مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۶، شماره ۲، تابستان ۹۵، صفحات ۶۹ تا ۷۵

Original Article

بقا و تکثیر جزایر جدا شده پانکراسی موش بالغ در شرایط کشت آزمایشگاهی

محمد نبیونی[۱]، الهام حویزی[۲]، آذر چاوشیان[۳]، سمیه بهرام زاده[۴]، محمود هاشمی تبار[۵]

[۱] دانشیار، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی تهران
[۲] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز
[۳] کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی تهران
[۴] گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، زیست شناسی سلولی تکوینی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
[۵] دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

چکیده

سابقه و هدف: *پیشرفت‌های اخیر در تمایز مستقیم سلول‌های بنیادی پانکراسی، پیشنهاد دهنده پتانسیل جایگزینی پانکراس در بیماران دیابتی است، اما اغلب پروتوکل‌های موجود پیچیده، زمان‌بر و پرهزینه است؛ بنابراین باید به دنبال پرتوکل‌های دیگری بود. امروزه استفاده از کشت هم‌زمان با جزایر پانکراسی، روشی امیدبخش برای تولید سلول‌های بتا است؛ بنابراین نیازمند نگهداری جزایر زنده برای دوره زمانی گسترده هستیم.*

روش بررسی: *جزایر پانکراسی جدا شده از موش به مدت ۲ هفته در شرایط کشت آزمایشگاهی نگهداری و بقا، تکثیر و مورفولوژی آنها مورد بررسی قرار گرفت. جزایر پانکراسی از موش نر نژاد NMRI با روش تعدیل شده Lacy and Kostianovsky و هضم آنزیمی با کلاژناز جدا شدند و برای تعیین ویژگی‌ها، به وسیله رنگ دیتیزون رنگ آمیزی شدند. همچنین بقای جزایر با روش MTT بررسی شد.*

یافته‌ها: *نتایج ما نشان داد که می‌توان جزایر پانکراسی موش بالغ را جدا کرده و حداقل به مدت یک هفته کشت داد، بدون اینکه عملکرد فعال خود را از دست دهند. با گذشت یک هفته، با توجه به کاهش بقا سلولی، تعداد سلول‌های جزایر نیز کاهش پیدا کرد. هر چه مدت زمان کشت افزایش پیدا می‌کرد، از میزان بقا و تعداد سلولها کاسته می‌شد.*

نتیجه‌گیری: *می توان جزایر جدا شده را به صورت زنده و فعال در کشت هم‌زمان مورد استفاده قرار داد. از آنجایی که این جزایر در سلول درمانی در جهت درمان دیابت استفاده می‌شود، بررسی میزان بقای این سلول‌ها در شرایط محیط کشت ضروری به نظر می‌رسد.*

واژگان کلیدی: *بقا، تکثیر، جزایر پانکراسی، کشت سلول، MTT، NMRI.*

مقدمه

پانکراس بالغ از لحاظ ظاهری و عملکردی دارای دو بخش مجزای درون‌ریز و برون‌ریز است. بخش برون‌ریز شامل سلول‌های مجرا و آسینار است که ۹۹-۹۵ درصد پانکراس را تشکیل می‌دهند و بخش مولد آنزیم‌های هاضم هستند که هضم مواد غذایی را برای سهولت جذب در روده سرعت می‌بخشند. بخش درون‌ریز شامل جزایر لانگرهانس است که تجمعات سلولی مشتق از آندودرم است و ما بین بخش برون ریز به صورت پراکنده وجود دارند. جزایر دارای ۴ نوع سلول هستند که هورمون‌های پپتیدی را می‌سازند: سلول‌های بتا (انسولین)، سلول‌های آلفا (گلوکاگون)، سلول‌های گاما (سوماتواستاتین)، و سلول‌های Pancreatic PP-(polypeptide) که پلی پپتید پانکراسی را تولید می‌کنند. اختلال در بخش درون‌ریز پانکراس موجب بیماری دیابت قندی (DM) می‌شود. این بیماری شایع‌ترین اختلال متابولیکی در جهان است که بسیاری از افراد را درگیر کرده است (۱). دیابت را می‌توان به

آدرس نویسنده مسئول: اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، محمود هاشمی تبار (**email**: Hashemi _ tabar @ Hotmail.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۹۴/۵/۱۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۴/۱۰/۶

Archive of SID
www.SID.ir

دو گروه اصلی تقسیم کرد که شامل دیابت نوع ۱ و دیابت نوع نوع ۲ هستند.

دیابت نوع ۱ اختلالی است که بر اثر تخریب خود ایمنی سلول‌های مولد انسولین پانکراس به وجود می‌آید، که این القای خودایمنی ممکن است در اثر عوامل ژنتیکی و محیطی به وجود آید. دیابت نوع ۲ بیماری متابولیکی پیچیده‌ای است که ۹۵ درصد جمعیت دیابتی را در مقایسه با نوع ۱ (که ۵ درصد است) تشکیل می‌دهد (۱). جایگزینی سلول‌های بتای پانکراسی، هدف درمانی چندین دهه برای کاهش میزان مرگ و میر و پیشرفت دیابت است. پیوند سلول‌های بتای مولد انسولین به شکل پانکراس کامل یا جزایر لانگرهانس جداشده، گزینه درمانی امیدوارکننده‌ای برای درمان این بیماری است (۲). با این وجود، در حال حاضر، چندین عامل مانع استفاده گسترده از این روش درمانی هستند و علت اصلی، کمبود شدید بافت‌های دهنده متناسب با گیرنده‌های واجد شرایط است (۳). به همین دلیل، تلاش‌های تحقیقاتی زیادی برای تولید بافت تولیدکننده انسولین جهت پیوند در مدل‌های انسانی و حیوانی انجام گرفته است. امروزه یکی از متداول‌ترین روش‌ها، تمایز سلول‌های بنیادی/ پیش ساز بزرگسالان یا جنینی به سلول‌های بتای پانکراسی مولد انسولین است (۴). مطالعات جنین شناسی نشان می‌دهند که پانکراس منشا آندودرمی دارد. دو میانکنش اصلی در تکوین بخش پشتی و شکمی پانکراس نقش دارند. پیام‌های اولیه ترشح شده از نوتوکورد باعث شروع ریخت‌زایی پانکراس پشتی و بیان ژن‌های اولیه مانند PDX1 و lsl می‌شوند که در تکوین پانکراس نقش دارند و دیگری سیگنال‌های نهایی هستندکه از مزانشیم ترشح می شوند و باعث تکوین هر دو ناحیه پشتی و شکمی و در نهایت ملحق شدن این دو ناحیه به یکدیگر می‌شود (۵). پانکراس در حال تکوین، فاکتورهایی تولید می‌کند که باعث تمایز سلول‌های بنیادی به سمت سلول‌های تولیدکننده انسولین می‌شود. از جمله این فاکتورها، فاکتور شبه انسولینی ۲ (Insulin Like growth Factor II= IGFII)، فاکتور رشد عصب (Neural growth Factor= NGF)، فاکتور رشد فیبروبلاستی (Fibroblastic growth Factor=FGF)، اکتیوین A و رتینوئیک اسید است که می‌توانند به تمایز سلول‌های بتای پانکراس کمک کنند (۶). در طی تکوین و اندام‌زایی بدن، آندودرم جلویی برای تشکیل جوانه پانکراس اختصاصی شده است. جوانه‌های پشتی و شکمی که از زایده اطراف روده جلویی حاصل شده‌اند، دچار درون روی شده و انشعابات اپی‌تلیوم آنها تکثیر یافته و وارد مزانشیمی که آن‌ها را احاطه کرده است می‌شوند، سلول هایی که اطراف مزانشیم هستند با دریافت پیام‌هایی به سلول‌های بتا تمایز پیدا می‌کنند و این سلول‌ها به سرعت در محیط کشت تکثیر می‌یابند (۷). تمایز سلول‌های بنیادی موش و انسان به سلول‌های اندوکرین پانکراس از سال ۲۰۰۰ شروع شد. Lumelsky در سال ۲۰۰۰ با مشاهده شباهت تکوین سیستم عصبی مرکزی و پانکراس، به منظور تمایز سلول‌های اندوکرین از روش تکوین سلول‌های عصبی یاری گرفت. از سال ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۵ گروه‌های مختلف با استفاده از بیان مداوم ژن PAX4، مهار کننده‌های مسیر سیگنالی PIK3، تمایز خودبه خودی، استفاده از محیط‌های غنی سازی سلول‌های نستین مثبت و نستین منفی از سلول‌های بنیادی، سلول‌های اندوکرینی پانکراس را تولید کردند (۸). با وجود این، هیچ یک از سلول‌های به دست آمده تمام نشانگرهای سلول‌های انسولین ساز را بیان نمی‌کردند. گروه‌های مختلف پژوهشی با روش‌های گوناگون و با استفاده از فاکتورها و محیط-های مناسب تکوین پانکراس سعی در تمایز بهتر سلول‌های بنیادی به سلول‌های تولید کننده انسولین داشتند (۱۰). یکی از تکنیک‌های مهم که به منظور بهینه کردن هر چه بیشتر شرایط محیط کشت برای به دست آوردن سلول‌های بهتر و با کیفیت‌تر مورد تحقیق و توجه قرار گرفت، استفاده از روش هم‌کشتی است. در این روش، جزایر لانگرهانس و سلول بنیادی مورد نظر را به صورت هم زمان کشت داده که با آزادسازی سیگنال‌های تمایز از سوی این جزایر، سبب القای تمایز در سلول بنیادی می‌شود (۱۰). از آنجایی که در روند تمایز از این جزایر به روش هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی استفاده می‌شود، در این مطالعه به نحوه استخراج و بررسی میزان بقا و وضعیت این جزایر در شرایط کشت آزمایشگاهی پرداختیم.

مواد و روشها

جداسازی جزایر لانگرهانس

موش نر نژاد NMRI (در محدوده وزنی ۳۰ -۲۵ گرم) از مرکز تحقیقات، تکثیر و نگهداری حیوانات دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز (اهواز، ایران) تهیه شد. نگهداری حیوانات مطابق با انستیتوی بین المللی سلامت انجام شد. حیوانات در شرایط استاندارد (۲ ± ۲۲ درجه سانتی گراد و نور کنترل شده تحت شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) با دسترسی به آب و غذای کافی در خانه حیوانات دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز نگهداری شدند. جزایر لانگرهانس پانکراس موش‌های نر نژاد NMRI به وسیله روش

Archive of SID

www.SID.ir

Lacy and Kostianovsky و به طریق روش هضم آنزیمی کلاژناز جدا شدند. پس از نخاعی کردن موش، شکم حیوان باز شد، مجرای صفراوی در انتهای دیستال و نزدیک به دوازدهه مسدود شد و ۵ میلی لیتر از محلول HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (Merck, Germany) حاوی: 115) Nacl , 10 NaHCO3 , 5 Kcl , 1.1 Mgcl2 , 1.2 NaH2P04 , 2.5 Cacl2 , 25 HEPES, 5D-glucose , PH=7.4 , 1% BSA) (که تمامی واحدها(mmol/l) هستند) و ۱/۴ میلی‌گرم/میلی لیتر کلاژناز IV (سیگما) به مجرا تزریق شد (۱۳). پس از آن، پانکراس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه حمام آب انکوبه شد.

پس از آن، ۱۵ میلی لیتر محلول سرد Hank's برای رقیق کردن غلظت کلاژناز و توقف روند هضم اضافه شد. برای شستن کلاژناز از بافت‌های جزایر، لوله به مدت ۲ دقیقه در ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و محیط رویی دور ریخته شد. شستن جزایر دوباره تکرار و باقی مانده به پتری دیش منتقل شد (۱۳). جزایر به روش Handpicking و توسط استریومیکروسکوپ (Euromex, Holland) از هم جدا شدند و برای مدت یک شب در محیط RPMI-1640 (Gibco, USA) به همراه 10% FBS,100 U/ML penicillin, 100 U/mL streptomycin و 5 mM D-glucose و با 95% O2 , 5% CO2 کشت داده شدند (۱۳،۱۴).

رنگ‌آمیزی دیتیزون (DTZ)

به منظور تشخیص بافت جزایر لانگرهانس سلول‌های جزایر از رنگ‌آمیزی دیتیزون (Dithizone) استفاده شد. دیتیزون یک عامل متصل شونده به روی است که به صورت انتخابی سلول-های بتای پانکراس را به رنگ قرمز در می‌آورد. زیرا این سلول‌ها دارای مقادیر زیادی روی هستند. برای تهیه محلول دیتیزون، ۵۰ میلی گرم دیتیزون (Merck) در ۵ میلی لیتر دی متیل سولفوکسید (Dimethyl sulphoxide) (Sigma) حل و به عنوان محلول استوک در دمای ۲۰ – درجه سانتیگراد نگهداری شد. محلول رنگ آمیزی از طریق یک فیلتر نایلونی ۰/۲μm فیلتر شد و پس از آن به عنوان محلول کار DTZ مورد استفاده قرار گرفت. در هنگام استفاده، دیتیزون با غلظت نهایی ۱۰ میکرومولار به سلول‌ها اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور انکوبه شد. سلول‌هایی که در نتیجه این رنگ آمیزی به رنگ قرمز درآمدند، سلول‌های تولید کننده انسولین بودند.

بررسی میزان بقای جزایر لانگرهانس با استفاده از تست MTT

میزان بقای سلول‌های جزایر به وسیله روش رنگ سنجی (MTT) مورد آزمایش قرار گرفت. اساس این تست شکسته شدن نمک زرد رنگ تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده و تولید بلورهای بنفش رنگ و نا محلول فورمازان است. هرچه تعداد سلول‌های زنده بیشتر باشد، شدت رنگ تولید شده نیز بیشتر خواهد بود. برای انجام این تست، تعدادی سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت و به مدت۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. سپس محیط رویی خارج و هر چاهک دو بار توسط PBS شسته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد سرم به هر چاهک پلیت اضافه و پلیت به مدت۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از آن محیط هر چاهک با ۱۰۰ میکرولیتر محیط فاقد سرم تازه جایگزین شد (۱۷، ۱۸). به هریک از چاهک‌ها ۰/۵ mg/mL محلول MTT (Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma)، با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر اضافه و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس محیط رویی هر چاهک تخلیه و به منظور حل شدن بلورهای فورمازان ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید DMSO به هر یک از آنها اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق و در مکانی تاریک قرار داده شد. سپس محتوای هر چاهک از پلیت به یک چاهک دیگر منتقل و جذب نوری (OD) هر چاهک توسط Microplated Reader (BioRad Instruments USA) در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد (۱۶، ۱۸).

شمارش سلول‌ها

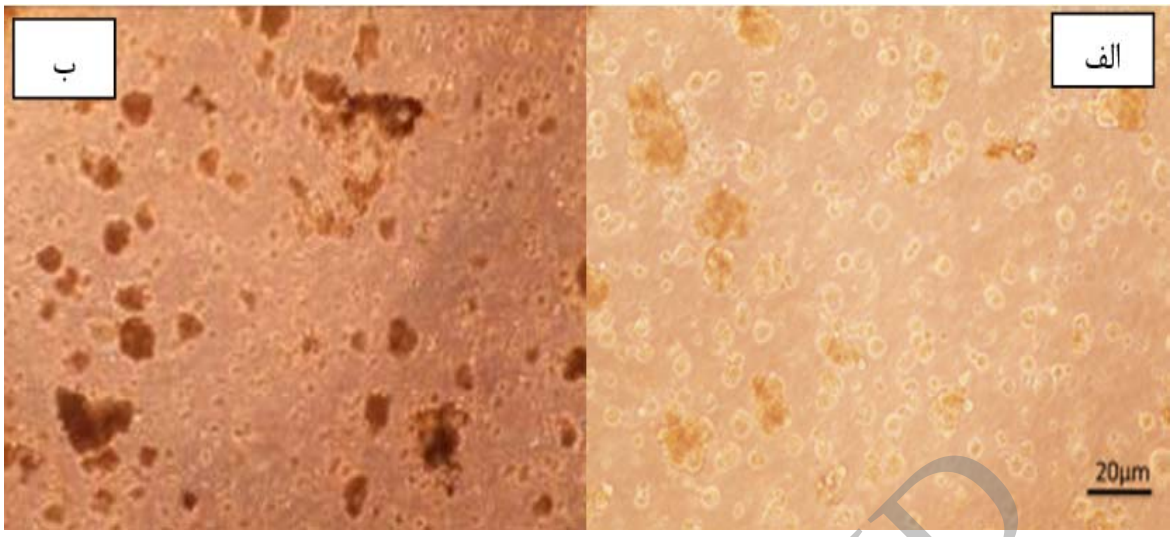
برای بررسی تغییرات تعداد سلول‌های جزایر طی مدت ۱۵ روز، از روش شمارش سلولی با لام نئوبار استفاده شد. برای شمارش سلولی پس از تریپسینه کردن سلول‌ها و تهیه سوسپانسیون سلولی، ۵۰ میکرولیتر از آن را برداشته و ۵۰ میکرولیتر تریپان بلو ۰/۴٪ به آن اضافه شد (فاکتور رقت $2^{-2}=$). سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول فوق برداشته شد و به لام هموسیتومتر (نئوبار) در زیر لامل منتقل شد. سلول‌های زنده به دلیل سالم بودن غشاء سلولی از ورود رنگ به داخل جلوگیری می‌کنند، ولی سلول‌های مرده به رنگ آبی و با اندازه درشت‌تر مشاهده شدند.

تحلیل آماری

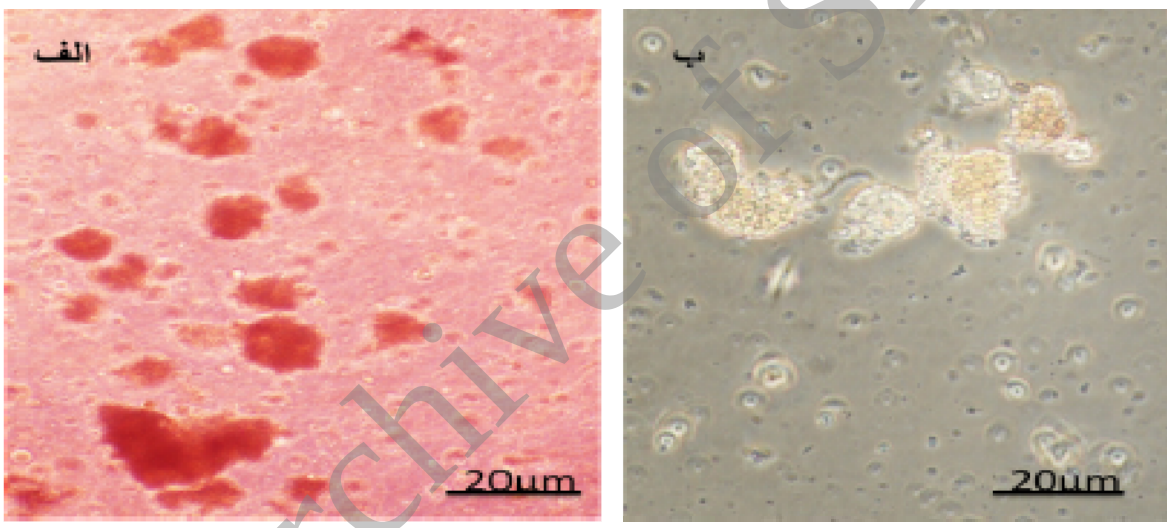
داده‌ها توسط نرم افزار SPSS و به وسیله آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و پساآزمون Tukey تحلیل شدند. $P<0/05$ به عنوان اختلاف آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. سلول‌های جزایر لانگرهانس پانکراس جدا شده از موش. الف) بلافاصله پس از استخراج. در روز اول، سلول‌ها حالت کروی و شفاف دارند و به صورت معلق دیده می‌شوند. ب) سلول های جزایر لانگرهانس استخراج شده چند روز پس از کشت وارد مرحله آپوپتوز می شوند.



شکل ۲. تصویری از جزایر لانگرهانس که با رنگ اختصاصی دیتیزون رنگ آمیزی شده است. الف)گروه آزمایش: سلول های قرمز رنگ یا دیتیزون مثبت نشان دهنده جزایر لانگرهانس هستند. ب)گروه کنترل منفی: نمونه سلول های کنترل که بدون رنگ آمیزی هستند.

Archive of SID

یافته‌ها

بررسی مورفولوژی جزایر

سلول‌های جزایر لانگرهانس پانکراس از موش بالغ سوری نـژاد NMRI به دست آمدند. این سلول‌ها دارای قابلیـت کشـت در محیط مخصوص به خود و نگهـداری در شـرایط آزمایشـگاهی هستند. در ابتدای استخراج، سلول‌ها کروی شـکل، بـا حاشـیه مشخص و شفاف بودند که به صورت شناور در ظـروف کشـت مشاهده شدند (شکل۱-الف). با گذشت زمان حالـت شـفاف و روشن خود را از دست داده و تیـره شـده و کـم کـم از حالـت توده‌ای شکل خارج شدند کـه نشـان دهنـده ورود بـه مرحلـه آپوپتوز است (شکل۱-ب).

بررسی رنگ آمیزی DTZ

برای اثبات اینکه توده‌های استخراج و کشت شده همان جزایر لانگرهانس هستند، با رنگ دیتیزون رنگ آمیـزی شـدند و بـر اساس نتایج حاصل تقریبا تمامی توده‌هـای حاصـله بـه رنـگ قرمز خونی در آمدند که تایید کننـده اسـتخراج جزایـر اسـت (شکل۲). در روزهای ابتدایی، کلیه جزایر رنگ آمیزی شـدند، ولی با گذشت زمان شدت رنگ گیری جزایر نیز کاهش یافت.

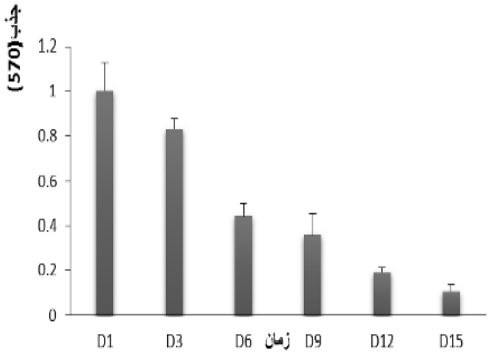
www.SID.ir

بقای جزایر لانگرهانس در شرایط کشت آزمایشگاهی

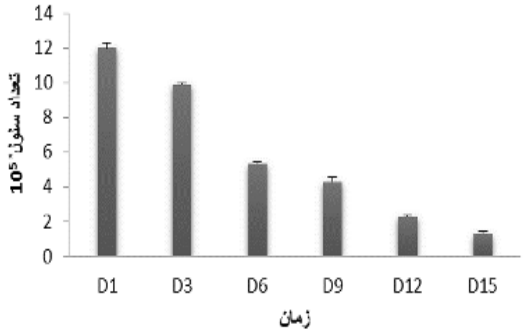
جزایر لانگرهانس استخراج شده به مدت ۱۵ روز در شرایط آزمایشگاهی کشت شدند و در روزهای معینی از نظر میزان بقا بررسی شدند. بر اساس نمودار ۱ می توان نتیجه گرفت که در روزهای آغازین (D1) میزان حداکثری جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر مشاهده شد که حدودا ۱/۲ بود که با گذشت زمان این میزان کاهش یافت، به طوری که در روز سوم (D3) میزان جذب نزدیک به ۰/۸، در روز ششم (D6) ۰/۶، در روز نهم (D9) نزدیک به ۰/۴ و در روزهای دوازدهم (D12) و پانزدهم(D15) به ترتیب ۰/۲ و ۰/۱ بود (نمودار ۱). نتایج نشان می‌دهد که میزان بقا و ماندگاری جزایر با گذشت زمان به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد.

بررسی تعداد سلول‌ها

با گذشت زمان با توجه به کاهش بقا، تعداد سلول های جزایر نیز کاهش پیدا کرد. هر چه مدت زمان کشت افزایش می‌یافت، از میزان بقا و تعداد سلول‌ها کاسته می‌شد (نمودار ۲). همان طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، در روزهای آغازین پس از استخراج، تعداد سلول‌ها در حدود $۱/۲\times۱۰^{۶}$ بود و هرچه زمان نگهداری سلول‌ها در محیط کشت افزایش می‌یافت، تعداد سلول‌ها کم می‌شد، به طوری که در روز پانزدهم (D15) به حدود ۲×۱۰^{۵} عدد رسید.



نمودار ۱. نمودار بقای جزایر لانگرهانس. جذب سلول‌های جزایر پانکراسی در طول موج ۵۷۰nm انجام گرفته است.



نمودار ۲. شمارش سلول‌های جزایر در طی ۱۵ روز

بحث

در این پژوهش، جزایر لانگرهانس موش بالغ جداسازی شد و بقا و تکثیر آنها در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که با گذشت یک هفته از استخراج جزایر، میزان از بقا و عملکرد آنها کاسته می‌شود. از آن جایی که محققین، از این جزایر برای درمان بیماری دیابت و در روش هم کشتی استفاده می کنند، بررسی میزان بقای این سلول ها در شرایط محیط کشت ضروری به نظر می‌رسد آید. با توجه به محدودیت‌های موجود در درمان دیابت، به نظر می‌رسد استفاده از سلول‌های بنیادی بالغ و سلول‌های بنیادی جنینی که توانایی تمایز به سلول‌های بتای پانکراس را دارند، می‌تواند به عنوان روش درمانی جدیدی در نظر گرفته شود (۱۰). تحقیقات نشان داده‌اند که تزریق عصاره پانکراس به حیوان دیابتی باعث کاهش موقت قند خون و کاهش ترشح قند در ادرار می‌شود.

تا به امروز تحقیقات بسیاری در زمینه درمان دیابت صورت گرفته است و روش‌های درمانی مختلفی در این راستا پیشنهاد شده است. یکی از روش‌های درمانی، تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های مولد انسولین از طریق هم کشتی با جزایر پانکراس است. از این رو، بررسی میزان بقا و میزان تکثیر این جزایر در شرایط آزمایشگاهی امری مهم و اجتناب ناپذیر است (۱۱).

تکوین سلول‌های بتا به مسیرهای پیام رسانی، فاکتورهای رونویسی تنظیم کننده تمایز سلول و فاکتورهای ترشح شده از بافت‌های اطراف نیاز دارد (۱۲). چندین فاکتور ترشحی طی مراحل اولیه تکوین پانکراس ترشح می‌شوند. از این فاکتورها می‌توان رتینوئیک اسید، اکتیوین A و fgf را نام برد (۱۸ و۱۳). مطالعات پژوهشی نشان داده‌اند که افزایش غلظت اکتیوین A باعث القای بیان ژن‌های PDX-1، انسولین و گلوکاگون می‌شود. این فعال سازی، به علت اثر مستقیم اکتیوین A در تحریک تمایز سلول‌های مزانشیمی پانکراس است (۱۴و ۱۹). رتینوئیک اسید برای القای بیان ژن PDX-1 در جوانه‌های آندودرمی پانکراس کافی است (۱۵و ۲۰). به نظر می‌رسد روش هم کشتی سلول‌های بنیادی با جزایر لانگرهانس فاکتورهای لازم برای تکوین و تمایز به سمت سلول های بتا را تا حدود زیادی فراهم می‌آورد؛ پس می‌توان از روش هم کشتی به عنوان یک روش کارامد و مقرون به صرفه در شرایط آزمایشگاهی بهره گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

Mansouri و همکارانش عصاره پانکراس موش صحرایی بالغ را روی تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی به منظور بررسی تمایز سلول های انسولین ساز استفاده کردند. آنها با استفاده از رنگ آمیزی دیتیزون سلول-های تمایز یافته و تمایز نیافته را از هم تمیز دادند (۱۷). در سلول‌هایی که با غلظت ۵۰ میکرو گرم بر میلی لیتر عصاره تیمار شده بودند، تعداد سلول‌های قرمز رنگ اندکی دیده می‌شد. به ترتیب هر چه بر میزان عصاره افزوده شد، تعداد سلول‌های قرمز رنگ بیشتری دیده شد. آنها مشاهده کردند که در غلظت ۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر تعداد سلول‌های قرمز رنگ بیشتر است و سلول‌های تمایز یافته بیشتری نسبت به سلول‌های گروه کنترل منفی مشاهده می‌شود (۱۷).

Phillips و همکارانش در سال ۲۰۰۷ از تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسانی (hESc)، سلول‌های آندودرم پانکراسی را تولید کردند که با تولید اجسام شبه جنینی در محیط کشت سه بعدی و در حضور Activin و Bmp4 سلول‌های اندودرم اولیه را به دست آوردند. این فاکتورها زمینه مناسبی را برای رشد، تکثیر و تمایز سلول‌های hES به سلول‌های پانکراسی مهیا می‌کنند (۱).

Karaoz و همکارانش در سال ۲۰۱۰ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان را با سلول‌های جزایر لانگرهانس تحت شرایط استاندارد هم کشتی دادند و سپس با استفاده از روش ELIZA مشاهده کردند که نسبت به نمونه کنترل، میزان ترشح انسولین افزایش یافت که نشان دهنده آزاد شدن سیگنال‌های تمایزی به وسیله جزایر لانگرهانس است که بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی تاثیر می‌گذارد (۲). همچنین Bhaiji و همکارانش در سال ۲۰۱۲ سلول‌های رده MIN6 بتای پانکراس را با سلول‌های مزانشیمی هم کشتی دادند که مشاهده کردند علاوه بر افزایش بقای جزایر سبب افزایش میزان ترشح انسولین تولیدی می‌شود (۳). به علاوه، Kasahara و همکارانش در سال ۲۰۱۳ از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در جهت فعال سازی جزایر لانگرهانس استفاده کردند و مشاهده کردند که سیگنال‌هایی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترشح می‌شود که توانایی فعال سازی جزایر در جهت ترشح انسولین را دارد (۲۱). در همین راستا، Wang و همکارانش در سال ۲۰۱۳ سلول‌های مزانشیمی مشتق از ژله وارتون بند ناف انسان را با سلول‌های پانکراس موشی هم کشتی دادند. نتایج حاصل از کار آنها نشان داد که غلظت انسولین و C-Peptid در نمونه کنترل افزایش یافت. سپس این سلول‌ها را به موش مبتلا به دیابت تزریق کردند و سطح پایینی از گلوکز خون را در موش مشاهده کردند (۲۱).

با این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت جزایر لانگرهانس را می‌توان از پانکراس موش بالغ جدا کرده، در محیط کشت و در زمان معین و محدودی نگه داری کرد. به علاوه، اگر این سلول‌ها را به مدت ۱۵ روز کشت دهیم، در روزهای آغازین پس از استخراج، بقای سلول‌ها بیشتر است و با گذشت حدود یک هفته، بقا و عملکرد آنها به حداقل می‌رسد. از آنجایی که این جزایر در سلول درمانی در جهت درمان دیابت استفاده می‌شوند، برای عملکرد بهتر این سلول‌ها در شرایط کشت آزمایشگاهی، باید به مدت زمان هم کشتی این جزایر با سلول‌های دیگر دقت کرد.

تشکروقدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی جندی شاپور اهواز که امکان اجرای این طرح را فراهم کردند، تشکر و قدردانی بسیاری می‌کنند.

REFERENCES

1. Philips BW, Henteze H, Rust WL, Chen QI, et all. Directed differentiation of human embryonic stem cells into the pancreatic endocrine lineage. J Stem Cells 2007;16:561-78.

2. Karaoz E, Genc Zs, Demircan Pc, Akson A, Duruksu G. Protection of rat pancreatic islet functio and viability by coculture with rat bone marrow-derive mesenchymal stem cells. J Cell Death 2010;9:17-23.

3. Bhaiji T, Zhi ZL, Pickup JC. Improving cellular function and immune protection via layer-by-layer nanocoating of pancreatic islet b-cell spheroids cocultured with mesenchymal stem cells. J Biomed Mater Res 2012;100:1628-36.

4. Karaoz E, Ayhan S, Kcu A , Aksoy A. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells co-cultured with pancreatic islets display β cell plasticity. J Tissue Eng Regen Med 2011;5:491-500.

5. Murry CE, Keller G. Differentiation of Embryonic stem cells to clinically relevant populations lessons from embryonic development. Cell 2008;132:661-80.

6. Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, Jia L, Wu N, Yan Y, et al. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. Cell 2008;135:1299-310.

Archive of SID

www.SID.ir

7. Buehr M, Meek S, Blair K, Yang J, Ure J, et al. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. Cell 2008;135: 1287-98.

8. Xu X, Browning VL, Odorico JS. Activin, BMP and FGF pathways cooperate to promote endoderm and pancreatic lineage cell differentiation from human embryonic stem cells. Mech Dev 2011;128:412-27.

9. Borowiak M, Maehr R, Chen S, Cheno AE, Tang W, Fox JL. Small molecules efficiently direct endodermal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. Cell Stem Cell 2009;4:348-58.

10. Smukler R, Arntfeild E, Razavi R, Bikopoulos G, Karpowicz Ph, Seaberg R. The adult mouse and human pancreas contain rare multipotent stem cells that express insulin. Cell Stem Cell 2011;8:281-293.

11. Bar-Nur O, Russ AH, Efrat Sh, Vensity B. Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. Cell Stem Cell 2011;9:17-23.

12. Murtaugh CL. Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible. Development 2007;134:427-38.

13. Friel R, Van der sar S, Mee PJ. Embryonic stem cells: Understanding their historycell biology and signalling. Adv Drug Deliv Rev 2005;1894-903.

14. Conley BJ, Young JC, Trounson AO, Mollard R. Derivation. propagation and differentiation of human embryonic stem cells. Int J Biochem Cell Biol 2004;36:555-67.

15. Spence JR, Wells JM. Translational embryology: Using embryonic principles to generate pancreatic endocrine cells from embryonic stem cells. Dev Dyn 2007;236:3218-27.

16. Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz J. Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. Stem Cell 2004;22:265-74.

17. Mansouri-Bidekani A, Esmaeili F, Houshmand F, Hajisharifi Z. Evaluation of pdx-1 gene expression in insulin producing cells, derived from embryonal carcinoma stem cells. J Shahrekord Univ Med Sci 2013;15:91-102. [In Persian]

18. Jafary H, Larijani B, Farrokhi A, Pirouz M, Mollamohammadi S, Baharvand H. Differential effect of activin on mouse embryonic stem cell differentiation in insulin-secreting cells under nestin-positive selection and spontaneous differentiation protocols. Cell Biolo Int 2008;32:278-86.

19. Mfopou JK, Geeraerts M, Dejene R, Van LS, Aberkane A, Van Grunsven LA, et al. Efficient definitive endoderm induction from mouse embryonic stem cell adherent cultures: A rapid screening model for differentiation studies. Stem Cell Res 2014;12:166-77.

20. Scuteri A, Donzelli E, Rodriguez V, Ravasi M, Monfrini M,. Bonandrini B, et al. A double mechanism for the mesenchymal stem cells positive effect on pancreatic islets. PLoS One 2014;9:e84309.

21. Kasahara N, Teratani T, Doi J, Iijima Y, Maeda M, Uemoto Sh, et al. Use of mesenchymal stem cell-conditioned medium to activate islets in preservation solution. Cell Med 2013;5:71-85.

22. Wang G, Li Y, Wang Y, Dong Y, Wang FS, Ding Y, et al. Roles of the co-culture of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells with rat pancreatic cells in the treatment of rats with diabetes mellitus. Exp Ther Med 2014;8:1389-96.

Archive of SID

www.SID.ir