تمایز بنیاخته های جنینی انسان به سلولهای مولد انسولین

د کترحسین بهاروند*!، هانیه جعفری ، محمد معصومی ، سپیده ملامحمدی ،

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 بن یاخته های جنینی انسانی و تمایز آنها به سمت سلولهای مولد انسولین است. روش بررسی: در این مطالعه از بن یاخته های جنین انسانی (رویان H1) استفاده شد. با استفاده از روش تمایز مستقیمبن یاخته های 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 وپلی پپتید 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 رهایش 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 بن یاخته های جنینی انسانی به سلولهای مولد انسولین وجود دارد ولی به مطالعات بیشتری برای تولید سلولی بتای حقیقی نیاز است.

واژههای کلیدی: بن یاخته های جنین انسانی، سلولهای مولد انسولین، تمایز، دیابت

مقدمه

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 می آید. روش رایج برای درمان دیابت، تزریق مرتب انسولین می باشد اما گاهی اوقات، مقدار انسولین موجود

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

صندوق پستی ٤٦٤٤ ـ ١٩٣٩٥ - ١٩٣٩٥ @yahoo.com عوارت المالية الما

تاریخ دریافت: ۱۳۸٤/۱۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۸٤/۱۲/۱۸

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 آه به توانایی سلولهای بنیادی برای تمایزشان به سلولهای مولد انسولین

پی بردند $^{(1)}$. پانکراس دارای دو بخش اگزو کرینی و اندو کرینی و بردند $^{(1)}$. پانکراس دارای دو بخش اگزو کرینی وجود دارد که در بین سلولهای آن سلولهای بنیادی قرار گرفته است این سلولها قابلیت تمایز به سلولهای بتای پانکراسی را دارند $^{(1)}$. این سلولها بعد از جداسازی از محل خود چه از پانکراس انسانی چه از پانکراس موشی $^{(1)}$ قادر می باشد که به سلولهای مولد انسولین تمایز پیدا کنند. از معایب این روش درمانی می توان به مصرف طولانی مدت داروهای سر کوب کننده سیستم ایمنی و تعداد کم افراد مناسب، دهنده یوند اشاره کرد $^{(1)}$.

از جمله راهکردهای دیگر برای درمان دیابت و تولید سلولهای بتای انسولین ساز استفاده از سلولهای بنیادی سایر بافتها است. این طور به نظر می رسد که سلولهای بنیادی سایر بافتها مخصوص همان بافت می باشند و می توانند فقط در صورت صدمه آن بافت، جایگزین سلولهای صدمه دیده آن شوند، اما مطالعات اخیر نشان می دهد که این سلولهای بنیادی قابلیت تبدیل به انواع مختلف سلولهای دیگر را دارند، به طور مثال در موش و زنوپوس سلولهای کبدی می تواند بیان ژنهای سلولهای بتا مانند Pdx1 را که یک فاکتور هومئوباکس است و در تکوین پانکراس نقش مهمی ایفاء می کند، 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 (۱۰).

منبع دیگری که برای سلولهای مولد انسولین وجود دارد، سلولهای استروما یا مزانشیمال مغز استخوان است. پیوند این سلولها به هر یک از بافت هایی که منشأ آن اکتودرم، اندودرم و یا مزودرم باشد، باعث تمایز این سلولها به سلولهای بافت مورد نظر می گردد، 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 اندو کرینی پانکراس تمایز پیدا کنند (۶). سلولهای بنیادی دیگر سلولهای بنیادی جنینی هستند. سلولهای بنیادی جنینی سلولهای پرتوانی میباشند که از

Inner Cell Mass) ICM) جنینی که در مرحله بلاستوسیت مى باشد مشتق مى شود. اين سلولها قابليت تمايز خود به خودى 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 كمي از اين سلولها به سلولهاي مولد انسولین تمایز پیدا کردند (۸،۹۰). در روش چند مرحلهای دیگری كه با استفاده از يك فاكتور رونويسي 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 می کنند تکثیر می شوند و بعد سلولهایی که Pax4 (بیان ژن Pax4 برای تکوین سلولهای مولد انسولین لازم است) مثبت می باشند زیاد می شوند. سلولهای مولد انسولین تولید شده هنوز مقدار انسولین کمی نسبت به سلولهای بتای موجود در بدن جاندار تولید می کنند و در عين حال اين سلولها قابليت پيوند زدن را به دليل تشكيل تراتوما ندارند (۱۰٬۱۱٬۱۲)

روش انجام شده در این مطالعه، یک روش تمایز مستقیم است که در آن سلولهای بنیادی Royan H1 به سلولهای مولدانسولین تمایز پیدا می کنند، ابتدا پیش سازهای نستین مثبت تکثیر شده و در نهایت این سلولها به سلولهای انسولین سازتمایز پیدا می کنند. بعد از آزمونهای تکمیلی ثابت شد که سلولهای حاصل قادر به ترشح انسولین می باشند و نیز مشخصههای ویژه سلولهای انسولین ساز را در سطح خود بیان می کنند. امید است که بتوان در آینده با استفاده ازسلولهای بنیادی گام های 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 $(^{(17)}$). سلولهای فوق روی فیبروبلاست های جنینی موش

که توسط میتومایسین (Sigma) به صورت غیرفعال در آوردهاند 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 (Gibco) ۲mM(Gibco) اسیدهای آمینه غیرضروری ۱٪ (Gibco)، بتا ـ مرکاپتواتانل ۱۰۰mM((Gibco)، ۱۰۰mg/ml)، استرپتومایسین ۱۰۰mg/ml (Gibco)، انسولین ـ ترانسفرین ـ سدیم سلنایت (Gibco).

تمایز سلولهای بنیادی جنینی: در ابتدا کلنیهای سلولهای بنیادی جنینی انسان به صورت قطعات ۳۰۰ تا ۵۰۰ سلولی برش داده می شوند. قطعات برش خورده در قطرات آویزان که هر قطره آن ۲۰ میکرولیتر است و محیط کشت آن همان محیط کشت سلولهای بنیادی جنینیاست، کشت داده می شوند. هر قطعه در یک قطره قرار می گیرد. بعد ار 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 كنند. محيط كشت مورد استفاده در اين مرحله همان محيط كشت فوقاست. انتخاب سلولهاي پيشساز انسوليني براساس روش Lumelsky و همکارانش در سال ۲۰۰۱ صورت گرفت. روز بعد که اجسام شبه جنینی به کف پلیت چسبیدند محیط كشت (Dulbecc's MEM/Nut MIX F12(Gibco با افزودني هاي ذيل جايگزين محيط قبلي گرديد: انسولين(Fluka) با غلظت م سلنايت ۵ μg/ml(Sigma) مسديم سلنايت ۵ μg/ml ۳۰nM(Sigma) آپوترانسفرين ۵۰ (Sigma) در اين مرحله، محیط کشت هر دو روز یک بار تعویض گردید. طول مدت این مرحله ۶ روز است. در روز ۸+۴، با استفاده از ترييسين %1.05 EDTA أجسام شبه جنيني به صورت تک سلولی در آمده و در پلیت ۲۴ خانه (TPP) که از

قبل با پلی - لامینین μg/ml (invitrogen) و پلی ـ ال ـ اورنی تین ۱٪، (Δmg/ml(Sigma) پوشیده شده، کشت داده شدند. محیط کشت مورد استفاده در این مرحله DMEM/F12 به همراه افزودنی های ذیل بود: لامینین

ng/ml , $\label{eq:special} $$ \normalfoonup \normalfoonu$

در پایان این مرحله سلولهای پیش ساز بخش اندو کرینی پانکراس تکثیر می گردند و آمادهاند 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 9 روز است. N2 شامل انسولین 10 سراسفرین 10 سامل انسولین 10 سراسفرین 10 سامل انسولین 10 سراسفرین 10 و سلنایت پروژسترون 10 سراسه.

در روز ۴+۱۴ محیط کشت DMEM/F12 به همراه ۲B27٪، ۱۸۵٪ نیکو تینامید (۱۰mM(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 ایمونوسیتوشیمی: برای ارزیابی سلولهای تمایز یافته، در روز ۴+۲۱ سلولها با پارافرمالدهید ۴٪ تثبیت شده سپس با سرم بز ۱۰٪ به مدت ۳۰دقیقه تیمار شدند. از آنتیبادیهای مونو کلونال اولیه انسولین (Sigma ۱:۱۰۰)، گلو کاگون (Sigma 1:۱۰۰)، پلی پیتیک پانکراسی سوماتوستاتین (۱:۱۰) ستفاده شد. بعد از یک ساعت تیمار باآنتی بادی اولیه، سلولها دو بار با PBS شستشو شدند. برای شناسایی از آنتی بادی ثانویه (Sigma, FITC-Conjugated anti mouse IgG ۱:۱۰۰) بعد از تیمار با آنتی بادی ثانویه تیمار شدند. بعد از تیمار با آنتی بادی ثانویه تیمار شدند. بعد از تیمار با آنتی بادی ثانویه که در طی بعد مورد ارزیابی قرار گرفت به تر تیب زیر بود: ایمونوسیتوشیمی مورد استفاده قرار گرفت به تر تیب زیر بود: Flourecence isothiocyanate (FITC) — conjugated antimouse IgG Sigma

Flourecence isothiocyanate (FITC) — conjugated anti-Rabbit IgG

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

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

1/1 میباشد، دوبار شستشو گردید و سپس به سلولها بافر به همراه 0.1%BSA و نیفیدیپین (0.1%BSA اضافه گردید. سلولها سی دقیقه انکوبه گردیده و بعد محیط رویی جمع آوری گردید (1,0) به سلولها دوباره بافر کربس – رینگر به همراه 1/1 BSA اضافه شد. سلولها 1/1 دقیقه انکوبه شده و محیط رویی آنها جمع آوری شد. درمرحله بعدی سلولها به مدت 1/1 دقیقه بافر کربس – رینگر به همراه 1/1 BSA و گلو کز (1/1 AmM) یا (1/1 انکوبه شدند و 1/1 دقیقه بعد محیط رویی برای ارزیابی میزان ترشح انسولین جمع آوری گردید. ارزیابی توسط کیت ترشح انسولین جمع آوری گردید. ارزیابی توسط کیت SourceINS-IRMA Kit Bio

RNX-plusTM در ابتدا با استفاده از محلول \mathbf{RNA} در ابتدا با ستفاده از بنیاختههای جنینی (سیناژن)، کل موجودی RNA سلولی از بنیاختههای جنینی انسانی رویان $\mathbf{H1}$ 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) DNA قرار گرفتند تا آلودگیهای احتمالی مربوط به RNA ژنومیک از نمونههای RNA حذف گردد. سپس غلظت RNA استخراج شده با روش اسپکتروفو تومتری تعیین گردید.

۲ میکروگرم از RNA استخراج شده برداشته و با استفاده از یرایمر 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 (Δ· mM), Y/Δ μl(1·×) PCR Buffer (AMS), Yμl cDNA, (Δ· ng/μl)

 μ ۱۸ درصد جدا شدند و نهایت با استفاده از آب دوبار TA8110C تقطیر به حجم μ ۲۵ رسانده شد. برای پی بردن به بیان ژنهای مورد مطالعه در این تحقیق از پرایمرهای زیر استفاده گردید: شرایط PCR به صورت: ۱) واسرشتگی اولیه: ۵ دقیقه (۹۳۰۵)، شرایط PCR به صورت: ۱) واسرشتگی اولیه: ۵ دقیقه (۹۳۰۵)، ۲) واسرشتگی هر سیکل: ۴۵ ثـانیه, μ ۳ و Tanealing (۳ و با توجه به μ پرایمرهای هر ژن که در بالا ذکر شده است. ۲) Extension (۵ (۷۲۰۵)، ۵) انجام شد. محصولات PCR روی آگارز زمانی: ۱۰ دقیقه (۷۳۰۷) انجام شد. محصولات PCR روی آگارز برایمرهای مربوط به Insulin از لبههای اگزونها طراحی پرایمرهای مربوط به glicing از لبههای اگزونها طراحی شده اند و نشان دهنده mRNA پس از splicing هستند.

پیوند سلولهای مولد انسولین به مدل حیوانی : در عمل پیوند از موش نژاد Balb/c استفاده گردید. Υ ۴ ساعت قبل از عمل پیوند به موش سیکلوسپورین (10mgr/kg S.C) تزریق گردید. حدوداً Υ 1 تا Υ 1 سلول به موشها تزریق شد، ابتدا سلولهای چسبیده به کف پلیت به کمک EDTAmM که در بافر کربس – رینگر بدون Υ 4 حل شده بود به مدت ۵ دقیقه در Υ 6 تیمار از کف پلیت کنده شدند. سلولها بعد از شستشو در بافر کربس – رینگر بدون Υ 4 به زیر پوست موش تزریق شدند. بعد از گذشت Υ 9 بدون Υ 1 به زیر پوست موش تزریق شدند. بعد از گذشت Υ 9 بوز از عمل پیوند، ازناحیه پیوند خورده نمونه برداری گردید، وز از عمل پیوند، ازناحیه پیوند خورده نمونه برداری گردید، قطعات برش خورده از نمونه برداشته شده در پارافرمالدهید Υ 7 شیکریک اسید Υ 1 شنیت شد و بعد مورد ارزیابی پیکریک و سید و بعد مورد ارزیابی

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 آقرار گرفتند. تثبیت اولیه با گلوتارالدهید ۲٪ در بافر PBS 0.1m آب شسته شدند. تثبیت ثانویه بعد از تثبیت اولیه با استفاده از تبیت اولیه با استفاده از تثبیت اولیه با استفاده از تراکسید 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، و و مادین قالب گیری شد. سلولها بعد از آبگیری، با رزین قالب گیری و در نهایت برش گیری و رنگ آمیزی شدند.

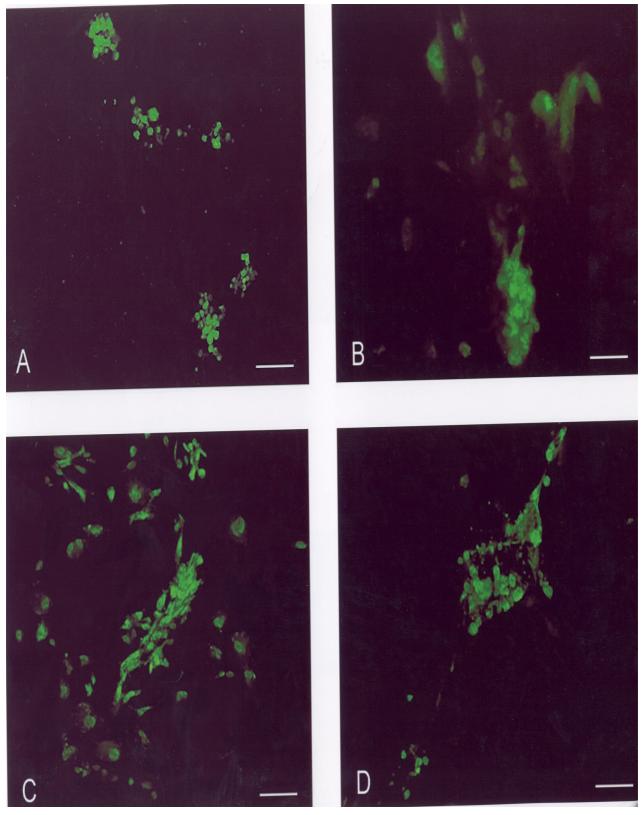
Name	Sequence	Size	Annealing
Sur1	5'CACATCCACCACAGCACATGG3'	420 bp	62°
	5'GTCTTGAAGAAGATGTATCTCCTCA3'		
Insulin(a)	5'AGCCTTTGTGAACCAACACC3'	245 bp	62°
	5'GCTGGTAGAGGGAGCAGATG3'	•	
Glut1	5'CCACGAGCATCTTCGAGAA3'	374 bp	55°
	5'GCACATGCCCACAATGAAA3'	•	
Glut2	05'GGTTTGTAACTTATGCCTAAG3'	213 bp	60°
	5'GCCTAGTTATGCATTGCAG3'	_	
Somatostatin	5'CTCCGTCAGTTTCTGCAGAAG3'	312 bp	60°
	5'GGATGTGAAAGTCTTCCAGAAG3'	•	
Pax4	5'GTGGGCAGTATCCTGATTCAGT3'	312 bp	60°
	5'TGTCACTCAGACACCTTTCTGG3'	_	
Isl1	5'GATTTCCCTATGTGTTGGTTGC3'	827 bp	60°
	5'CTTCCACTGGGTTAGCCTGTAA3'		
Nkx6.1	5'GTTCCTCCTCCTCTCTCCTC3'	381 bp	60°
	5'AAGATCTGCTGTCCGGAAAAAG3'		
PC1/3	5'TGGCTGAAAGAGAACGGGATACATCT3'	457 bp	60°
	5'ACTTCTTTGGTGATTGCTTTGGCGGTG3'	_	
PC2	5'GCATCAAGCACAGACCTACACTCG3'	309 bp	60°
	5'GAGACACCACCCTTCATCCTTC3'		
Kir6.2	5'CGCTGGTGGACCTCAAGTGGC3'	497 bp	62°
	5'CCTCGGGGCTGGTGGTCTTGCG3'	_	
Glucokinase	5'AAGAAGGTGATGAGACGGATGC3'	230 bp	60°
	5'CATCTGGTGTTTGGTCTTCACG3'	_	
IAPP	5'GAGAGAGCCACTGAATTACTTGCC3'	471 bp	60°
	5'CCTGACCTTATCGTGATCTGCCTGC3'	_	
Insulin(b)	5'GCCTTTGTGAACCAACACCTG3'	258 bp	61°
	5'GCAGTAGTTCTCCAGCTGGTA3'	-	

نتايج

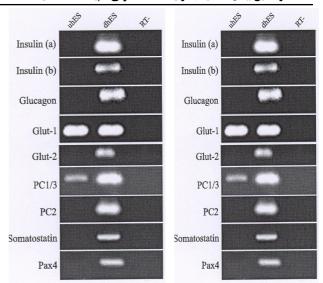
با ارزیابی ایمونوسیتوشیمی معلوم گردید که با استفاده از روش فوق هر ۴ دسته سلولهای α,β,γ و α بخش اندو کرین یانکراس تولید شدهاند (شکل ۱).

نتایج RT-PCR معلوم کرد که سلولهای تمایز یافته حاصل قادر PC1/3 ،Glut-2 ،Glut-1 ، گلوکاگون، PC1/3 ،Glut-2 ،Glut-1 ، گلوکوکیناز ، به بیان ژنهای انسولین، گلوکاگون، NKX6.1 ، Isl1 ،Pax4 ، گلوکوکیناز ، PC2 ، سوماتوستاتین، Surl ،Kir6.2 ، IAPP ، انسولین و گلوکاگون از شاخصهای سلولهای اندوکرینی پانکراسیاند در حالی که کربوکسی پپتیداز و آمیلاز از دسته آنزیم های شاخص بخش اگزورینی پانکراساند. در حالی که این سلولها ژن 4-Oct را گزورینی پانکراساند. در حالی که این سلولها ژن 4-Oct را کهاز ژنهای شاخص بن یاختههای جنینی است بیان نکردند. سلولها در روز ۲۲+۲ مورد ارزیابی ترشح انسولین قرار گرفتند. در غلظت های مختلف MM و MM ه گلوکز میزان ترشح انسولین با سلولهای مولد انسولین را در روز ۴+۲۲ می توانید در نمودار (۱) ملاحظه کنید.

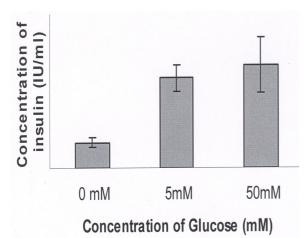
بعد از افزودن گلوکز میزان ترشح انسولین چندان فرقی با زمانی که کلوگز اضافه نمیشود ندارد. حتی اختلاف معنیداری بین میزان انسولین در غلظت های مختلف دیده نمی شود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نیز مشخص کرد که سلولهای حاصل دارای شبکه اندوپلاسمی و دستگاه گلژی پیچیده می باشند. دو دسته گرانول در این سلولها قابل تشخیص است، یک دسته گرانول های مدور میباشند و دسته دیگر گرانول های چند شکلی اند (شکل ۵) از دسته گرانول های مدور سه نوع قابل تشخیص میباشند، روشن، تیره، کمرنگ (شکل ۵C) نیز هسته این سلولها را می توان در شکل (۵A) ملاحظه کرد. در فاصله بين سلولها اتصالات دسموزوم و Gap Junction را مى توان مشاهده كرد (شكل ۵B). مى توان در (شكل ۴A) تشكيل 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 انسولين، گلوكاگون ميباشند.



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



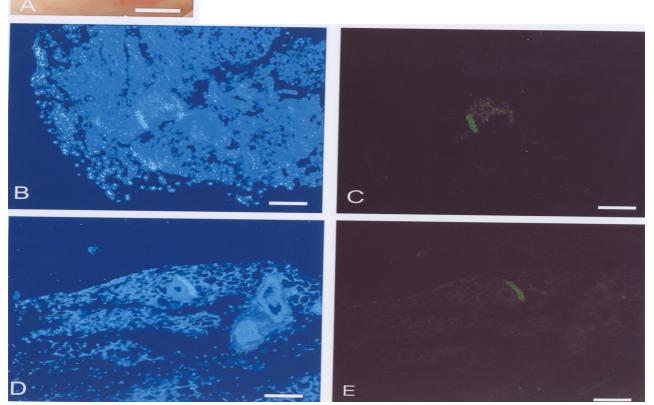
ژن Glut 1, β-actin می باشند. استفاده از ژن β-actin در واقع یک کنترل برای انجام واکنش PCR است. Glut 1 نیز از دسته پروتئین های انتقال دهنده گلوکز است که همه سلولها قادر به بیان آن می باشند.



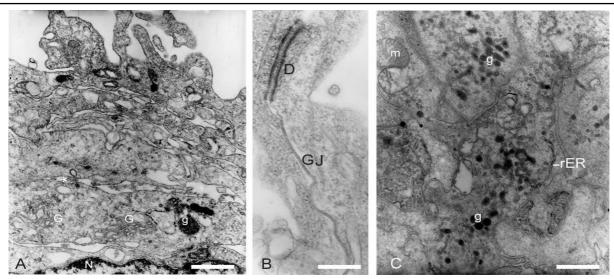
شکل ۳ سلولهای مورد ارزیابی ترشح انسولین در غلظت های مختلف گلو کز ۰٫۰،۰mM قونتد که هیچ اختلاف معنی داری بین غلظتهای مختلف دیده نشد.

شکل RT-PCR : ۲ سلولهای تمایز یافته معلوم کرد که سلولهای حاصل قادر به بیان ژنهای خــــاص

(Insulin, Glucagon, Glut 2, PC1/3, PC2, Somatostain, Pax4, Isl1, NKx6.1, Glut 1, Glucokinase, IAPP, α-cardiactin, Kir 6.2, Sur 1) بخش اندو کرینی پاتکر اسی اند (dhES)، در حالی که سلولهای بنیادی تاین ژنها نیستند و ژن 4-Cot که از شاخصهای ژنی سلولهای بنیادی است بیان می کنند. سلولهای تمایز نیافته انسانی (uhES) قادر به بیان دو



شکل £: 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 موردارزیابی ایمونوهیسیتوشیمی قرار گرفتند این سلولها قادر به ترشح انسولین (C) و گلوکاگون (E) بودند. بعد از ایمونوهیسیتوشیمی هسته سلولها با DAPI رنگ آمیزی شدند (D,B).



شکل ۵: سلولهای مولد انسولین در روز (A) ۲+۲۱ و ۱۹ روز بعد از پیوند به موش (B) با تکنیک TEM مورد ارزیابی قرار گرفتند. در تصاویر به دست آمده می توان اگزوسیتور، میتو کندری (m)، شبکه اندوپلاسمی (rER)، دسموزوم (G) (gap junction), (D)، گرانول (g)، دستگاه گلژی (G)، هسته (N) را ملاحظه کرد.

بحث

دیابت ملیتوس یک بیماری متابولیکی است که ۵-۲ درصد دنیا به آن مبتلا می باشند. تخمین زده می شود تا سال ۲۰۲۵، ۳۰۰ میلیون از افراد دنیا از ابتلا به این بیماری رنج ببرند. دیابت مليتوس به دو دسته ديابت نوعI (غير وابسته به انسولين) و نوع II (وابسته به انسولین) تقسیم بندی می شود. پیوند جزایر لانگرهانس پانکراس می تواند راه درمانی برای افراد مبتلا به دیابت باشد، اما افرادی که از پیوند این سلولها استفاده می کنند باید از داروهایی که سیستم ایمنی را تضعیف میکند استفاده نمایند که این می تواند 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 طورمرتب به تعداد افراد مبتلایان به دیابت اضافه می شود 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 بهانواع مختلف سلولها امکان جدیدی را در روش های درمانی برخی بیماری ها برای محققین فراهم میسازد (۲۰). نتایج حاصل

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 می تواند برای تمایز بن یاخته های جنینی به سمت سلولهای اندودرمی، مزودرمی، اکتودرمی به وجود می آورد. در اجسام شبه جنینی بن یاخته ها در وضعیت مناسبی قرار می گیرند به طوری که از نظر واکنشهای سلول ـ سلول و توليد فاكتورهاى رشد شرايط مناسبي را براى تمایز به وجود می آورند (۲۱). با روش مذکور مراحل تولید سلولهای مولد انسولین از سلولهای بنیادی جنینی انسانی به ۵ مرحله قابل تقسيم است (۱۰٬۱۴). مرحله اول، تكثير بن ياختههاي جنینی با حضور سلولهای تغذیه کننده است که در محیط کشت خاص خود صورت می گیرد، با تشکیل اجسام شبه جنینی، بن یاخته های جنینی می توانند به هر یک از انواع سلولی تمایز پیدا کنند، اجسام شبه جنینی، ساختارهای پیچیدهای می باشند که متناسب با تعداد سلول تشكيل دهنده آن به سمت يك 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 می شوند و تنها سلولهای نستین مثبت در محیط باقی مانده و بقیه سلولها می میرند (۸) نستین یک پروتئین فیلامنت بینابینی است که به طور معمول در پیش سازهای

سلولهای عصبی یافت می شود. چون نستین در تعدادی از سلولهای پانکراسی نابالغ که قادر به ترشح هورمون نمی باشند، بیان می شود و بعد این سلولها قادر به ترشح انسولین و گلوکاگون می گردند، به همین دلیل برای تمایز بن یاخته های جنینی به سمت سلولهای مولد انسولین، روشی به کار گرفته شد که در آن تعداد سلولهای نستین مثبت افزایش پیدا می کند. مطالعات انجام گرفته جدید راجع به این که آیا واقعاً سلولهای نستین مثبت، سلولهای پیش ساز بخش اندو کرین پانکراسی اند یا نه با تردید برخورد می کنند (۲۴). پیش سازهای سلولهای جزایر پانکراسی که نستین مثبت می باشند ممکن است در عصبزایی و اطراف جزایر مثبت می باشند ممکن است در عصبزایی و اطراف جزایر لانگرهانس پانکراس دخالت داشته باشند (۲۵).

مرحله چهارم، تکثیر سلولهای پیش ساز اندو کرینی پانکراس است. در این مرحله سلولهایی که باقی ماندهاند با استفاده از فاکتور رشد bFGF شروع به تکثیر می کنند، bFGF باعث بلوغ و تمایز سلولهای پیش ساز مولد انسولین می گردد (($^{(\Lambda)}$) 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 اندو کرینی پانکراس دخالت می کنند از اهمیت زیادی برخوردار است. از آن جمله نیکوتین آمید است (۱۵) نیکوتین آمید بازدارنده پلی سنتاز (ریبوز ـ ADP) است که باعث تمایز و افزایش تعداد سلولهای بتا می گردد. نیکوتین آمید در بیان ژن بسیاری دارد (ژن مؤثر در تمایز نهایی سلولهای مولد انسولین) نقش بسیاری دارد ((۱۶) بقای سلولهای مولدانسولین پانصد هزار برابر در حضور نیکوتین آمید زیادتر می شود ((۱۷) بیات می شود ((۱۷) بیات الله این الله این الله این الله این آمید زیادتر می شود ((۱۷) بیات الله این الله

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 اندوکرین پانکراس می باشند.

مجموعه عملکرد چندین ژن در تکوین پانکراس و نحوه عمل Pdx1 آن نقش اساسی دارند از دسته این ژنها می توان به Pdx1 و گلو کو کیناز , IAPP,Ins و گلو کو کیناز , NKx6.1 و PC2, PC1/3 اشاره کرد. NKx6.1 از دسته ژنهای مخصوص

سلولهای مولد انسولین است. بیان این ژن را می توان 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 می گردد. بیان NKx6.1 در سلولهای اندودرمی تنها به سلولهای مولد انسولین محدود می شود. تجلی ژن NKx6.1 برای تشکیل اجتماعات سلولهای مولد انسولینی لازم و ضروری است. تجلی این ژن ابتدا در سلولهای اپی تلیالی شروع می گردد و در نهایت فقط به سلولهای بتا ختم می شود. Isl1 از اولین دسته فاکتورهای هومئودمینی می باشد که نسبت به بقیه ژنهای دخیل در تکوین سلولهای بخش اندوکرینی زودتر بررسی و مطالعه گردید. بیان این ژن برای بقاء سلولهای اندو كريني و تكوين بخش اگزو كريني پانكراس لازم است. Isl1 از جمله ژنهای مهم دخیل در تشکیل جزایر پانکراسی است. بیان Isl1 را هم می توان در کشت سلولهای بخش اندو کرینی و هم در کشت سلولهای عصبی در in vitro مشاهده کرد. Pax4 از دسته ژنهای خانواده Pax می باشد که فقدانش باعث کاهش شدید تعداد سلولهای بتا (سلول مولد انسولین) و دلتا (سلول مولد سوماتوستاتین) می گردد. در حالی که نقشی در تعداد سلولهای مولد گلو کا گون ندارد. Pax4 از دسته ژنهای مهمی است که باعث تمایز سلولهای بنیادی به سلولهای مولد انسولین می گردد. موش فاقد ژن Pax4 سه روز بعد از تولد می میرد, سطح بیان PC1/3 و PC2 در فرد بالغ بسيار پايين مي آيد. دو ژن PC2 و PC1/3 برای پردازش پروانسولین به انسولین بالغ لازم و ضروری می باشند. حضور این دو ژن و بیان آنها مشخص کننده حضور انسولین بالغ در محیط کشت می باشد. PC2 ابتدا بین زنجیره A و C پروانسولین و بعد بین B و C را برش می دهد در حالی که عمل PC1/3 عكس PC2 است. بيان 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 می گردد، به متابولیسم آن در سلول افزوده می گردد و در نتیجه سطح ATP/ADP افزایش پیدا می کند، با بالارفتن میزان ATP جلوی جریان پتاسیم از طریق كانال پتاسيم Kir 6.2 گرفته مي شود و اين باعث دپلاريزاسيون و فعال شدن كانال كلسيم نوع L و در نهايت افزايش كلسيم سیتوزولی می گردد. افزایش Ca سیتوزولی باعث رهاسازی

انسولین می گردد. 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 دهنده های دیگر گلوکز می باشد که در همه انواع سلولهای بنیادی جنینی انسانی یافت می شود، از دسته دیگر سلولهای بیان کننده Glut 1 ، سلولهای فیبروبلاستی می باشند. با استفاده از RT-PCR معلوم شد که سلولهای تمایز یافته نهایی قادر به بیان ژن Insulin b می باشد، تفاوت Insulin a و Insulin b در طراحی پرایمرهای آن می باشد. طراحی پرایمر Insulin b از روی اگزونهای ۲ و ۳ ژن انسولین می باشد که پس از اسپلایسنیگ در کنار هم قرار میگیرند. قطعه تکثیر یافته توسط پرایمرهای Insulin b شامل نواحی پپتیدی C و B پروانسولین می باشد. حضور باند در ناحیه مربوط به یرایمر Insulin b نشان دهنده سنتز انسولین توسط سلول است. یره یروانسولین، شامل ۱۱۰ اسید آمینه می باشد که توالی نشانگر آن شامل ۲۴ اسید آمینه است. بعد از تبدیل به یروانسولین دارای یک ساختار شامل ۳ منطقه پیتیدی C,B,A می گردد (ناحیه C,B,A ناحیه ۲ ۵۸ـ۸۹, ناحیه B.۱۱۰:B). تحقیق راجع به فاکتورهای تنظیم کننده در تکوین پانکراس هنوز در اول راه است، نتایج حاصل از مطالعات ژنی می تواند اطلاعات کافی و جامعی راجع به همکاری ژنها در به وجود آوردن سلولهای بخش اندوکرینی و اگزو کرینی در اختیار دانشمندان قرار دهد ۲۳،۲۶،۲۷)

با استفاده از ایمونوسیتوشیمی معلوم شد که هر چهار دسته سلولهای بخش اندو کرینی 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 rin vivo تولید کنند و در عین حال، ترشح آن تنظیم شده باشد. سلولهای تمایز یافته نهایی قادر به ترشح تنظیم شده نمی باشند. می توان 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 گلو کز بالا استفاده شده است، بنابراین حساسیت این سلولها نسبت به مقادیر مختلف آگلو کز از بین رفته است. غلظت گلو کز محیط کشت در مرحله نهایی ملوکز از بین رفته است. غلظت گلو کز محیط کشت در مرحله نهایی محلوکه این میباشد ((x,y)) میباشد ((x,y)) میباشد ((x,y)) میباشد ((x,y)) میباشد ((x,y)) میباشد و میباشد ((x,y)) میباشد این مسلولهای مولد انسولین نیز همین تمایز سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای مولد انسولین نیز همین

نکته را متذکر شدند. آنها از روش تمایز خود به خودی بن سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای مولد انسولین استفاده کردند، در دو غلظت متفاوت 5.5mM و 25mM گلو کز سلولهامورد 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 گلو کزی معادل 4.5mg/ml بود. دلیل دیگر این است که این سلولها ممکن است، سلولهای بتای حقیقی نباشند. انسولینی که به محیط کشت ترشح می شود 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 می دهد. اگرچه این سلولها براساس ارزیابی رادیوایمونواسی قادر به ترشح انسولین می باشند ولی فاقد گرانولهایی می باشند که مخصوص سلولهای بتای حقیقی است. سلولهای بتای حقیقی دارای گرانولهای فراوان و متراکم در ناحیه مرکز سلول می باشند به طوری که ۷۰ درصد حجم سلولها را تشکیل می دهند، این گرانولها به چند نوع تقسیم می شوند. میتوکندری در سلولهای بتا بسیار فراوان و کوچک می باشند

طراحی یک روش که بتوان فقط در طی آن سلولهای بخش اندو کرینی 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 می تواند نیز از طریق سلولهای بنیادی درمان شود با تکمیل روش هایی که به منظور تمایز سلولهای بنیادی به سلولهای مولد انسولین است می توان عملا به استفاده بالینی از این سلولها در درمان بیماریها نزدیک شد.

References:

- 1. Shapiro AM, Lakey JR, Royan EA. Islet transplantation in seven patients with type. Idiabetes mellitus using a glococorticoid-free immunosuppressive regimen. N. Engl. J. Med., 2000, 343:203-208
- 2. Eftrat S. *Cell replacement therapy For type I 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. Acod. Sci. USA., 2000, 6: 278-282.
- 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. Eftrat S. Generation of insulin-Producing cells from stem cells for cell replacement therapy of type I 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, Taee 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 insulinproducing 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. Diabetolodia, 2004, 47: 1442-1451.
- 18. Humar A, Kandaswamy R. Granger D. Gruessner R. Decreased Surgical risks

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-08-13]

- ofpancreas 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 insulinsecreting 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 insulinproducing 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. Shiroi 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. 28- Paparo A.A, Lesson T.S, Lesson C.R. Text/Atlas of Histology. W.B. Saunders Company, 1988,463-473.