تمایز مونوسیت‌های خون محیطی رت به سلول‌های سازنده انسولین تحت تاثیر عصاره پانکراسی رت در شرایط آزمایشگاهی

فاطمه تنهای کلاته سبز[1*]
فرح فرخی،[2] نوروز دلیرژ،[3]
شهرام جوادی،[4] حوا چاپاری[1]

۱- گروه بافت شناسی، جنین شناسی، گروه زیست شناسی
۲- گروه زیست شناسی
دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۳- گروه ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۴- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه ،ارومیه، ایران.

* نویسنده مسئول: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی
تلفن: ۰۹۱۵۱۲۰۵۸۴۷
email: fateme.1694@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۱/۳۱

چکیده

زمینه و هدف: سلول درمانی یکی از روش‌های درمانی امیدوارکننده برای دیابت نوع ۱ می‌باشد، مونوسیت خون محیطی دارای قابلیت تمایززدایی و دسترسی آسان در مقایسه با سلول‌های بنیادی می‌باشد، هدف از مطالعه حاضر بررسی امکان تمایز مونوسیت‌های خون محیطی رت به سلول‌های سازنده انسولین تحت تاثیر عصاره پانکراسی (دو روز بعد از ۶۰٪ پانکراتومی) می‌باشد. ***روش بررسی:*** مونوسیت‌ها از خون محیطی رت جدا شده و کشت می‌شوند. مونوسیت‌ها به مدت شش روز در محیط کشت تمایززدایی در حضور M-CSF و IL-3 و بتا مرکاپتواتانول کشت داده شدند. سلول‌ها تمایززدایی شده و به سلول‌های قابل برنامه‌ریزی (PCMOs) تبدیل شدند. سلول‌های تمایززدایی شده زیر میکروسکوپ معکوس بررسی شدند. کشت سلول‌های حاصل از تمایززدایی (PCMOs) به مدت ۱۵ روز در محیط کشت RPMI حاوی عصاره پانکراسی، گلوکز و۱۰٪ FBS ادامه پیدا می‌نمود و هر سه روز محیط کشت تعویض می‌شد. غلظت انسولین و پپتید- c ترشح شده مورد سنجش رادیوایمونواسی قرار گرفت. تولید انسولین این سلول‌ها با رنگ دیتیزون (DTZ) که به‌طور اختصاصی انسولین را رنگ می‌کند مورد بررسی قرار گرفت. ***یافته ها:*** سلول‌هایی که در محیط حاوی عصاره پانکراسی کشت شدند به طور معنی‌داری قادر به تولید و ترشح انسولین و پپتید- c بودند (P<۰/۰۵). رنگ‌آمیزی اختصاصی با دیتیزون (DTZ) نیز تولید انسولین توسط این سلول‌ها را تایید کرد. ***نتیجه‌گیری:*** براساس نتایج به‌دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که مونوسیت‌های خون محیطی رت تحت درمان عصاره پانکراسی توانایی تمایز به سلول‌های سازنده انسولین را دارند که می‌تواند گامی در جهت سلول درمانی دیابت باشد.

کلمات کلیدی: مونوسیت خون محیطی، عصاره پانکراسی رت، سلول‌های سازنده انسولین.

مقدمه

دیابت قندی (Diabetes Mellitus (DM یک اختلال متابولیکی شایع است، که ۵- ۲ درصد جمعیت بزرگسال در کشورهای توسعه یافته به آن مبتلا هستند. بر اساس ارقام جهانی به‌دست آمده ۱۳۰ میلیون نفر در سال ۲۰۰۰ به این بیماری مبتلا بودند و این رقم تا سال ۲۰۲۵ به ۳۰۰ میلیون نفر می‌رسد. دیابت ملیتوس به طور گسترده به دو نوع اصلی تقسیم می‌شود. دیابت نوع ۱ (دیابت وابسته به انسولین) اختلالی است که با تخریب خود ایمن سلول‌های مولد انسولین در پانکراس مشخص می‌شود. دیابت نوع ۲ (دیابت غیر وابسته به انسولین) تحت تاثیر عواملی هم‌چون مقاومت بافت‌های محیطی به اثرات انسولین تا عملکرد ناصحیح سلول‌های بتای پانکراس ناشی می‌شود.[1-3] درمان متداول دیابت نوع ۱ بر تزریق روزانه انسولین تکیه دارد. هم‌چنین جایگزینی سلول‌های بتای پانکراسی از اهداف درمانی چندین دهه برای کاهش میزان مرگ و میر و پیشرفت دیابت نوع ۱ بوده است. پیوند سلول‌های بتای مولد انسولین به شکل پانکراس کامل یا جزایر لانگرهانس جداشده، گزینه درمانی امیدوارکننده‌ای برای درمان این بیماری است.[4] این موضوع به سبب کمبود نسبی اهدای پانکراس، محدودیت در تخلیص جزایر از جسد به مقدار کافی و نیز مسایل مربوط به پیوند نظیر خطر انتقال عفونت یا پس زدن پیوند همواره مشکل بوده است.[5] از این رو منابع جدید برای درمان جایگزینی سلول β نظیر استفاده از سلول‌های بنیادی و ژن یا سلول درمانی، علاوه بر موارد ذکر شده مورد بررسی

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-18]

قرار گرفته‌اند. استفاده از سلول‌های بنیادی که دارای قدرت تکثیر و تمایز به سلول‌های انسولین ساز هستند، شاید بتواند نقص عملکرد سلول‌های بتا را به طور کامل و همیشگی جبران نماید.[۶] سلول‌های بنیادی، سلول‌های تمایز نیافته هستند که قدرت تکثیر نامحدودی داشته و می‌توانند تحت تاثیر شرایط فیزیولوژیک خاص و یا در حضور فاکتورهای ویژه، القا شده و به انواع سلول‌های تخصص یافته تمایز یابند.[۷] سلول‌های بنیادی بر اساس منشا به دو گروه اصلی سلول‌های بنیادی جنینی و بالغ طبقه‌بندی می‌شوند. سلول‌های بنیادی جنینی یکی از منابع سلولی برای ایجاد سلول‌های مولد انسولین می‌باشند. اما دارای یک‌سری موانع مانند تولید پایین انسولین، میزان بالای آپوپتوز و مشکلات اخلاقی که استفاده از این سلول‌ها را محدود کرده است.[۸و۶] سلول‌های بنیادی بالغ یکی از منابعی که برای سلول درمانی مورد مطالعه قرار گرفته است، که در برخی از بافت‌های بالغ از جمله پوست، سلول‌های خونی، اپیتلیوم روده، بافت کبد و غیره یافت می‌شوند.[۹] جمعیت سلول‌های بنیادی بزرگ‌سال پرتوان (Pluripotent) و چند توان (Multipotent) توانایی تمایز به سه لایه جنینی را دارند، از جهتی استفاده از این سلول‌ها به خاطر میزان اندک آن‌ها، کمبود مارکر خاص و تکثیر سخت در محیط کشت، به دوره‌های طولانی جهت تهیه سلول‌های کافی برای کاربرد کلینیکی نیاز دارد. هم‌چنین سلول‌های بنیادی خاص بافت‌ها ظرفیت محدودی برای تمایز دارند.[۱۰] نحوه استخراج این سلول‌ها هم مشکلات فراوانی به همراه دارد، در بسیاری از مطالعات آزمایشگاهی (In vitro) سلول‌های بنیادی تحت تیمار از بیماران دیابتی دریافت نشده و پیوند آن‌ها به طور اجتناب ناپذیری رد می‌شود.[۱۴] مونوسیت‌ها سلول‌های تک هسته‌ای موجود در خون می‌باشند که توانایی تمایز به ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک را دارند.[۱۱] این سلول‌ها اگر در شرایط تمایززدایی قرار گیرند به سلول‌های قابل برنامه‌ریزی تبدیل می‌شوند که در شرایط مناسب در حضور فاکتورهای رشد به سلول‌های تولید کننده انسولین و سلول‌های کبد[۱۰] و کندروسیت[۱۷] تبدیل می‌شوند. در مطالعات پیشین سلول‌های بنیادی (سلول‌های مزانشیم رت) تحت تاثیر عصاره پانکراسی در حال بازسازی به سلول‌های پانکراتیک تبدیل شدند. هدف ما در این تحقیق القاء تولید سلول‌های سازنده انسولین از مونوسیت‌های خون محیطی رت در حضور عصاره پانکراسی حاصل از ترمیم بعد از ۴۸ ساعت است، این عصاره دارای هورمون‌ها و فاکتورهای رشد جهت تمایز است. در این تحقیق نشان دادیم مونوسیت‌های خون محیطی رت تحت تاثیر عصاره پانکراسی توانایی تمایز به سلول‌های سازنده انسولین را دارا هستند.

روش بررسی

این مطالعه به صورت تجربی- پژوهشی در پژوهشکده زیست فن‌آوری دانشگاه ارومیه به صورت آزمایشگاهی (In vitro) از بهمن سال ۱۳۸۸ تا بهمن ۱۳۸۹ صورت گرفت. از رت‌های نژاد ویستار هشت هفته‌ای با متوسط وزن ۱۵۰ گرم استفاده گردید. این رت‌ها از حیوان خانه دانشکده علوم دانشگاه ارومیه تهیه شدند. در تمامی مراحل از محیط کشت RPMI-1640(Sigma) که به آن ۲mM، L- گلوتامین (Sigma)، ۱۰۰U/ml پنی‌سیلین (Sigma)، ۱۰۰µg/ml استرپتومایسین (Sigma) و ۱۰٪ FBS(Gibco) اضافه شده بود، استفاده گردید. در این مطالعه از سایتوکین‌ها و فاکتورهای رشد Rat M-CSF (ProSci Incorporated) Rat IL-3 beta (ProSci)، β- Mercaptoethanol (Sigma)، استفاده گردید.

تهیه سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC): به منظور به دست آوردن سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی، ابتدا رت‌های مورد نظر با ماده بیهوشی کلروفرم بیهوش شدند، قلب رت‌ها خون‌گیری شده و هپارینه شد. از هر رت ۶mm–۵ خون گرفته شد. مقدار ۵ml خون هپارینه (۲۰۰U/ml) با ۵ml PBS رقیق گردید، محلول خون و PBS به آرامی بر روی هیستوپک (Sigma) که حجم آن برابر خون رقیق نشده بود قرار گرفت. مجموعه خون رقیق شده و هیستوپک با سرعت ۴۰۰×g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی که در حد فاصل هیستوپک و خون رقیق شده قرار داشت جمع شده در مرحله بعد به منظور حذف هیستوپک از PBMC با سرعت ۲۵۰×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سلول‌های حاصل مجدداً به منظور حذف پلاکت‌های همراه آن با سرعت ۲۵۰×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. تعداد و میزان زنده بودن سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی به‌دست آمده با استفاده از رنگ تریپان بلو (Loba chemie) و هموسایتومتر تعیین گردید. سلول‌های تک هسته‌ای در پلیت شش خانه‌ای در محیط حاوی RPMI (۱۶۴۰) ریخته و به منظور جداسازی مونوسیت‌ها از PBMC به مدت دو ساعت در دمای $37^{\circ}C$، ۵٪ CO_2 و ۹۰٪ رطوبت

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-18]

انکوبه شد و مونوسیت‌ها به خاطر چسبندگی به کف پلیت چسبیده و بقیه سلول‌ها از محیط حذف شدند.[۲۰]

تهیه عصاره پانکراسی: از رت‌های نژاد ویستار هشت هفته‌ای استفاده شد، رت‌هایی که به مدت یک شبانه روز غذا دریافت نکرده بودند، با تزریق داخل صفاقی (IP) داروهای بیهوشی کتامین -HCL ketamine-HCL (۵۰mg/ml Alfasan Holland) و سدیم پنتوباربیتال Sodium pentobarbital (۵۰mg/ml Lundbeck USA) بیهوش شده طی عمل جراحی تقریبا تمام بخش طحالی پانکراس برداشته شد (۶۰٪) و بخش مزانتریک سالم نگه داشته شد. بعد از ۴۸ ساعت رت قطع نخاعی شده، فورا تشریح و پانکراس ترمیمی جمع‌آوری شد، بافت مورد نظر وزن شده و سریعاً در فسفات بافر سالین (PBS) خنک همراه با پروتئاز مهار کننده (کوکتیل Sigma) قرار داده شد. تمام مراحل در محیط خنک انجام گرفت. در مرحله بعد بافت مورد نظر هموژنیزه گردید. بافت هموژنیزه را طی دو مرحله در دستگاه سانتریفوژ قرار داده، مرحله اول ۳۰۰۰ دور در ۱۰ دقیقه در دمای ۴ °C و مرحله دوم ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه. در پایان مایع رویی شفاف که همان عصاره مورد نظر است جمع‌آوری شد، برای سنجش غلظت پروتیین عصاره از روش برادفورد استفاده شده و غلظت پروتیین عصاره اندازه‌گیری می‌شود. عصاره تهیه شده در یخچال ۸۰ °C- برای استفاده‌های بعدی قرار داده می‌شود.[۱۹]

قرار دادن مونوسیت‌ها در معرض مواد القاء کننده تمایز زدایی: به منظور تمایززدایی مونوسیت‌ها، ۶×۱۰^{۵} سلول در هر چاهک از پلیت شش خانه‌ای قرار گرفت مونوسیت‌های چسبیده به کف فلاسک در محیط RPMI حاوی ۱۰٪ FCS، MCSF(۵ng/ml)، IL-3 (۰/۴ng/ml) و β-mercaptoetanol(۱۴۰µmol/L) به مدت شش روز قرار گرفت. بعد از این شش روز مونوسیت‌ها تحت تاثیر این مواد به یک سری سلول‌های قابل برنامه‌ریزی با منشا مونوسیت (PCMOs) تبدیل شدند.[۱۰-۱۷]

قرار دادن سلول‌ها (PCMOs) در معرض مواد القاء کننده تمایز PCMOs: به منظور تمایز به سمت سلول‌های سازنده انسولین به مدت ۱۵ روز در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪FCS در حضور عصاره پانکراسی با غلظت ۲۰۰µg/ml و (۵mmol/L) گلوکز قرار گرفتند محیط کشت هر سه روز یک بار با محیط کشت حاوی مواد تمایزی تعویض می‌شد.

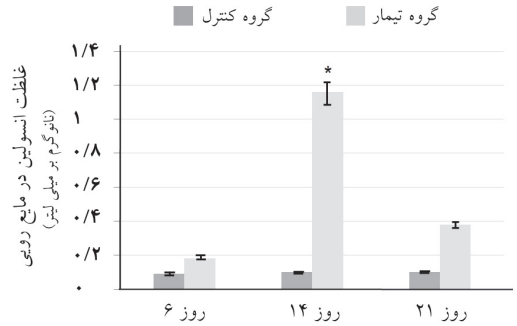
رنگ‌آمیزی اختصاصی با دیتیزون (DTZ): رنگ‌آمیزی دیتیزون روشی است که به طور اختصاصی سلول‌های تولید کننده انسولین را شناسایی می‌کند.[۱۲-۱۴] رنگ DTZ (Merck, Germany)، روی را شناسایی می‌کند و این عنصر برای بسته‌بندی انسولین ضروری است و می‌تواند سلول‌های β که دارای محتوای انسولین بالایی هستند را به رنگ قرمز در آورد. بدین منظور ابتدا ۱۰mg از پودر دیتیزون در یک میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) حل گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۵ °C- نگهداری شد. پس از این مدت به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت موجود در هر خانه از پلیت شش خانه‌ای، ۱۰µl از این رنگ اضافه شد. در مرحله بعد این سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور قرار داده شدند. پس از طی این مدت محیط کشت خانه‌ها خارج شد و سلول‌ها به آرامی سه مرتبه با PBS شسته شدند، در مرحله آخر نیز به هر خانه ۲ml محیط کشت اضافه گردید و سلول‌ها در زیر میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفته و از آن‌ها عکس‌برداری به عمل آمد. دیتیزون گرانول‌های انسولین را به‌طور اختصاصی رنگ می‌کند.[۲۱]

رادیوایمونواسی: برای سنجش میزان انسولین و پپتید- c، حدود ۱ml مایع رویی (Supernatant) سلول‌های تیمار و شاهد در روزهای ۶، ۱۴، ۲۱ بعد از ۶۰ دقیقه در حضور ۲۰mmol/L گلوکز جمع‌آوری شد و با کیت RIA (MILLIPORE) طبق دستورالعمل کیت مورد سنجش قرار گرفت و توسط دستگاه Gamma counter (PerkinElmer life sciences) میزان انسولین و پپتید- c رادیواکتیویته اندازه‌گیری شد. تمامی مراحل آزمایش سه بار تکرار شد و داده‌ها به صورت Mean±SD بیان شدند. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way Analysis of Variance (ANOVA)، نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۶ و Tukey's test (آزمون اختلاف حقیقی که به‌طور مخفف HSD نامیده می‌شود) استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها مقدار (P<۰/۰۵) معنی‌دار در نظر گرفته شد، هم‌چنین ترسیم نمودارها در نرم‌افزار Microsoft Excel (۲۰۰۷) انجام گرفت.

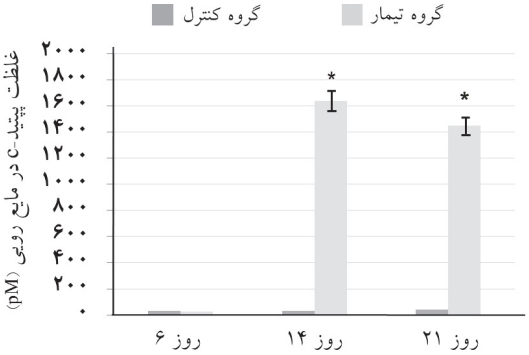
یافته‌ها

بررسی تغییرات مورفولوژیکی: در این تحقیق به منظور تمایز زدایی مونوسیت‌های خون محیطی رت از سایتوکین‌های MCSF، IL-3 و از β مرکاپتواتانول استفاده گردید. این سلول‌ها در زیر میکروسکوپ

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-18]



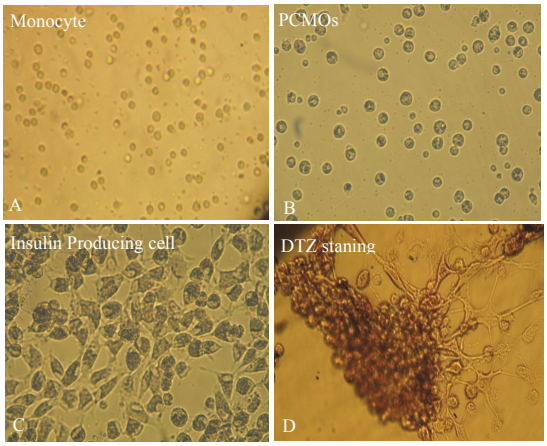
نمودار- ۱: میزان ترشح انسولین حاصل مایع رویی در روزهای مختلف. *داده‌ها به صورت Mean±SD (P<۰/۰۵) ارایه شد.



نمودار- ۲: میزان ترشح پپتید- c در مایع رویی (pM). ارایه شد. *داده‌ها به صورت Mean±SD (P<۰/۰۵) ارایه شد. بر اساس نتایج نمودار میزان پپتید- c در مایع رویی نشان‌دهنده تولید انسولین و آزادسازی پپتید- c می‌باشد.

معکوس بررسی شدند. مونوسیت‌های رت ظاهری کروی و کوچک دارند بعد از شش روز از القاء تمایزدایی، از لحاظ اندازه و تعداد افزایش پیدا کردند، بعد از دو هفته از القاء تمایز در حضور عصاره پانکراسی به سلول‌های تولید کننده انسولین تبدیل شدند. طی دوره تمایز سلول‌های کروی شکل گرفته و از حالت کروی به شکل سه بعدی کروی تبدیل می‌شوند و تجمع سلولی خوشه انگوری پیدا می‌کنند شکل ۱ تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها را نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی: DTZ رنگی است که به یون روی موجود در مولکول انسولین در سلول متصل می‌شود و آن‌ها را به رنگ قرمز در می‌آورد.[۱۲] بر این اساس دیتیزون می‌تواند به طور اختصاصی سلول‌های بتا را که دارای محتوی انسولین بالایی هستند رنگ کرده و آن‌ها را به رنگ قرمز در آورد. در پایان مرحله تمایز نهایی، سلول‌ها



شکل- ۱: تغییرات مورفولوژیک و نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی. A: مونوسیت‌های خون محیطی رت. B: تغییرات مورفولوژیک بعد از شش روز از تمایززدایی. C: سلول‌های تمایز یافته بعد از ۲۱ روز. D: اجتماع سلولی رنگ پذیرفته با DTZ

با DTZ رنگ‌آمیزی شدند و توسط میکروسکوپ معکوس مشاهده شدند، سلول‌های حاوی انسولین به صورت اجتماعات سلولی، قرمز رنگ شدند شکل (۱D).

بررسی میزان ترشح انسولین: مهم‌ترین ویژگی سلول‌های بتا در بدن تولید انسولین در پاسخ به گلوکز خون می‌باشد، مقدار انسولین تولید شده به وسیله سلول‌های تمایز یافته بعد از روزهای ۶، ۱۴، ۲۱ مورد سنجش رادیوایمونواسی قرار گرفت و توسط دستگاه شمارش‌گر گاما خوانده شد، هم‌چنین این عمل در مورد گروه کنترل نیز انجام شد. بر اساس نتایج به دست آمده، میزان انسولین موجود در محیط کشت، در روز ۱۴ نسبت به روز شش و ۲۱ دوره تمایزی، تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). میزان ترشح انسولین در روزهای شش، ۱۴ و ۲۱ به ترتیب ۰/۱، ۱/۱۵ و ۰/۴ng/ml بود و گروه کنترل در همین دوره ذکر شده ۰/۰۸، ۰/۰۸و ng/ml۰/۰۹ را نشان داد (نمودار ۱).

بررسی میزان ترشح پپتید- c: به منظور بررسی ظرفیت تولید و ترشح انسولین میزان پپتید- c ترشح شده در دوره تمایز بعد از روزهای شش، ۱۴ و ۲۱ مورد سنجش رادیوایمنواسی قرار گرفت. بر اساس نتایج از ۲۷pM به ۱۶۰۰pM تغییر نشان داد. میزان پپتید- c در روزهای ۱۴ و ۲۱ تفاوت معنی‌داری در سطح (P<۰/۰۵) نسبت به روز شش داشت با توجه به میزان ترشح انسولین و پپتید- c بعد از القاء تمایز، حاکی از آن است که دوره هفت روزه نتایج بهتری را نشان می‌دهد (نمودار ۲).

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-18]

بحث

پیوند سلول‌های بتای مولد انسولین به شکل جزایر و یا پانکراس کامل، گزینه درمانی امیدوارکننده‌ای برای درمان دیابت ملیتوس می‌باشد. در حال حاضر به خاطر کمبود شدید بافت‌های دهنده برای پیوند پانکراس نمی‌توان به طور گسترده از این درمان استفاده کرد.[۱۸] از این رو توجه خاصی به توانایی تمایزی انواع سلول‌های بنیادی و سلول‌های قابل برنامه‌ریزی به سلول‌های سازنده انسولین شده است.[۱۰] مونوسیت‌ها سلول‌های تک هسته‌ای موجود در خون می‌باشند، که توانایی تمایز به ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک را دارند، به خاطر ظرفیت تمایززدایی و هم‌چنین توانایی تکثیر و دسترسی آسان این سلول‌ها نسبت به سلول‌های بنیادی، به طور برجسته برای درمان سلولی اتولوگ در بیماران دیابتی و هپاتوسیتی مورد توجه قرار گرفته است. تمایززدایی این سلول‌ها قبلا توسط Zhao،[۱۳] Pufe[۱۷] و Ruhnke[۱۰] تایید شده. تمایززدایی مونوسیت‌ها بستگی به یک تیمار شش روزه دارد، مونوسیت‌ها در پاسخ به تیمار دو سایتوکین IL-3 و M-CSF، تمایززدایی جزیی شده و تقسیم سلولی شان را از سر می‌گیرند، این سلول‌های قابل برنامه‌ریزی با منشا مونوسیت (PCMOs) می‌تواند به سلول‌های جزیره‌ای و هپاتوسیت تبدیل شوند.[۱۰-۱۷] در این مطالعه از عصاره پانکراس ترمیمی و گلوکز به مدت دو هفته به منظور القاء تمایز استفاده شد، بر اساس مطالعات گذشته ثابت شده است که عصاره پانکراسی حاصل ترمیم دارای یک سری هورمون‌ها و فاکتورهای رشد مختلف است که دارای توانایی تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های سازنده انسولین است.[۱۹] Katdare نشان داد که قطع قسمتی از پانکراس در موش‌های دیابتی، سبب ترمیم پانکراس و درمان دیابت می‌گردد. بنابراین می‌توان به این نتیجه رسید که پانکراس قادر به بازسازی جزایر لانگرهانس است و این امر توسط سلول‌های بنیادی موجود در اپیتلیوم مجاری پانکراس، صورت می‌گیرد. زیرا این سلول‌ها می‌توانند تحت تاثیر فاکتورهای مختلف و ترکیبات ماتریکس خارج سلولی به سلول‌های جزیره‌ای تمایز یابند.[۲۲] Vaca نیز در سال ۲۰۰۵ به این نتیجه رسید که با تاثیر محیط کشت سلول‌های پانکراسی جنینی، بر سلول‌های بنیادی می‌توان آن‌ها را به سلول‌های سازنده انسولین تمایز داد،[۲۳] در این تحقیق، تاثیر عصاره پانکراسی رت با غلظت ۲۰۰ug/ml در تمایز مونوسیت‌های خون محیطی به سلول‌های سازنده انسولین بررسی شد و نتایج به دست آمده نشان داد مونوسیت‌های خون محیطی رت می‌تواند به سلول‌های سازنده انسولین تحت درمان با عصاره پانکراسی تمایز یابند. در این پژوهش علاوه بر ارزیابی مورفولوژیک، میزان انسولین و پپتید- c تولید شده در مایع رویی نیز اندازه‌گیری شد. در ارتباط با روند تمایز مونوسیت‌های خون محیط رت به سلول‌های سازنده انسولین، ارزیابی مورفولوژیک به عمل آمده نشان داد سلول‌های حاصل از تمایز به صورت تجمعات سلولی و دارای زواید و سلول‌ها چند بعدی می‌باشد. در ارزیابی به عمل آمده از رنگ‌آمیزی اختصاصی دیتیزون (DTZ) حضور انسولین در تجمعات سلولی مذکور تشخیص داده شد که این نیز ماهیت سلول‌های تمایز یافته را تایید می‌کند. از طرفی دیگر ارزیابی‌های رادیوایمونواسی به‌عمل آمده در روزهای شش، ۱۴ و ۲۱ جهت سنجش میزان انسولین و پپتید- c که توانایی تولید انسولین را نشان می‌دهد و از ویژگی‌های اساسی سلول‌های جزایر پانکراتیک می‌باشد تایید دیگری بر تمایز این سلول‌ها می‌باشد. مقالاتی که در زمینه تمایز مونوسیت‌های خون محیطی منتشر شده است معدود است در این زمینه می‌توان به Ruhnke اشاره کرد که روش‌های مورد استفاده در آن‌ها با کارایی بالایی مونوسیت‌ها را به سلول‌های شبه پانکراتیک تمایز داد، این محققان سلول‌های پیش‌ساز مونوسیت را در یک دوره ۱۵ روزه در حضور فاکتورهای رشد HGF, EGF به سلول‌های پانکراتیک تمایز دادند،[۱۰] در صورتی که در مطالعه حاضر از عصاره پانکراسی ترمیمی (دو روز بعد از ۶۰٪ پانکراتومی) به منظور القاء تمایز استفاده شد. هم‌چنین این محققان مونوسیت‌های خون محیطی انسان را مورد بررسی قرار داد و در این مطالعه مونوسیت‌های خون محیطی رت مورد بررسی قرار گرفته‌اند. در واقع تاکنون مقاله‌ای در رابطه با تولید سلول‌های انسولین ساز از مونوسیت‌های خون محیطی رت منتشر نشده است. از میان مقالاتی که از عصاره پانکراسی جهت تمایز استفاده کردند می‌توان به Choi اشاره کرد، آن‌ها نیز از عصاره پانکراسی ترمیمی به عنوان عامل تمایزی استفاده کردند و توانستند سلول‌های مزانشیم رت را به سلول‌های سازنده انسولین تبدیل کنند، Choi غلظت‌های متفاوتی از عصاره پانکراسی را بررسی و غلظت ۲۰۰µg/ml را غلظت موثر تمایز گزارش کرد،[۱۹] در این مطالعه نیز از غلظت ۲۰۰µg/ml و هم‌چنین از گلوکز با غلظت (۵mmol/L) استفاده شد. براساس نتایج Choi دو

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-18]

هفته بعد از القاء تمایز میزان انسولین ترشح شده ۰/۶ng/ml بود. در تحقیق حاضر بعد از یک هفته تمایز میزان انسولین ترشحی ۱/۱۴ng/ml بود. بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت سلول‌های پیش‌ساز با منشا مونوسیت تحت القاء عصاره پانکراسی در مقایسه با سلول‌های مزانشیم توانایی تمایزی بهتری دارد و دوره تمایزی کوتاه‌تری را طی می‌کند. در این تحقیق گلوکز با غلظت (۵mmol/L) استفاده شد، در تحقیقات پیشین از غلظت‌های بالاتری جهت تمایز استفاده شده است،[۶] براین اساس نمی‌توان دلیل دوره کوتاه تمایز را به گلوکز نسبت داد. مجموعه مشاهدات، بیانگر تاثیر مثبت حضور عصاره پانکراسی حاصل ترمیم بر روند تمایز سلول‌های پیش‌ساز مونوسیت به سلول‌های انسولین ساز بود که این امر با گزارش‌های قبلی مبنی بر تاثیر عصاره پانکراسی بر تمایز انواع دیگری از سلول‌ها، مطابقت داشت. از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که مونوسیت‌های خون محیطی رت قابلیت تمایز به سلول‌های سازنده انسولین را در حضور عصاره پانکراسی تحت شرایط آزمایشگاهی دارد و می‌تواند گامی در راستای سلول درمانی و تولید سلول‌های سازنده انسولین و درمان دیابت قندی باشد. *سپاسگزاری:* نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از حمایت‌های مالی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه، وزارت علوم، تحقیقات و فن‌آوری و پژوهشکده زیست فن‌آوری دانشگاه ارومیه ابراز می‌دارند.

References

1. Berná G, León-Quinto T, Enseñat-Waser R, Montanya E, Martín F, Soria B. Stem cells and diabetes. *Biomed Pharmacother* 2001;55(4):206-12.
2. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001;414(6865):782-7.
3. Sipione S, Eshpeter A, Lyon JG, Korbutt GS, Bleackley RC. Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cells. *Diabetologia* 2004;47(3):499-508.
4. Blyszczuk P, Wobus AM. Stem cells and pancreatic differentiation in vitro. *J Biotechnol* 2004;113(1-3):3-13.
5. Soria B, Skoudy A, Martín F. From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia* 2001;44(4):407-15.
6. Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, Xia CQ, Litherland SA, Atkinson MA, et al. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes* 2004;53(7):1721-32.
7. Nir T, Dor Y. How to make pancreatic beta cells: prospects for cell therapy in diabetes. *Curr Opin Biotechnol* 2005;16(5):524-9.
8. Vaca P, Martín F, Vegara-Meseguer JM, Rovira JM, Berná G, Soria B. Induction of differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells by fetal soluble factors. *Stem Cells* 2006;24(2):258-65.
9. Berná G, León-Quinto T, Enseñat-Waser R, Montanya E, Martín F, Soria B. Stem cells and diabetes. *Biomed Pharmacother* 2001;55(4):206-12.
10. Ruhnke M, Ungefroren H, Nussler A, Martin F, Brulport M, Schormann W, et al. Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology* 2005;128(7):1774-86.
11. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 2009;325(5940):612-6.
12. Shiroi A, Yoshikawa M, Yokota H, Fukui H, Ishizaka S, Tatsumi K, et al. Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone. *Stem Cells* 2002;20(4):284-92.
13. Zhao Y, Glesne D, Huberman E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(5):2426-31.
14. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, et al. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(14):7999-8004.
15. Latif ZA, Noel J, Alejandro R. A simple method of staining fresh and cultured islets. *Transplantation* 1988;45(4):827-30.
16. Chausmer AB. Zinc, insulin and diabetes. *J Am Coll Nutr* 1998;17(2):109-15.
17. Pufe T, Petersen W, Fändrich F, Varoga D, Wruck CJ, Mentlein R, et al. Programmable cells of monocytic origin (PCMO): a source of peripheral blood stem cells that generate collagen type II-producing chondrocytes. *J Orthop Res* 2008;26(3):304-13.
18. Efrat S. Beta-cell replacement for insulin-dependent diabetes mellitus. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60(2):114-23.
19. Choi KS, Shin JS, Lee JJ, Kim YS, Kim SB, Kim CW. In vitro trans-differentiation of rat mesenchymal cells into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330(4):1299-305.
20. Mazzucchelli R, Amadio M, Curreli S, Denaro F, Bemis K, Reid W, et al. Establishment of an ex vivo model of monocytes-derived macrophages differentiated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from HIV-1 transgenic rats. *Mol Immunol* 2004;41(10):979-84.
21. Neshati Z, Matin MM, Bahrami AR, Moghimi A. Differentiation of mesenchymal stem cells to insulin-producing cells and their impact on type 1 diabetic rats. *J Physiol Biochem* 2010;66(2):181-7.
22. Katdare MR, Bhonde RR, Parab PB. Analysis of morphological and functional maturation of neoislets generated in vitro from pancreatic ductal cells and their suitability for islet banking and transplantation. *J Endocrinol* 2004;182(1):105-12.
23. Vaca P, Martín F, Vegara-Meseguer JM, Rovira JM, Berná G, Soria B. Induction of differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells by fetal soluble factors. *Stem Cells* 2006;24(2):258-65.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-18]

Tehran University Medical Journal; Vol. 69, No. 4, July 2011: 211-217

In-vitro differentiation of rat peripheral blood monocytes into insulin-producing cells by rat pancreatic extract

Fatemeh Tanhaye Kalate Sabz MSc.[1*]
Farah Farokhi PhD.[2]
Nowroz Delirezh PhD.[3]
Shahram Javadi PhD.[4]
Havva Chapari MSc.[1]

1- Deaprtment of Histology and Embryology, Urmia University, URMIA, Iran.
2- Department of Biology, Urmia University, URMIA, Iran.
3 - Department of Immunology, Urmia University, URMIA, Iran.
4 - Department of Clinical Sciences, Urmia University, URMIA, Iran.

*Corresponding author: Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran, Postal Code: 5715915199
Tel: +98-915-1205847
email: fateme.1694@yahoo.com

Received: April 04, 2011 Accepted: April 20, 2011

Abstract

***Background*:** Cell-therapy provides a promising alternative for the treatment of type 1 diabetes. Monocytes which have a reprogramming or differentiation potential and are more available than any other types of stem cells, have been recognized as candidates for such investigations. The aim of the present study was to evaluate the differentiation potential of rat peripheral blood monocytes into insulin-producing cells by the use of rat pancreatic extract (2 days after a 60% pancreatectomy).

***Methods*:** Rat peripheral blood monocytes were isolated and cultured. Adherent monocytes were induced to differentiate into programmable cells in RPMI supplemented by 10% FCS, β-mercaptoetanol, M-CSF and IL-3 for six days. The dedifferentiated cells were analyzed by invert microscopy. Cultures of Programmable Cells of Monocytic Origin (PCMOs) were continued in RPMI, containing 10% FBS, pancreatic extract and 5 mmol/L glucose for 15 days. The medium was replaced every three days. At the end of the protocol, insulin and c-peptide excreted by the differentiated cells were tested by radioimmunoassay on days 6, 14, and 21. In order to verify insulin production in the cells, dithizone-staining, which is a method for insulin identification, was employed.

***Results*:** The results showed that the cells cultured in rat pancreatic extract secreted insulin and c-peptide relative to the control group. Dithizone-staining was positive in the aforesaid cells ($P<0/05$).

Conclusion: The results of the current study showed that pancreatic extract treatment can differentiate rat peripheral blood monocytes into insulin-producing cells which can be regarded as a potential source for the treatment of diabetes.

Keywords: Insulin-producing beta cells, monocyte, peripheral blood stem cells, pancreatic extract, rat.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-18]