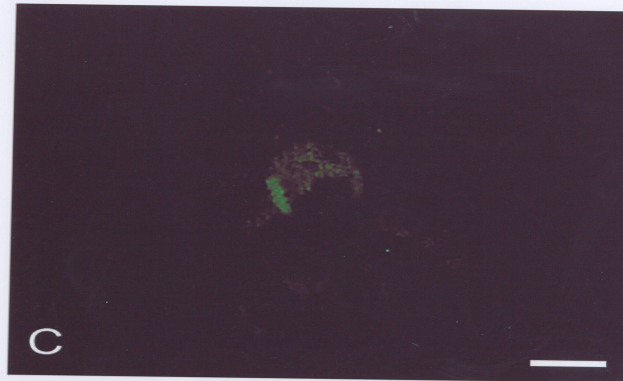
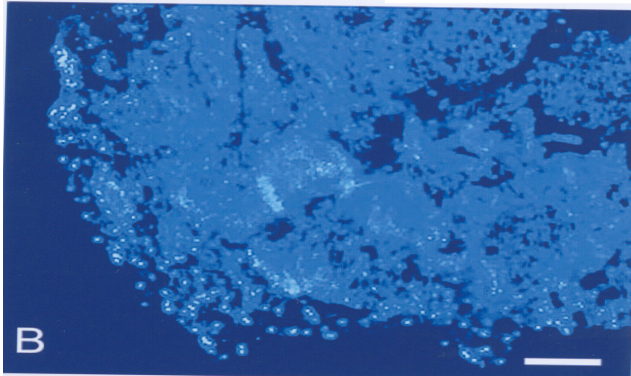
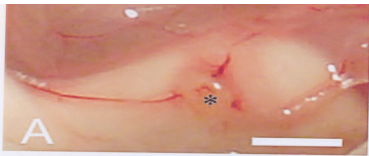
ژن β -actin، Glut 1 می باشد. استفاده از ژن β -actin در واقع یک کنترل برای انجام واکنش PCR است. Glut 1 نیز از دسته پروتئین های انتقال دهنده گلوکز است که همه سلولها قادر به بیان آن می باشند.



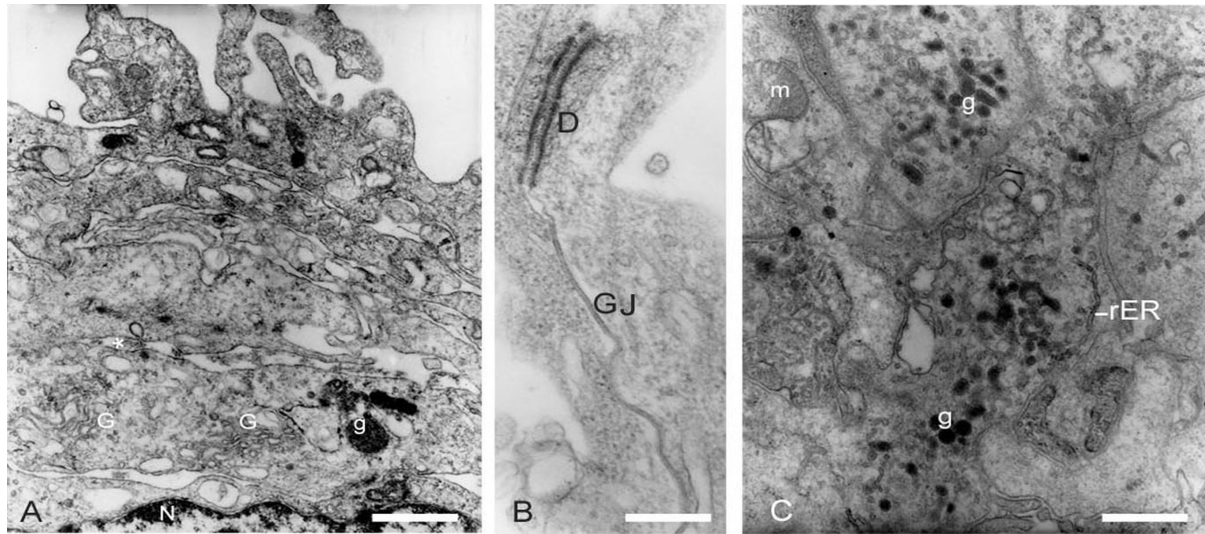
شکل ۳: سلولهای مورد ارزیابی ترشح انسولین در غلظت های مختلف گلوکز ۵۰۰، ۵۰، ۵۰۰mM قرار گرفتند که هیچ اختلاف معنی داری بین غلظت های مختلف دیده نشد.



شکل ۲: RT-PCR سلولهای تمایز یافته معلوم کرد که سلولهای حاصل قادر به بیان ژنهای خاص (Insulin, Glucagon, Glut 2, PC1/3, PC2, Somatostatin, Pax4, Isl1, NKx6.1, Glut 1, Glucokinase, IAPP, α -cardiactin, Kir 6.2, Sur 1) بخش اندوکرینی پانکراسی اند (dhES). در حالی که سلولهای بنیادی تمایز نیافته قادر به بیان این ژنها نیستند و ژن Oct-4 که از شاخص های ژنی سلولهای بنیادی است بیان می کنند. سلولهای تمایز نیافته انسانی (uHES) قادر به بیان دو



شکل ۴: سلولهای تمایز یافته مولد انسولین انسانی به موش تزریق گردید و این سلولها توسط سیستم ایمنی موش رد نشد. حضور رگهای خونی در اطراف این سلولهای تزریق شده مؤید همین مطالب است (A) سلولهای قسمت پیوند خورده مورد ارزیابی ایمونوهیستوشیمی قرار گرفتند این سلولها قادر به ترشح انسولین (C) و گلوکاگون (E) بودند. بعد از ایمونوهیستوشیمی هسته سلولها با DAPI رنگ آمیزی شدند (D,B).



شکل ۵: سلولهای مولد انسولین در روز ۲۱+۷ (A) و ۱۹ روز بعد از پیوند به موش (B) با تکنیک TEM مورد ارزیابی قرار گرفتند. در تصاویر به دست آمده می‌توان اگزوسیستور، میتو کندری (m)، شبکه اندوپلاسمی (rER)، دسموزوم (D)، گپ جکشن (G)gap junction، گرانول (g)، دستگاه گلژی (G)، هسته (N) را ملاحظه کرد.

بحث

از این مطالعه نشان داد که سلولهای بنیادی جنینی رویان H1 قابلیت زیادی برای تبدیل به سلولهای مولد انسولین دارند. تولید اجسام شبه جنینی شرایط مناسبی را می‌تواند برای تمایز بن‌یاخته‌های جنینی به سمت سلولهای اندودرمی، مزودرمی، اکتودرمی به وجود می‌آورد. در اجسام شبه جنینی بن‌یاخته‌ها در وضعیت مناسبی قرار می‌گیرند به طوری که از نظر واکنشهای سلول - سلول و تولید فاکتورهای رشد شرایط مناسبی را برای تمایز به وجود می‌آورند^(۲۱). با روش مذکور مراحل تولید سلولهای مولد انسولین از سلولهای بنیادی جنینی انسانی به ۵ مرحله قابل تقسیم است^(۱۰،۱۴). مرحله اول، تکثیر بن‌یاخته‌های جنینی با حضور سلولهای تغذیه کننده است که در محیط کشت خاص خود صورت می‌گیرد، با تشکیل اجسام شبه جنینی، بن‌یاخته‌های جنینی می‌توانند به هر یک از انواع سلولی تمایز پیدا کنند، اجسام شبه جنینی، ساختارهای پیچیده‌ای می‌باشند که متناسب با تعداد سلول تشکیل دهنده آن به سمت یک نوع خاص از سلولها پیش می‌روند، مرحله دوم، تولید اجسام شبه جنینی^(۴)، مرحله سوم، انتخاب سلولهای نستین مثبت می‌باشد که در محیط فاقد سرم سلولها کشت داده می‌شوند و تنها سلولهای نستین مثبت در محیط باقی مانده و بقیه سلولها می‌میرند^(۸). نستین یک پروتئین فیلامنت بینابینی است که به طور معمول در پیش سازهای

دیابت ملیتوس یک بیماری متابولیکی است که ۲-۵ درصد دنیا به آن مبتلا می‌باشند. تخمین زده می‌شود تا سال ۲۰۲۵، ۳۰۰ میلیون از افراد دنیا از ابتلا به این بیماری رنج ببرند. دیابت ملیتوس به دو دسته دیابت نوع I (غیر وابسته به انسولین) و نوع II (وابسته به انسولین) تقسیم بندی می‌شود. پیوند جزایر لانگرهانس پانکراس می‌تواند راه درمانی برای افراد مبتلا به دیابت باشد، اما افرادی که از پیوند این سلولها استفاده می‌کنند باید از داروهایی که سیستم ایمنی را تضعیف می‌کند استفاده نمایند که این می‌تواند مشکل بزرگی برای مبتلایان به وجود بیاورد، البته مشکل دیگری که این روش دارد تعداد کم افرادی است که مناسب برای دادن پیوند می‌باشند^(۱۸) و نیز تعداد کم جزایر قابل پیوند است، به ازای هر کیلوگرم از وزن شخص ۱۰۰۰۰ جزایر لانگرهانس برای پیوند لازم است، این در حالی است که به طور مرتب به تعداد افراد مبتلایان به دیابت اضافه می‌شود با توجه به مطالب گفته شده به نظر می‌رسد که یافتن روش های درمانی جدید لازم و ضروری است^(۱۹).

از جمله روش های دیگر درمان استفاده از سلولهای بنیادی جنینی و بزرگسال است. توانایی تبدیل سلولهای بنیادی جنینی به انواع مختلف سلولها امکان جدیدی را در روش های درمانی برخی بیماری ها برای محققین فراهم می‌سازد^(۲۰). نتایج حاصل

سلولهای عصبی یافت می‌شود. چون نستین در تعدادی از سلولهای پانکراسی نابالغ که قادر به ترشح هورمون نمی‌باشند، بیان می‌شود و بعد این سلولها قادر به ترشح انسولین و گلوکاگون می‌گردند، به همین دلیل برای تمایز بن‌یاخته‌های جنینی به سمت سلولهای مولد انسولین، روشی به کار گرفته شد که در آن تعداد سلولهای نستین مثبت افزایش پیدا می‌کند. مطالعات انجام گرفته جدید راجع به این که آیا واقعاً سلولهای نستین مثبت، سلولهای پیش‌ساز بخش اندوکراین پانکراسی‌اند یا نه با تردید برخورد می‌کنند^(۲۴). پیش‌سازهای سلولهای جزایر پانکراسی که نستین مثبت می‌باشند ممکن است در عصب‌زایی و اطراف جزایر لانگرهانس پانکراس دخالت داشته باشند^(۲۵).

مرحله چهارم، تکثیر سلولهای پیش‌ساز اندوکراین پانکراس است. در این مرحله سلولهایی که باقی مانده‌اند با استفاده از فاکتور رشد bFGF شروع به تکثیر می‌کنند، bFGF باعث بلوغ و تمایز سلولهای پیش‌ساز مولد انسولین می‌گردد^(۸) و مرحله پنجم القاء تمایز و ریخت‌زایی سلولهای مولد انسولین با استفاده از فاکتور خاص نیکوتین آمید است.

نقش فاکتورهای خارجی‌ای که در تشکیل سلولهای بخش اندوکراین پانکراس دخالت می‌کنند از اهمیت زیادی برخوردار است. از آن جمله نیکوتین آمید است^(۱۵). نیکوتین آمید بازدارنده پلی سنتاز (ریبوز - ADP) است که باعث تمایز و افزایش تعداد سلولهای بتا می‌گردد. نیکوتین آمید در بیان ژن NKx6.1 (ژن مؤثر در تمایز نهایی سلولهای مولد انسولین) نقش بسیاری دارد^(۱۶) بقای سلولهای مولد انسولین پانصد هزار برابر در حضور نیکوتین آمید زیادتر می‌شود^(۱۷).

مهمترین نقش سلولهای بتای پانکراسی ترشح انسولین در پاسخ به گلوکز است. در مطالعه صورت گرفته با استفاده از تکنیک RT-PCR نشان داده شد که سلولهای تمایز یافته نهایی قادر به بیان ژن‌های بخش اندوکراین پانکراس می‌باشند.

مجموعه عملکرد چندین ژن در تکوین پانکراس و نحوه عمل آن نقش اساسی دارند از دسته این ژنها می‌توان به Pdx1, IAPP, Ins و گلوکوکیناز Pax4, NKx6.1, Kir6.2, Sur 1, PC2, PC1/3 اشاره کرد. NKx6.1 از دسته ژنهای مخصوص

سلولهای مولد انسولین است. بیان این ژن را می‌توان در فاصله زمانی کمی بعد از تجلی ژنهای مخصوص شروع تمایز پانکراس مشاهده کرد. بیان ژن NKx6.1 در حین تکوین سیستم عصبی نیز مشاهده می‌گردد. بیان NKx6.1 در سلولهای اندودرمی تنها به سلولهای مولد انسولین محدود می‌شود. تجلی ژن NKx6.1 برای تشکیل اجتماعات سلولهای مولد انسولینی لازم و ضروری است. تجلی این ژن ابتدا در سلولهای اپی تلیالی شروع می‌گردد و در نهایت فقط به سلولهای بتا ختم می‌شود. Isl1 از اولین دسته فاکتورهای هومئودیمینی می‌باشد که نسبت به بقیه ژنهای دخیل در تکوین سلولهای بخش اندوکراین زودتر بررسی و مطالعه گردید. بیان این ژن برای بقاء سلولهای اندوکراین و تکوین بخش انکروکراین پانکراس لازم است. Isl1 از جمله ژنهای مهم دخیل در تشکیل جزایر پانکراسی است. بیان Isl1 را هم می‌توان در کشت سلولهای بخش اندوکراین و هم در کشت سلولهای عصبی در *in vitro* مشاهده کرد. Pax4 از دسته ژنهای خانواده Pax می‌باشد که فقدانش باعث کاهش شدید تعداد سلولهای بتا (سلول مولد انسولین) و دلتا (سلول مولد سوماتوستاتین) می‌گردد. در حالی که نقشی در تعداد سلولهای مولد گلوکاگون ندارد. Pax4 از دسته ژنهای مهمی است که باعث تمایز سلولهای بنیادی به سلولهای مولد انسولین می‌گردد. موش فاقد ژن Pax4 سه روز بعد از تولد می‌میرد، سطح بیان Pax4 در فرد بالغ بسیار پایین می‌آید. دو ژن PC2 و PC1/3 برای پردازش پروانسولین به انسولین بالغ لازم و ضروری می‌باشند. حضور این دو ژن و بیان آنها مشخص کننده حضور انسولین بالغ در محیط کشت می‌باشد. PC2 ابتدا بین زنجیره A و C پروانسولین و بعد بین B و C را برش می‌دهد در حالی که عمل PC1/3 عکس PC2 است. بیان دو ژن Kir6.2 و Sur1 ثابت کننده حضور کانالهای پتاسیم وابسته به ATP در غشاء سلولهای مولد انسولین است. وقتی گلوکز از سطح سلولهای بتا از طریق Glut 2 وارد سلول می‌گردد، به متابولیسم آن در سلول افزوده می‌گردد و در نتیجه سطح ATP/ADP افزایش پیدا می‌کند، با بالا رفتن میزان ATP جلوی جریان پتاسیم از طریق کانال پتاسیم Kir 6.2 گرفته می‌شود و این باعث دیپلاریزاسیون و فعال شدن کانال کلسیم نوع L و در نهایت افزایش کلسیم سیتوزولی می‌گردد. افزایش Ca سیتوزولی باعث رهاسازی

نکته را متذکر شدند. آنها از روش تمایز خود به خودی بن‌سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای مولد انسولین استفاده کردند، در دو غلظت متفاوت 5.5mM و 25mM گلوکز سلولها مورد ارزیابی ترشح انسولین قرار گرفتند. در این دو غلظت مقدار ترشح انسولین یکسان دیده شد^(۸). در کار دیگری که توسط Shiroi و همکارانش صورت گرفت، سلولهای بنیادی جنینی موشی ابتدا به صورت اجسام شبه جنینی کشت شدند و سپس به ظروف ژلاتینه منتقل شدند. بعد از کشت بیست و هشت روزه، سلولها مورد ارزیابی ترشح انسولین قرار گرفتند. در غلظتهای بالای گلوکز، هیچ افزایشی در ترشح انسولین مشاهده نشد. محیط مورد استفاده تا مرحله نهایی تمایز سلولها حاوی غلظت گلوکزی معادل 4.5mg/ml بود. دلیل دیگر این است که این سلولها ممکن است، سلولهای بتای حقیقی نباشند. انسولینی که به محیط کشت ترشح می‌شود ممکن است در نتیجه جذب انسولین از محیط کشت توسط سلول و بعد رهایی آن به محیط کشت باشد^(۲۴).

مطالعه میکروسکوپ الکترونی سلولهای به دست آمده دستگاه گلژی و شبکه آندوپلاسمی را در این سلولها نشان می‌دهد. اگرچه این سلولها براساس ارزیابی رادیوایمونواسی قادر به ترشح انسولین می‌باشند ولی فاقد گرانولهای می‌باشند که مخصوص سلولهای بتای حقیقی است. سلولهای بتای حقیقی دارای گرانولهای فراوان و متراکم در ناحیه مرکز سلول می‌باشند به طوری که ۷۰ درصد حجم سلولها را تشکیل می‌دهند، این گرانولها به چند نوع تقسیم می‌شوند. میتوکندری در سلولهای بتا بسیار فراوان و کوچک می‌باشند^(۲۸).

طراحی یک روش که بتوان فقط در طی آن سلولهای بخش اندوکرینی پانکراسی را تولید کرد و آنها را تا بلوغ نهایی پیش برد به طوری که مناسب برای درمان دیابت شود مسأله مهمی است که اگر حل شود قدم بزرگی برای درمان دیابت برداشته شده‌است، علاوه بر دیابت، بیماریهای دیگری نظیر بیماریهای عصبی (آلزایمر و پارکینسون)، آسیب‌های نخاعی و بیماریهای قلبی می‌تواند نیز از طریق سلولهای بنیادی درمان شود با تکمیل روش‌هایی که به منظور تمایز سلولهای بنیادی به سلولهای مولد انسولین است می‌توان عملاً به استفاده بالینی از این سلولها در درمان بیماریها نزدیک شد.

انسولین می‌گردد. Glut 2 (مخصوص سلولهای مولد انسولین) از دسته ژنهای مهمی است که در فعالیت سلولهای بتای پانکراس نقش مهمی دارد، نظیر ترشح انسولین وابسته به گلوکز. Glut 1 از دسته انتقال دهنده‌های دیگر گلوکز می‌باشد که در همه انواع سلولهای بنیادی جنینی انسانی یافت می‌شود، از دسته دیگر سلولهای بیان کننده Glut 1، سلولهای فیبروبلاستی می‌باشند. با استفاده از RT-PCR معلوم شد که سلولهای تمایز یافته نهایی قادر به بیان ژن Insulin می‌باشد، تفاوت Insulin a و Insulin b در طراحی پرایمرهای آن می‌باشد. طراحی پرایمر Insulin b از روی اگزونهای ۲ و ۳ ژن انسولین می‌باشد که پس از اسپلیسینگ در کنار هم قرار میگیرند. قطعه تکثیر یافته توسط پرایمرهای Insulin b شامل نواحی پپتیدی C و B پروانسولین می‌باشد. حضور باند در ناحیه مربوط به پرایمر Insulin b نشان دهنده سنتز انسولین توسط سلول است. پره پروانسولین، شامل ۱۱۰ اسید آمینه می‌باشد که توالی نشانگر آن شامل ۲۴ اسید آمینه است. بعد از تبدیل به پروانسولین دارای یک ساختار شامل ۳ منطقه پپتیدی A, B, C می‌گردد (ناحیه A: ۲۵-۵۴، ناحیه C: ۵۵-۸۹، ناحیه B: ۹۰-۱۱۰). تحقیق راجع به فاکتورهای تنظیم کننده در تکوین پانکراس هنوز در اول راه است، نتایج حاصل از مطالعات ژنی می‌تواند اطلاعات کافی و جامعی راجع به همکاری ژنها در به وجود آوردن سلولهای بخش اندوکرینی و اگزوکرینی در اختیار دانشمندان قرار دهد^(۲۳،۲۶،۲۷).

با استفاده از ایمونوسیتوشیمی معلوم شد که هر چهار دسته سلولهای بخش اندوکرینی تولید شده‌اند (pp, γ, α, β). سلولهای تمایز یافته نهایی قادر به ترشح انسولین نیز می‌باشند، اما لازم است این سلولها مقدار انسولینی معادل مقدار طبیعی آن در شرایط in vivo تولید کنند و در عین حال، ترشح آن تنظیم شده باشد. سلولهای تمایز یافته نهایی قادر به ترشح تنظیم شده نمی‌باشند. می‌توان گفت که ممکن است این وضعیت نتیجه دو عامل ذیل باشد: اول آن که چون سلولها در مرحله نهایی تمایزشان از محیط کشت حاوی غلظت گلوکز بالا استفاده شده است، بنابراین حساسیت این سلولها نسبت به مقادیر مختلف گلوکز از بین رفته‌است. غلظت گلوکز محیط کشت در مرحله نهایی 3.51 mM می‌باشد^(۸،۱۴). Assady و همکارانش در تمایز سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای مولد انسولین نیز همین

References:

1. Shapiro AM, Lakey JR, Royan EA. *Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen*. N. Engl. J. Med., 2000, 343:203-208
2. Efrat S. *Cell replacement therapy For type 1 diabetes*. Trends Molec. Med., 2002, 8:334-339.
3. Seung K Kim, Hebrok M. *Intercellular Signals regulating pancreas development and function*. Genes and Development, 2001,15:11-127.
4. Bonner- weir S, Taneja M. Weir GC. *In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2000, 6: 278-282.
5. Ramiya VK, Maraist M. Aftors KE, S chatz DA, Peck AB, Cornelivs JG. *Reversal of insulin - dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cell*. Nat Med., 2000, 6: 278-282.
6. Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA. *In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion*. J. Clin. Invest., 2003, 111: 843-856.
7. Efrat S. *Generation of insulin-Producing cells from stem cells for cell replacement therapy of type 1 diabetes*. IMAJ, 2004, 6:265-267.
8. Assady S, Maor G, Amit M, Itskonitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukermar M. *Insulin production by human embryonic Stem cells*. Diabetes, 2001, 50:1691-1697
9. Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quinto T, Reig JA, Martin F. *Insulin Secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induceddiabetic mice*. Diabetes, 2000, 49:157-162.
10. Lumelsky N, Blondel O, laeng P, Velasco I, Ravin R, Mckay R. *Differentiation of embryonic Stem cells to insulin-Secreting Structures similar to pancreaticislets*. Science, 2001, 292; 1389-1394.
11. Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, Heit JJ, Cahoy J D, Kim SK. *Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci USA., 2002, 99:16105-16110.
12. BLyszczuk P, Czyz J, Kania G. *Expression of pax4 in embryonic stem cells ptomotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2003, 100:998-1003.
13. Baharvand H, Ashtiani SK, Valojerdi MR, Shahverdi A, Tae A, Sabour D. *Establishment in vitro differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocyst*. Differentiation, 2004, 72: 224-229.
14. Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz- Eldor J. *Differentiation of human embryonic stem cell lines from the C57bL/6 and Balb/C mouse strains*. In vitro cell Dev. Biol. Anim., 2004, 40: 67-81.
15. Stoffel M, Vallier L, Pedersen R. *Navigating the pathway from embryonic stem cell to beta cells*. Seminars in cell and Developmental Biology, 2004, 15: 327-336.
16. Vaca P, Berna G, Martin F, Sonia B. *Nicotinamide induces both proliferation and differentiation of embryonic stem cell into insulin-producing cells*. Transplantation proceedings, 2003, 35: 2021-2023.
17. Leon-Quinto T, Jones J, Skoudy A, Burcin M, Soria B. *In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cell into insulin-producing cells*. Diabetologia, 2004, 47: 1442-1451.
18. Humar A, Kandaswamy R. Granger D. Gruessner R. *Decreased Surgical risks*

- of pancreas transplantation in the modern era.* Ann surg, 232, 2000, 696-703.
19. Roch E, Sepulcre M, Ensenat-waser R, Maestre I, Soria B. *Bio-engineering insulin-secreting cells from embryonic stem cell: a review of progress*, Medical and Biological Engineering and computing, 2003, 41: 384-391.
20. Czyz J, Wiese c, Rolleschek A, Blyszczok P, Cross M, Wobus A. *Potential of embryonic and adult Stem cells in vitro.* Biol. Chem. 2003, 384: 1391-1409.
21. Soria B, Skoudy A, Martin F. *From Stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus.* Diabetologia, 2001, 407-415.
22. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J. *From the cover: effects of eight growth Factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cell.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2000, 97: 11307-11312.
23. Soria B. *In-vitro differentiation of pancreatic beta-cells.* Differentiation, 2001, 68:205-219.
24. Sipione S, Eshpeter A, Lyon JG, Kor butt G, Bleackley R. *Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cell are not beta cells.* Diabetologia, 2004, 47: 499-508
25. Chun Mengshi, Tian-Min Ch. *Differentiation of dermos deriveal multipotent cells in to insulin-producing pancreatic cells in vitro.* World J. Gastroenteral, 2004, 10:2550-2552.
26. Jensen J. *Gene Reglatory factors in pancreatic development.* Developmental Dynamics, 2004, 229: 176-200.
27. Shiroy A, Yoshikawa M, Yokota H, Fukui H and Ishizaka SH. *Identification of insulin – producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating ditheone.* Stem Cells, 2002, 20: 284-292.
28. Paparo A.A, Lesson T.S, Lesson C.R. *Text/Atlas of Histology.* W.B. Saunders Company, 1988,463-473.