مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی شهید صدوقی یزد
دوره چهاردهم ، شماره اول، بهار ۱۳۸۵، صفحات ۵۸ – ۴۷

تمایز بن‌یاخته‌های جنینی انسان به سلولهای مولد انسولین

دکترحسین بهاروند*[۱]، هانیه جعفری[۲]، محمد معصومی[۳]، سپیده ملامحمدی[٤]

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 بن‌یاخته‌های جنین انسانی (رویان H1) استفاده شد. با استفاده از روش تمایز مستقیم‌بن‌یاخته‌های جنینی بعد از تشکیل اجسام شبه جنینی به سمت سلولهای مولد انسولین متمایز شدند به دنبال آن با استفاده‌از 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 انسولین‌انجام شد. سلولهای حاصل مورد ارزیابی ایمونوسیتوشیمی ،RT-PCR ، سنجش میزان ترشح انسولین با استفاده ازرادیوایمونواسی 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 وپلی‌پپتید پانکراسی را نشان داد. در ضمن RT-PCR سلولها، تجلی ژنهای بخش اندوکرینی پانکراس را در مرحله نهایی‌تمایز 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 خونی‌تشکیل 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.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که امکان تمایز بن یاخته‌های 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

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 اماگاهی اوقات، مقدار انسولین موجـــود 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 های‌دیگری برای درمان دیابت نوع I، به توانایی سلولهای بنیادی برای تمایزشان به سلولهای مولد انسولین

*۱- استادیار گروه سلولهای بنیادی، پژوهشکده رویان – تهران
صندوق پستی ٤٦٤٤ ـ ۱۹۳۹۵ E.mail: Baharvand50@yahoo.com
۲و۳و٤- کارشناس پژوهشکده رویان – تهران
تاریخ دریافت: ۱۳۸٤/٤/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۸٤/۱۲/۱۸

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]

پی بردند[۲]. پانکراس دارای دو بخش اگزوکرینی و اندوکرینی است. در بخش اگزوکرینی پانکراس مجراهایی وجود دارد که در بین‌سلولهای 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 می توان 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 صورت‌صدمه آن بافت، جایگزین سلولهای صدمه دیده آن شوند، اما مطالعات اخیر نشان می‌دهد که این سلولهای بنیادی قابلیت‌تبدیل به انواع مختلف سلولهای دیگر را دارند، به طور مثال در موش و زنوپوس 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 بافت هایی 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 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 روش‌تمایز 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 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 می‌کنند، ابتدا پیش سازهای نستین مثبت تکثیر شده و در نهایت این سلولها به سلولهای انسولین سازتمایز 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 درآینده 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 H1 (Royan H1) استفاده گردید[۱۳]. سلولهای فوق روی فیبروبلاست های جنینی موش

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]

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 ۲mM(Gibco) اسیدهای آمینه غیرضروری ۱٪ (Gibco)، بتا ـ مرکاپتواتانل ۰/۱mM (Sigma)، پنی‌سیلین ۱۰iu/ml، (Gibco) استرپتومایسین۱۰۰mg/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 می‌شوند. قطعات برش‌خورده در قطرات آویزان که هر قطره آن ۲۰ میکرولیتر است و محیط کشت آن همان محیط کشت سلولهای بنیادی جنینی‌است، کشت داده می‌شوند. هر قطعه در یک قطره قرار می‌گیرد. بعد ار دو روز کشت، اجسام شبه جنینی (Embryoid body) تشکیل می‌شود. در اجسام شبه جنینی ژنهای سه لایه زاینده جنینی یعنی اکتودرم، اندودرم، مزودرم بیان می‌شود. 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 می‌شوند. بعد از دو روز، سی عدد جسم شبه جنینی به یک خانه از ظرف ۶ خانه (TPP) منتقل‌گردیدند تا اجسام جنینی به کف ظرف چسبیده و رشد کنند. محیط کشت مورد استفاده در این مرحله همان محیط کشت فوق‌است. انتخاب سلولهای پیش‌ساز 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 ۵ µg/ml ، فیبرونکتین (Sigma)µg/ml ۵ ، سدیم سلنایت (Sigma)۳۰nM، آپوترانسفرین µg/ml (Sigma) ۵۰، در این مرحله، محیط کشت هر دو روز یک بار تعویض گردید. طول مدت این مرحله ۶ روز است. در روز ۸+۴، با استفاده از تریپسین 0.05% EDTA(Gibco)۰/۵۳mM، اجسام شبه جنینی به صورت تک سلولی‌درآمده و در پلیت ۲۴ خانه (TPP) که از قبل با پلی – لامی‌نین (invitrogen) µg/ml ۱ و پلی ـ ال ـ اورنی تین ۱٪ ، (Sigma)۱۵mg/ml پوشیده شده، کشت داده شدند. محیط کشت مورد استفاده در این مرحله DMEM/F12 به همراه افزودنی های ذیل بود: لامی‌نین ng/ml ، ۱µg/ml ، ۲٪(Gibco) B27 ، ۱٪(Gibco)N2 ، ۱۰(Sigma)bFGF.

در پایان این مرحله سلولهای پیش ساز بخش اندوکرینی پانکراس تکثیر می‌گردند و آماده‌اند تا وارد مرحله نهایی که تمایزآنها می‌باشد وارد شوند. در این مرحله محیط کشت به صورت یک روز در میان تعویض می‌گردد. مدت کشت ۶ روز است. N2 شامل انسولین ۵۰۰µg/ml، ترانسفرین ۱۰mg/ml، پروژسترون ۰/۶۳mg/ml، پوترسین ۱/۶۱۱mg/ml و سلنایت ۰/۵۲µg/ml می‌باشد.

در روز ۱۴+۴ محیط کشت DMEM/F12 به همراه ۲B27٪، ۱N2٪، نیکوتینامید 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 ۲۱+۴، سلولها با پارافرمالدهید ۴٪ تثبیت شده سپس با سرم بز ۱۰٪ به مدت ۳۰دقیقه تیمار شدند. از آنتی‌بادیهای مونوکلونال اولیه انسولین (۱:۱۰۰ Sigma)، گلوکاگون (Sigma۱:۵۰۰) ، سوماتوستاتین (۱:۱۰) Chemicon، پلی پپتیک پانکراسی (۱:۲۰ Chemicon) استفاده شد. بعد از یک ساعت تیمار باآنتی 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. آنتی‌بادی ثانویه‌ای که در طی ایمونوسیتوشیمی مورد استفاده قرار گرفت به ترتیب زیر بود:

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

Flourecence isothiocyanate (FITC) – conjugated anti-Rabbit IgG

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]

ارزیابی ترشح انسولین: سلولها در روز ۲۲+۴ 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

۰/۱٪ می‌باشد، دوبار شستشو گردید و سپس به سلولها بافر به همراه 0.1%BSA و نیفیدیپین(5mM) اضافه‌گردید. سلولها سی‌دقیقه انکوبه گردیده و بعد محیط رویی جمع‌آوری گردید[۱۰]، به سلولها دوباره بافر کربس – رینگر به همراه ۱٪ BSA اضافه شد. سلولها ۵ دقیقه انکوبه شده و محیط رویی آنها جمع‌آوری شد. درمرحله بعدی سلولها به مدت ۵ دقیقه با بافرکربس ـ رینگر به همراه BSA و گلوکز (5mM) یا (۵۰mM) انکوبه شدند و ۵ دقیقه بعد محیط رویی برای‌ارزیابی میزان ترشح انسولین جمع‌آوری گردید. ارزیابی توسط کیت SourceINS-IRMA Kit Bio انجام شد.

RT-PCR : در ابتدا با استفاده از محلول RNX-plus^{TM} (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)

(5unit/1µl),۱ µl(۱۰ µM)، ۰/۵µl از هر پرایمر ،dNTPmix۱۰mM), ۰/۷۵µl ۰/۵ µl(سیناژن TA8110C) و در نهایت با استفاده از آب دوبار تقطیر به حجم ۲۵µl 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 ثـــــانیه, ۹۳°C، ۳)Annealing : ۴۵ ثانیه، با توجه به Tm 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 وبا 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 از موش نژاد Balb/c استفاده گردید. ۲۴ ساعت قبل از عمل پیوند به موش سیکلوسپورین (10mgr/kg S.C) تزریق گردید. حدوداً ۱ تا ۲×۱۰^{۶} سلول به موشها تزریق شد، ابتدا سلولهای چسبیده به کف پلیت به کمک EDTAmM ۳ که در بافرکربس – رینگر بدون $Ca^{+۲}$ حل شده بود به مدت ۵ دقیقه در ۳۷°C تیمار از کف پلیت کنده شدند. سلولها بعد از شستشو در بافرکربس – رینگر بدون $Ca^{+۲}$ به زیر پوست موش تزریق شدند. بعد از گذشت ۱۹ روز از عمل پیوند، ازناحیه پیوند خورده نمونه برداری گردید، قطعات برش خورده از نمونه برداشته شده در پارافرمالدهید ۴٪ پیکریک اسید۰/۱۵٪ 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 TEMقرار گرفتند. تثبیت اولیه با گلوتارالدهید 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 برش‌گیری و رنگ‌آمیزی شدند .

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]

Name	Sequence	Size	Annealing
Sur1	5'CACATCCACCACAGCACATGG3' 5'GTCTTGAAGAAGATGTATCTCCTCA3'	420 bp	62º
Insulin(a)	5'AGCCTTTGTGAACCAACACC3' 5'GCTGGTAGAGGGAGCAGATG3'	245 bp	62º
Glut1	5'CCACGAGCATCTTCGAGAA3' 5'GCACATGCCCACAATGAAA3'	374 bp	55º
Glut2	05'GGTTTGTAACTTATGCCTAAG3' 5'GCCTAGTTATGCATTGCAG3'	213 bp	60º
Somatostatin	5'CTCCGTCAGTTTCTGCAGAAG3' 5'GGATGTGAAAGTCTTCCAGAAG3'	312 bp	60º
Pax4	5'GTGGGCAGTATCCTGATTCAGT3' 5'TGTCACTCAGACACCTTTCTGG3'	312 bp	60º
Isl1	5'GATTTCCCTATGTGTTGGTTGC3' 5'CTTCCACTGGGTTAGCCTGTAA3'	827 bp	60º
Nkx6.1	5'GTTCCTCCTCCTCCTCTTCCTC3' 5'AAGATCTGCTGTCCGGAAAAAG3'	381 bp	60º
PC1/3	5'TGGCTGAAAGAGAACGGGATACATCT3' 5'ACTTCTTTGGTGATTGCTTTGGCGGTG3'	457 bp	60º
PC2	5'GCATCAAGCACAGACCTACACTCG3' 5'GAGACACAACCACCCTTCATCCTTC3'	309 bp	60º
Kir6.2	5'CGCTGGTGGACCTCAAGTGGC3' 5'CCTCGGGGCTGGTGGTCTTGCG3'	497 bp	62º
Glucokinase	5'AAGAAGGTGATGAGACGGATGC3' 5'CATCTGGTGTTTGGTCTTCACG3'	230 bp	60º
IAPP	5'GAGAGAGCCACTGAATTACTTGCC3' 5'CCTGACCTTATCGTGATCTGCCTGC3'	471 bp	60º
Insulin(b)	5'GCCTTTGTGAACCAACACCTG3' 5'GCAGTAGTTCTCCAGCTGGTA3'	258 bp	61º

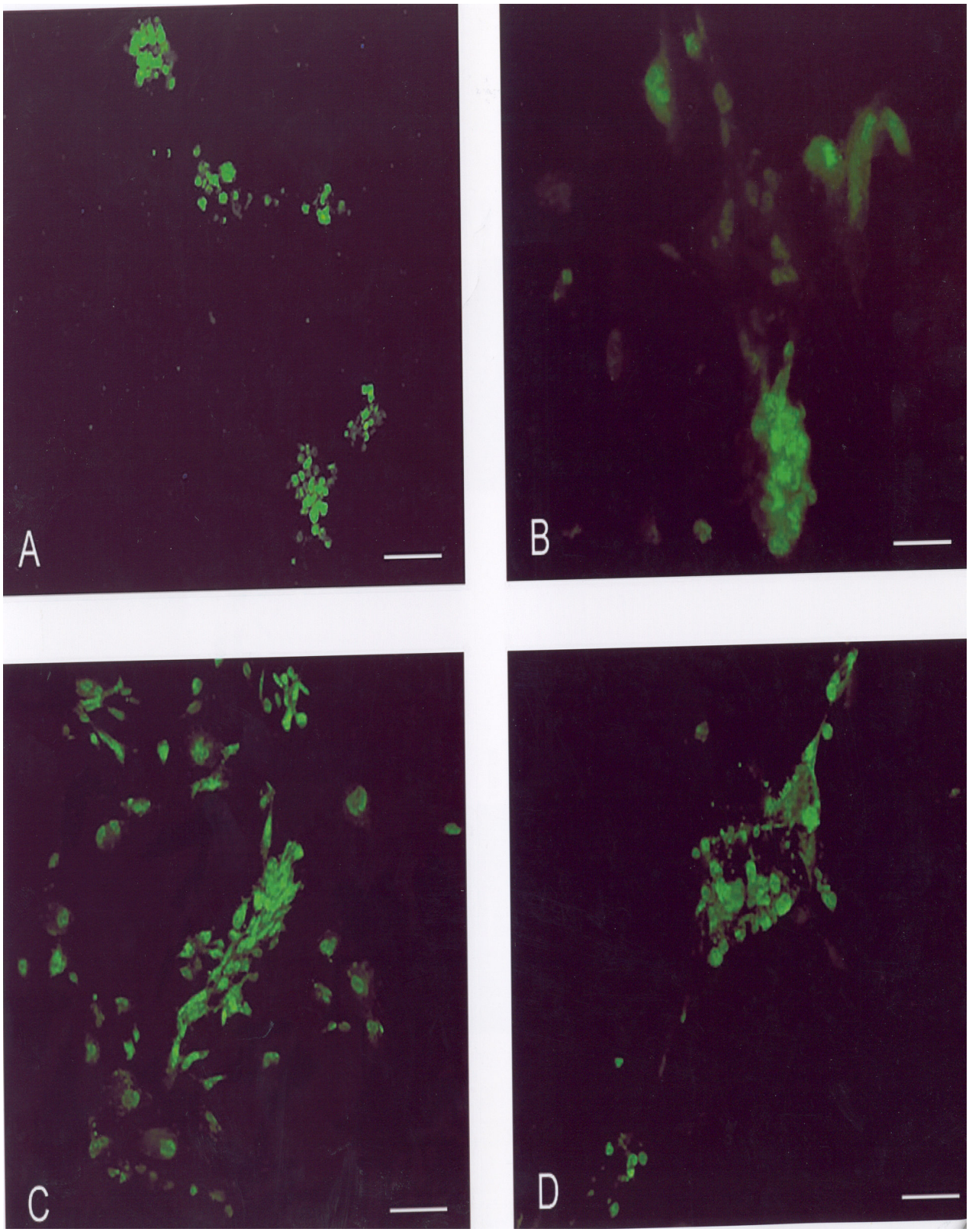
نتایج

با ارزیابی ایمونوسیتوشیمی معلوم گردید که با استفاده از روش فوق هر ۴ دسته سلولهای α,β,γ و pp بخش اندوکرین 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 ، IAPP ، Kir6.2، Sur1 می‌باشند (شکل۲). 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 Oct-4 را که‌از ژن‌های شاخص بن یاخته‌های جنینی است بیان نکردند. سلولها در روز ۴+۲۲ مورد ارزیابی ترشح انسولین قرار گرفتند. در غلظت های مختلف ۵ mM و ۵۰ mM گلوکز میزان ترشح انسولین سنجیده شدند مقادیر ترشح انسولین از سلولهـــای مولد انسولینی را در روز ۴+۲۲ می‌توانید در نمودار (۱) ملاحظه کنید.

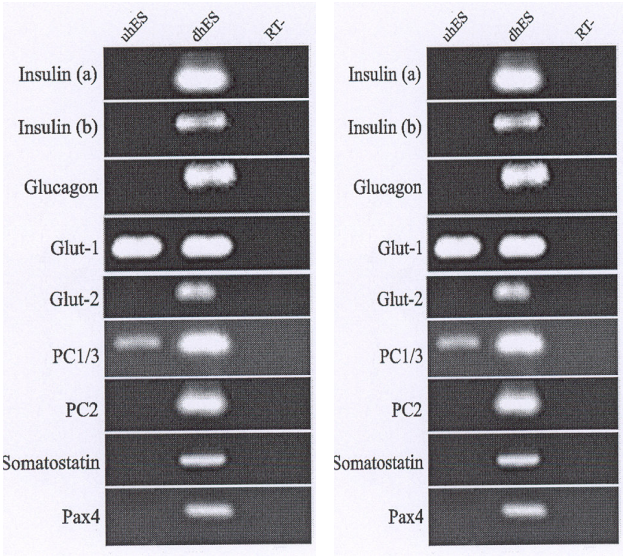
بعد از افزودن گلوکز میزان ترشح انسولین چندان فرقی با زمانی که کلوگز اضافه نمی‌شود ندارد. حتی اختلاف معنی‌داری بین میزان انسولین در غلظت های مختلف دیده نمی‌شود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نیز مشخص کرد که سلولهای حاصل دارای شبکه اندوپلاسمی و دستگاه گلژی پیچیده می‌باشند. دو دسته گرانول در این سلولها قابل تشخیص است، یک دسته 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 می‌توان در شکل (۵A) ملاحظه کرد. در فاصله بین سلولها اتصالات دسموزوم و Gap Junction را می‌توان مشاهده کرد (شکل ۵B). می‌توان در (شکل۴A) 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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]

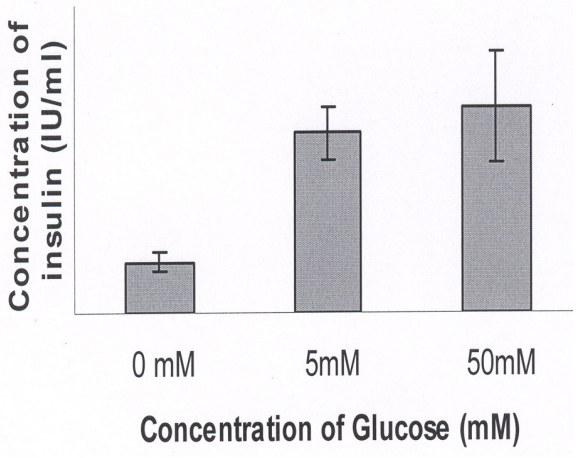


شکل ۱: تمایز سلولهای بنیادی انسانی Royan H1 به سلولهای مولد انسولین در طی یک روش چند مرحله‌ای صورت می‌گیرد. ارزیابی ایمونوسیتوشیمی این سلولها ثابت کرد که سلولهای حاصل قادر به بیان مشخصه‌های سلولهای انسولین(A) سلولهای گلوکاگون ،(B) سلولهای سوماتوستاسین ،(C) سلولهای پلی پپتید پانکراسی(D) می‌باشند.

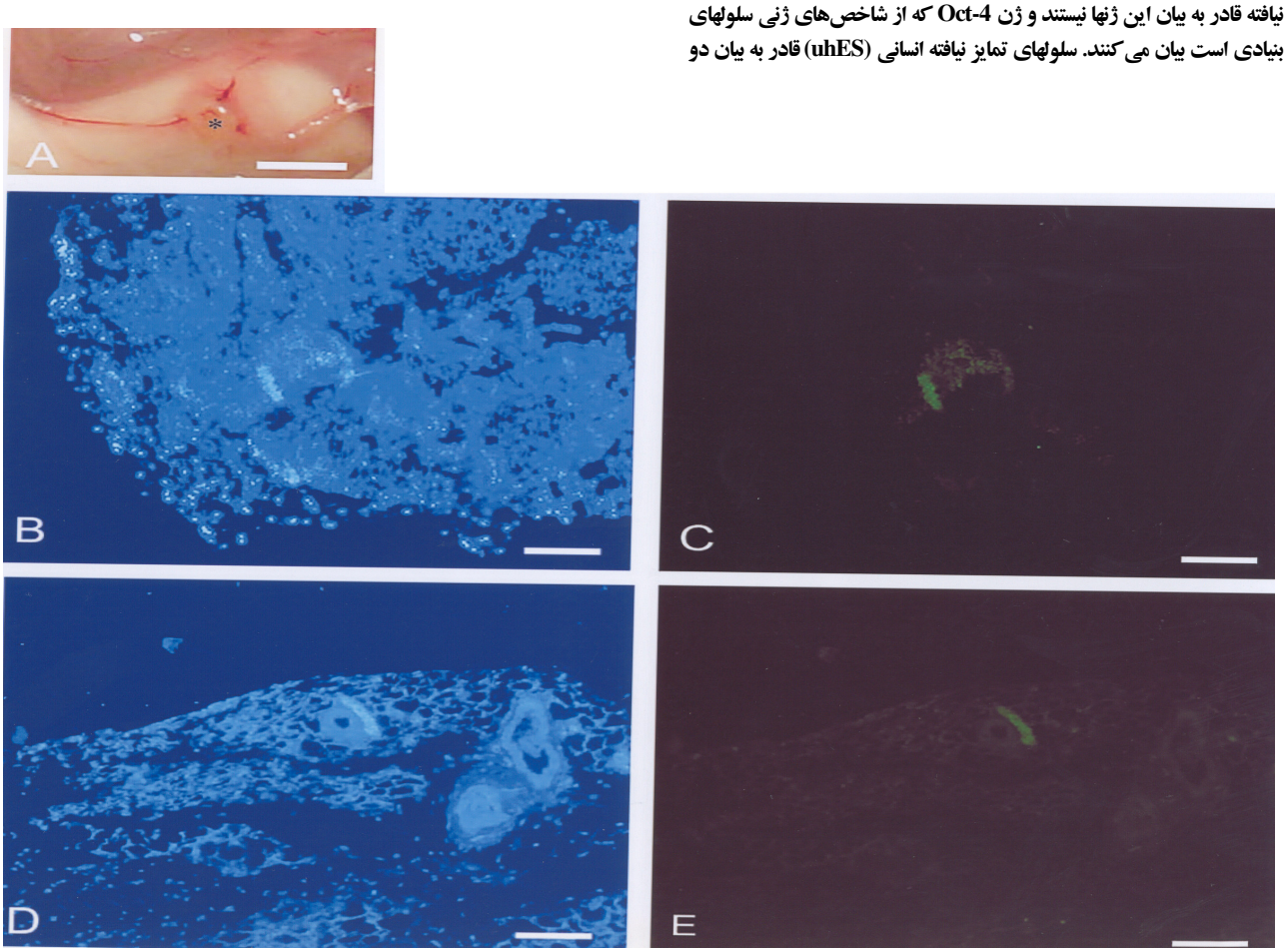
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]



شکل ۲ : RT-PCR سلولهای تمایز یافته معلوم کرد که سلولهای حاصل قادر به بیان ژنهای خـــــاص
(Insulin, Glucagon, Glut 2, PC1/3, PC2, Somatostain, Pax4, Isl1, NKx6.1, Glut 1, Glucokinase, IAPP, α-cardiactin, Kir 6.2, Sur 1)
بخش‌اندوکرینی پانکراسی اند (dhES)، در حالی که سلولهای بنیادی تمایز نیافته قادر به بیان این ژنها نیستند و ژن Oct-4 که از شاخص‌های ژنی سلولهای بنیادی است بیان می‌کنند. سلولهای تمایز نیافته انسانی (uhES) قادر به بیان دو 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.

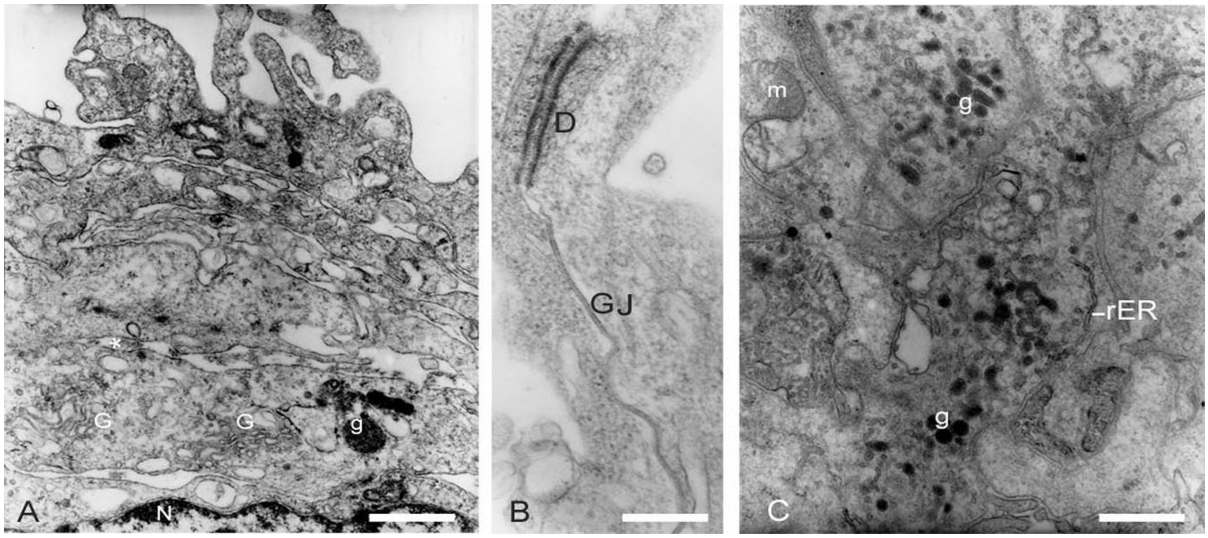


شکل ۳: سلولهای مورد ارزیابی ترشح انسولین در غلظت هـای مختلـف گلوکز ۵،۰mM ,۵۰ قرار گرفتند که هیچ اختلاف معنی‌داری بین غلظتهای مختلف دیده نشد.



شکل ٤: 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 ایمونوهیستوشیمی قرار گرفتند این سلولها قادر به ترشح انسولین (C) و گلوکاگون (E) بودند. بعد از ایمونوهیستوشیمی هسته سلولها با DAPI رنگ‌آمیزی شدند (D,B).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]



شکل ۵: سلولهای مولد انسولین در روز ۲۱+۷ (A) و ۱۹ روز بعد از پیوند به موش (B) با تکنیک TEM مورد ارزیابی قرارگرفتند. در تصاویر به دست آمده می‌توان اگزوسیتور، میتو کندری (m)، شبکه اندوپلاسمی (rER)، دسموزوم (D) ,(gap junction(G)، 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 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 نوعI (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 طورمرتب به تعداد افراد مبتلایان به دیابت اضافه می‌شود با توجه به مطالب گفته شده به نظر می‌رسد که یافتن روش های درمانی‌جدید 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 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 ـ 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 بن یاخته‌های جنینی با حضور سلولهای تغذیه کننده است که در محیط کشت خاص خود صورت می‌گیرد، با تشکیل‌اجسام 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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]

سلولهای عصبی یافت می‌شود. چون نستین‌در تعدادی از سلولهای پانکراسی نابالغ که قادر به ترشح هورمون نمی‌باشند، بیان می‌شود و بعد این سلولها قادر به ترشح‌انسولین و گلوکاگون می‌گردند، به همین دلیل برای تمایز بن‌یاخته‌های جنینی به سمت سلولهای مولد انسولین، روشی به کارگرفته 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 اندوکرین پانکراسی‌اند یا نه با تردید برخورد می‌کنند[۲۴]. پیش سازهای سلولهای جزایر پانکراسی که نستین مثبت می‌باشند ممکن است در عصب‌زایی و اطراف جزایر لانگرهانس پانکراس دخالت‌داشته باشند[۲۵].

مرحله چهارم، تکثیر سلولهای پیش ساز اندوکرینی 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 اندوکرینی پانکراس دخالت می‌کنند 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 می‌گردد. نیکوتین آمید در بیان ژن NKx6.1 (ژن مؤثر در تمایز نهایی سلولهای مولد انسولین) نقش بسیاری دارد[۱۶] بقای سلولهای مولدانسولین 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 ازتکنیک RT-PCR نشان داده شد که سلولهای تمایز یافته نهایی قادر به بیان ژن‌های بخش اندوکرین پانکراس می‌باشند.

مجموعه عملکرد چندین ژن در تکوین پانکراس و نحوه عمل آن نقش اساسی دارند از دسته این ژنها می توان به Pdx1، IAPP,Ins و گلوکوکیناز Sur 1, Kir6.2, NKx6.1, Pax4, 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 اندوکرینی و تکوین بخش اگزوکرینی پانکراس لازم است. Isl1 از جمله ژنهای مهم دخیل در تشکیل جزایر پانکراسی است. بیان Isl1 را هم می توان در کشت سلولهای بخش اندوکرینی 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 گلوکاگون 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 Pax4 در فرد بالغ بسیار پایین می آید. 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 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 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 کانال پتاسیم Kir 6.2 گرفته می شود و این باعث دپلاریزاسیون و فعال شدن کانال کلسیم نوع L و در نهایت افزایش کلسیم سیتوزولی می گردد. افزایش Ca سیتوزولی باعث رهاسازی

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]

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 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 اسپلایسینگ 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 پرایمر Insulin b نشان دهنده سنتز انسولین توسط سلول است. پره پروانسولین، شامل ۱۱۰ اسید آمینه می باشد که توالی نشانگر آن شامل ۲۴ اسید آمینه است. بعد از تبدیل به پروانسولین دارای یک ساختار شامل ۳ منطقه پپتیدی C,B,A می گردد (ناحیه A : ۵۴ـ۲۵, ناحیه C: ۸۹ـ۵۵, ناحیه B:۱۱۰ـ۹۰). 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 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 نهایی3.51 mM می‌باشد[۸،۱۴]. Assady و همکارانش در تمایزسلولهای بنیادی جنینی به سلولهای مولد انسولین نیز همین نکته را متذکر شدند. آنها از روش تمایز خود به خودی بن‌سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای مولد انسولین استفاده کردند، در دو غلظت متفاوت5.5mM و 25mM گلوکز 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 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 گرانولهایی می‌باشند 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[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 روش هایی که به منظور تمایز سلولهای بنیادی به سلولهای مولد انسولین است می‌توان عملا به استفاده بالینی از این سلولها در درمان بیماریها نزدیک شد .

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]

References:

1. Shapiro AM, Lakey JR, Royan EA. ***lslet 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.
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. 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 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***. Diabetolodia, 2004, 47: 1442-1451.
18. Humar A, Kandaswamy R. Granger D. Gruessner R. ***Decreased Surgical risks***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]

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 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. 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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]