دانشکده علوم پایه

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی جانوری

بررسی اثر عصاره گیاه دارویی کاسنی (*Cichorum intybus* L.) بر تولید سلول های ترشح کننده انسولین از سلول های بنیادی P19

اساتید راهنما:

دکترفریبا اسماعیلی

دکتر نواز خرازیان

استاد مشاور:

دکترحسین حسن پور

پژوهشگر:

مریم ابراهیمی‌نیا

مهر-۱۳۹۱

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

سپاس خدای را که سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند. و سلام و دورد بر محمّد و خاندان پاک او، طاهران معصوم، هم آنان که وجودمان وامدار وجودشان است؛ و نفرین پیوسته بر دشمنان ایشان تا روز رستاخیز.

بدون شک جایگاه و منزلت معلم، اجّل از آن است که در مقام قدردانی از زحمات بی شائبه ی او، با زبان قاصر و دست ناتوان، چیزی بنگاریم. اما از آنجایی که تجلیل از معلم، سپاس از انسانی است که هدف و غایت آفرینش را تامین می کند و سلامت امانت هایی را که به دستش سپرده، تضمین؛ بر حسب وظیفه و از باب "من لم یشکر المنعم من المخلوقین لم یشکر الله عزّ و جلّ":

از پدر و مادر عزیزم، این دو معلم بزرگوارم، که همواره بر کوتاهی و درشتی من، قلم عفو کشیده و کریمانه از کنار غفلت هایم گذشته اند و در تمام عرصه های زندگی یار و یاوری بی چشم داشت برای من بوده اند؛

از خواهرم، فرشته زندگیم، که بودنش تاج افتخاری است بر سرم؛

از استاد گرامی؛ سرکار خانم دکتر فریبا اسماعیلی که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند؛

از استاد محترم، سرکار خانم دکتر نواز خرازیان، که بدون مساعدت ایشان، این پروژه به نتیجه مطلوب نمی رسید؛

از استاد خوبم جناب آقای دکتر حسین حسن پور، که زحمت مشاوره این تحقیق را بر عهده گرفتند؛

و از اساتید محترم؛ جناب خانم دکتر فریبا هوشمند و جناب آقای دکتر ولی الله خلجی که زحمت داوری این پروژه را متقبل شدند؛ کمال تشکر و قدردانی را دارم.

باشد که این خرد ترین، بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

و با تشکر خالصانه از دوستان گران مایه ام خانم ها زهرا حاتم نیا، مهسا تشکری میانرودی، تسکینه جستجو، سمیه رحیمی، رضوان محمدی و سایر دوستان خوبم که مرا صمیمانه و مشفقانه یاری نموده اند.

تقدیم به:

خدای مهربانم که آفرید

جهان را، انسان را، عقل را، علم را، معرفت را، عشق را

و به کسانی که عشقشان را در وجودم دمید.

چکیده

دیابت نوعی اختلال متابولیک است. این بیماری توسط بالا رفتن سطح گلوکز خون مشخص می‌شود. بالا بودن قند خون در دراز مدت، آسیب‌های جبران ناپذیری را به دستگاه عصبی، چشم، کلیه و سیستم قلب و عروق وارد می‌کند. تحقیقات نشان داده است که برخی از گیاهان دارویی نقش مهمی در کنترل دیابت قندی دارند. تأثیر ترکیبات فعال زیستی استخراج شده از این گیاهان در کاهش قند خون بیشتر از داروهای شیمیایی است. فلاونوئیدها، گروهی از ترکیبات فعال زیستی با منشأ گیاهی هستند که خواص آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد ویروسی، ضد سرطانی و ضد دیابتی آن‌ها به اثبات رسیده است. در مطالعه کنونی، به بررسی القای تمایز سلول‌های کارسینومای جنینی P19 به سلول‌های تولیدکننده انسولین تحت تأثیر غلظت‌های پنجاه، صد و دویست میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ کاسنی پرداخته شده است. بدین منظور، اجسام شبه جنینی حاصل از کشت معلق سلول‌های P19 به مدت هشت تا دوازده روز، با این عامل القایی تیمار شدند. سپس رنگ‌آمیزی دیتیزون جهت تأیید ایجاد فنوتیپ سلول های بتا در سلول های P19 تمایز یافته با عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ کاسنی صورت گرفت. شمارش سلول‌های تمایز یافته قرمز رنگ حاصل از این رنگ آمیزی و بررسی‌های آماری نشان داد که بهترین غلظت عصاره جهت تولید بیشترین تعداد سلول‌های انسولین‌ساز از سلول‌های بنیادی P19 صد میکروگرم بر میلی‌لیتر است. با به‌کار-گیری روش ایمنوفلورسنس، نشان داده شد که سلول‌های تمایز یافته با عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ کاسنی قادر به بیان نشانگرهای اختصاصی سلول بتای پانکراس هستند. بیان ژن Pdx-1 در سلول‌های P19 تمایز یافته با غلظت-های پنجاه و صد میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ کاسنی توسط تکنیک RT-PCR به اثبات رسید. بنابراین، عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ کاسنی عامل القاگر مناسبی جهت تمایز سلول‌های بنیادی P19 به سلول‌های انسولین‌ساز در شرایط آزمایشگاهی است.

کلمات کلیدی: عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ کاسنی، سلول‌های بنیادی P19 و سلول‌های انسولین‌ساز

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه	
۱-۱ پانکراس	۶
۱-۲ تکوین پانکراس در انسان	۷
۱-۲-۱ عوامل رشد مؤثر در تکوین پانکراس	۹
۱-۲-۱-۱ عوامل رشد فیبروبلاستی	۹
۱-۲-۱-۲ اکتیوین B	۹
۱-۲-۲ ژن‌های دخیل در تکوین پانکراس	۱۰
۱-۳ هورمون انسولین	۱۳
۱-۳-۱ ساختار شیمیایی هورمون انسولین	۱۳
۱-۳-۲ بیوسنتز انسولین	۱۴
۱-۳-۳ عوامل محرک ترشح انسولین	۱۴
۱-۳-۴ گیرنده انسولین	۱۴
۱-۳-۵ اثرات متابولیک انسولین	۱۵
۱-۳-۵-۱ تحریک کبد و سلول های عضلانی به ذخیره گلوکز به صورت گلیکوژن	۱۵
۱-۳-۵-۲ تحریک سلول‌های چربی به سنتز چربی از اسیدهای چرب و گلیسرول	۱۵
۱-۳-۵-۳ مهار واکنش‌های لیپولیز در بافت‌های چربی و کبدی	۱۵
۱-۳-۵-۴ تحریک سلول‌های عضلانی و کبد به سنتز پروتئین از آمینواسیدها	۱۶
۱-۳-۵-۵ مهار گلوکونئوژنز در کبد	۱۶
۱-۴ دیابت قندی	۱۶
۱-۴-۱ انواع دیابت قندی	۱۷
۱-۴-۱-۱ دیابت قندی نوع یک	۱۷
۱-۴-۱-۲ دیابت قندی نوع دو	۱۷
۱-۴-۱-۳ دیابت حاملگی	۱۷
۱-۴-۱-۴ انواع خاص دیابت قندی	۱۸
۱-۴-۲ انواع روش‌های درمان دیابت	۱۸
۱-۵ سلول های بنیادی	۱۸
۱-۵-۱ تقسیم بندی سلول‌های بنیادی بر اساس منشأ	۱۹
۱-۵-۱-۱ سلول‌های بنیادی جنینی	۱۹
۱-۵-۱-۲ سلول‌های زاینده جنینی	۲۰
۱-۵-۱-۳ سلول‌های بنیادی رویانی	۲۰
۱-۵-۱-۴ سلول‌های بنیادی بند ناف	۲۰
۱-۵-۱-۵ سلول‌های بنیادی بالغ	۲۰
۱-۵-۱-۶ سلول های بنیادی تراتوکارسینوما	۲۱
۱-۶ سلول های P19	۲۱

۱-۷ تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های ترشح کننده انسولین در شرایط آزمایشگاهی ۲۲
۱-۷-۱ تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های انسولین‌ساز ۲۳
۱-۷-۲ تمایز سلول‌های بنیادی پانکراس به سلول‌های انسولین ساز ۲۴
۱-۷-۳ تمایز سلول‌های بنیادی عصبی به سلول‌های انسولین‌ساز ۲۴
۱-۷-۴ تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان و خون محیطی به سلول‌های انسولین‌ساز ۲۵
۱-۷-۵ تمایز سلول‌های بنیادی کبد به سلول‌های مولد انسولین ۲۵
۱-۷-۶ تمایز سلول‌های بنیادی بند ناف به سلول‌های تولید کننده انسولین ۲۵
۱-۷-۷ تمایز سلول‌های بنیادی پوست به سلول‌های تولیدکننده انسولین ۲۶
۱-۷-۸ تولید سلول انسولین‌ساز از سلول بنیادی بافت چربی ۲۶
۱-۷-۹ تمایز سلول‌های کارسینومایی به سلول‌های بتای پانکراس ۲۷
۱-۸ روش‌های مختلف تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های مولد انسولین ۲۷
۱-۹ عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ کاسنی ۲۸
۱-۹-۱ ترکیبات شیمیایی کاسنی ۲۹
۱-۹-۲ خواص دارویی کاسنی ۲۹
۱-۹-۳ نقش کاسنی در درمان دیابت ۳۰
فصل دوم: مواد و روش ها
۲-۱ استخراج و جمع‌آوری عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ گیاه دارویی کاسنی ۳۴
۲-۲ تعیین غلظت عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ کاسنی با استفاده از محلول‌های استاندارد کاتشین ۳۶
۲-۳ کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی P19 ۳۷
۲-۳-۲ انجماد وذخیره سلول‌های P19 ۳۹
۲-۳-۳ ذوب کردن سلول‌های P19 ۳۹
۲-۴ القای تمایز در سلول های P19 با استفاده از عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ کاسنی ۴۰
۲-۴-۱ تهیه اجسام شبه جنینی ۴۰
۲-۴-۲ تهیه ظرف ژلاتینه جهت کشت چسبنده سلول ۴۱
۲-۴-۳ القای تمایز اجسام شبه جنینی با عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ کاسنی ۴۱
۲-۵ ارزیابی سلول‌های حاصل از تمایز تحت اثر عامل القایی عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ کاسنی ۴۲
۲-۵-۱ رنگ آمیزی دیتیزون ۴۲
۲-۵-۲ شمارش سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار ۴۳
۲-۵-۳ بررسی بیان نشانگرهای اختصاصی سلول‌های بتا در سلول‌های P19 تمایز یافته با عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ کاسنی به روش ایمنوفلورسنس ۴۴

۲-۵-۴ بررسی بیان ژن Pdx-1 در سلول‌های تمایز یافته با عامل القایی عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ کاسنی به روش RT-PCR ۴۶
۲-۵-۴-۱ استخراج RNA کل از سلول‌های تمایز یافته ۴۶
۲-۵-۴-۲ جداسازی RNA کل ۴۷
۲-۵-۴-۳ تعیین غلظت RNA استخراج شده ۴۸
۲-۵-۴-۴ الکتروفورز ژل آگارز ۴۹
۲-۵-۴-۵ واکنش رونویسی معکوس ۵۳
۲-۵-۴-۶ طراحی پرایمر ۵۲
۲-۵-۴-۷ واکنش PCR ۵۵
فصل سوم: نتایج
۳-۱ تهیه عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ کاسنی و تعیین غلظت آن ۵۶
۳-۲ تولید اجسام شبه جنینی به روش کشت معلق سلول‌های P19 ۵۷
۳-۳ استفاده از عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ کاسنی در القای تمایز سلول‌های P19 به سلول‌های تولید کننده انسولین ۵۸
۳-۴ تعیین بهترین غلظت عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ کاسنی جهت تمایز سلول‌های P19 به سلول‌های انسولین‌ساز ۵۹
۳-۵ بررسی بیان نشانگرهای اختصاصی سلول بتا در سلول‌های تمایز یافته با عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ کاسنی توسط روش ایمنوفلورسنس ۶۰
۳-۶ ارزیابی بیان ژن Pdx-1 در سلول‌های تمایز یافته با عامل القایی عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ کاسنی با استفاده از تکنیک RT-PCR ۶۲
فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری
۴-۱ بررسی مرفولوژی سلول‌های انسولین‌ساز حاصل از تمایز سلول‌های P19 تحت اثر عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ کاسنی ۶۳
۴-۲ تعیین غلظت مناسب عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ کاسنی جهت تمایز سلول‌های P19 به سلول‌های انسولین‌ساز ۶۴
۴-۳ ارزیابی بیان نشانگرهای اختصاصی سلول‌های بتا در سلول‌های تمایز یافته با عامل القایی عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ کاسنی ۶۵
۴-۴ ارزیابی بیان ژن Pdx-1 در سلول‌های تمایز یافته با عامل القایی عصاره متانولی (فلاونوئیدی) برگ کاسنی ۶۶
۴-۵ نتیجه گیری ۶۷
۴-۶ پیشنهادات ۶۸
منابع ۶۹

فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱ تکوین پانکراس در انسان	۹
شکل ۱-۲ فاکتورهای رونویسی دخیل در تکوین پانکراس	۱۳
شکل ۱-۳ ساختار شیمیایی انسولین	۱۴
شکل ۱-۴ گیاه کاسنی و اندام‌های مختلف آن	۳۱
شکل ۱-۵ نقش PTP-1B در مقاومت به انسولین	۳۴
شکل ۱-۶ رده بندی فلاونوئیدها	۳۵
شکل ۲-۱ نمونه‌هایی از وسایل به کار رفته در استخراج عصاره فلاونوئیدی از برگ کاسنی	۴۰
شکل ۳-۱ نمودار استاندارد برای تعیین غلظت عصاره فلاونوئیدی برگ کاسنی	۶۸
شکل ۳-۲ اجسام شبه جنینی	۶۹
شکل ۳-۳ تصویر میکروسکوپ نوری از سلول‌های رنگ آمیزی شده با رنگ اختصاصی دیتیزون	۷۰
شکل ۳-۴ تصویر میکروسکوپ فلورسنس از سلول‌های تولید کننده انسولین حاصل از تمایز سلول‌های P19 تحت تأثیر عصاره برگ کاسنی	۷۳
شکل ۳-۵ بررسی بیان ژن Pdx-1 در سلول‌های تمایزیافته با عصاره فلاونوئیدی برگ کاسنی	۷۴

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۲-۱. محدوده جداسازی در ژل با درصدهای متفاوت آگارز	۶۱
جدول۲-۲: برنامه واکنش PCR در دستگاه ترمال سایکلر	۶۶
جدول۳-۱ میزان جذب نوری محلول‌های استاندارد کاتشین	۶۷
جدول ۳-۲ تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره فلاونوئیدی برگ کاسنی برتمایز سلول‌های P19	۷۱

فصل اول

۱- مقدمه

۱-۱ پانکراس

پانکراس یکی از غدد بزرگ گوارشی به وزن هشتاد گرم، طول پانزده سانتی‌متر و عرض شش سانتی‌متر است. این غده در قسمت پشتی معده و جلوی مهره‌های اول و دوم کمری قرار دارد و از دوازدهه تا طحال به صورت تقریباً افقی کشیده شده است. از نظر تشریحی، غده پانکراس از قسمت‌های سر، گردن، تنه و دم تشکیل شده است. سر پانکراس که در داخل حلقه دوازدهه قرار دارد در جلوی ورید پورت[1] تنگ شده و گردن پانکراس به طول دو سانتی‌متر را ایجاد می‌کند. تنه پانکراس، قسمت وسیعتر پانکراس با مقطع عرضی مثلثی شکلی است که از گردن تا دم کشیده شده است. دم پانکراس در امتداد تنه به سمت چپ و بالا رفته و به صورت مماس با طحال قرار می‌گیرد. مجرای اصلی پانکراس که به صورت عرضی از سر تا دم پانکراس کشیده شده، به طرف پایین و راست تغییر جهت داده و با مسیر قوسی به آمپول واتر[2] می‌ریزد (محمودزاده ثاقب و همکاران، ۱۳۸۷).

اطراف غده پانکراس توسط کپسول نازکی از جنس بافت همبند احاطه شده است. کپسول محیطی با فرستادن استطاله‌هایی به داخل پانکراس، آن را به لوب‌ها و لبول‌هایی تقسیم می‌کند؛ ولی لبول‌ها چندان کامل و مشخص نیستند. پانکراس از دو بخش مجزای برون ریز[3] و درون ریز[4] تشکیل شده است. بخش برون ریز شامل سلول‌های آسینی[5] و مجرایی است. سلول‌های مدور یا گلابی شکل آسینی، توسط غشای پایه و الیاف رتیکولر احاطه شده‌اند و ترشحات خود را به درون مجاری رابط تخلیه می‌کنند. این مجاری که از درون آسینی شروع می‌شوند، توسط سلول‌های مکعبی مفروش شده‌اند (کوئیرا، ۱۳۸۲). مجاری رابط به هم پیوسته و مجاری بین لبولی را ایجاد می‌کنند که به مجرای دفعی اصلی، در مرکز پانکراس، به نام مجرای ویرسونگ[6]

1- Port vein
2-Vater ampulla
3- Exocrine
4- Endocrine
5- Acini
6- Wirsung duct

ختم می‌شوند. مجرای ویرسونگ پس از خروج از پانکراس، در محلی به نام آمپول واتر، همراه با مجاری صفراوی مشترک به دوازدهه باز می‌شود. در محل باز شدن مجرا به دوازدهه، اسفنگتری متشکل از عضلات صاف طولی و حلقوی قرار دارد، که اسفنگتر اودی[1] نام دارد و خروج ترشحات پانکراس و صفرا را تنظیم می کند (Richard *et al*., 2007). ترشحات آسینی‌های پانکراس شامل آب، یون‌ها، بی‌کربنات و آنزیم‌های گوارشی هستند که از طریق مجاری به دوازدهه می‌ریزند. اکثر آنزیم‌های گوارشی در گرانول‌های ترشحی سلول‌های آسینی به صورت پیش‌آنزیم ذخیره و پس از ترشح در روده کوچک به منظور پیشرفت هضم و جذب مواد غذایی فعال می‌شوند. ترشحات پانکراس توسط سیستم خود مختار پاراسمپاتیک، هورمون سکرتین[2] و کوله سیستوکینین[3] کنترل می‌شوند (کوئیرا، ۱۳۸۲).

بخش درون‌ریز پانکراس از توده‌های گرد سلولی به نام جزایر لانگرهانس[4] تشکیل شده است. این جزایر بین صد تا دویست میکرون قطر دارند و دارای چند صد سلول هستند. بیش از یک میلیون جزیره لانگرهانس در پانکراس انسان وجود دارد. تعداد این جزایر در دم پانکراس کمی بیش از سایر نواحی این غده است. هر جزیره از مجموع سلول‌های چند وجهی یا گردی که به صورت طناب‌هایی قرار گرفته، تشکیل شده است. این طناب‌ها توسط شبکه‌ای از مویرگ‌های خونی از یکدیگر جدا می‌شوند (Gao *et al*., 2003). سلول-های جزایر لانگرهانس بر اساس مورفولوژی و خصوصیات رنگ آمیزی به انواع مختلف زیر تقسیم می‌شوند:

سلول‌های آلفا[5]: سلول‌های آلفا از سایر سلول‌های جزیره لانگرهانس درشتتر بوده و در محیط جزایر فراوانترند. این سلول‌ها پانزده تا بیست درصد سلول‌های جزایر پانکراس را تشکیل می‌دهند. سلول‌های آلفا به دو دسته تقسیم می شوند. سلول‌های آلفا یک (α_1) هورمون گاسترین را تراوش می‌کنند و سلول‌های آلفا دو (α_2)که هورمون گلوکاگون به داخل خون ترشح می‌کنند.

سلول‌های بتا[6]: سلول‌های بتا، هفتاد درصد از سلول‌های جزیره لانگرهانس را تشکیل می دهند. این دسته از سلول‌ها فراوانتر و کوچکتر از سلول‌های نوع آلفا هستند و بیشتر در مرکز جزیره لانگرهانس دیده می‌شوند. سلول‌های بتا در پاسخ به افزایش گلوکز خون، هورمون انسولین ترشح می‌کنند.

سلول‌های دلتا[7]: حدود پنج درصد از سلول‌های جزیره لانگرهانس، از سلول‌های دلتا تشکیل شده است. این دسته از سلول‌ها هورمون سوماتواستاتین را ترشح می‌کنند.

سلول‌های F: این نوع از سلول‌ها نه تنها در جزایر لانگرهانس وجود دارند؛ بلکه در لابه‌لای سلول‌های برون‌ریز پانکراس نیز پراکنده هستند و هورمون پلی پپتید پانکراسی را ترشح می‌کنند (رجحان، ۱۳۷۶).

۲-۱ تکوین پانکراس در انسان

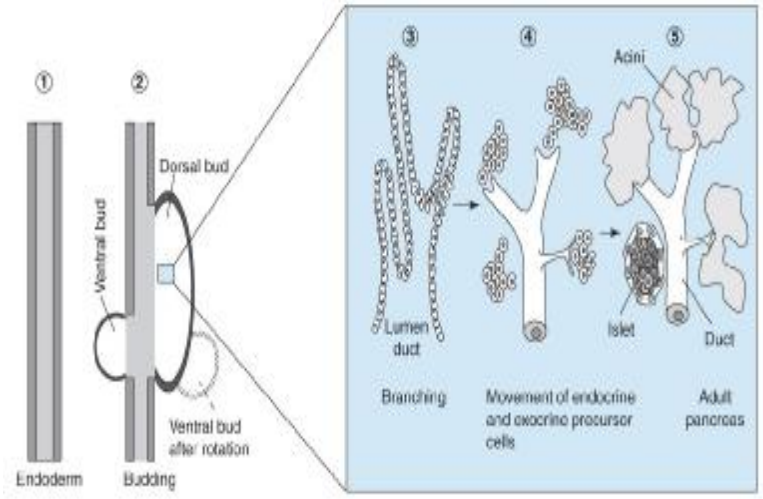
پانکراس انسان از دو جوانه مجزا تکوین می‌یابد که بعداً برای تشکیل یک اندام به هم متصل می-شوند. جوانه پشتی پانکراس که در روز بیست و ششم تکوین انسان ظاهر می‌شود، از آندودرم روده پیشین

1- Oddi sphincter
2- Secretin
3- Colecystokinine
4- Langerhanse islets
5- Alpha cells
6- Beta cells
7- Delta cells

منشأ می‌گیرد و سریعاً به داخل مزانتر پشتی رشد می‌کند. جوانه شکمی پانکراس در حدود روز بیست و هفتم جنینی، از آندودرم روده پیشین منشأ می‌گیرد و در نزدیکی ورود مجرای صفراوی به دوازدهه رشد می‌کند. در اواخر هفته پنجم جنینی هنگامی که دئودنوم به سمت راست می چرخد، جوانه شکمی پانکراس به سمت عقب حرکت می‌کند. در هفته ششم جنینی، به‌دنبال قرارگیری جوانه شکمی در زیر و پشت جوانه پشتی، پارانشیم و دستگاه مجاری جوانه‌های شکمی و پشتی در هم ادغام می‌شوند (Faas, 2007). جوانه شکمی، زایده چنگکی[1] و قسمت پایینی سر پانکراس را ایجاد می‌کند. مابقی پانکراس از جوانه پشتی مشتق می‌شود.

مجرای اصلی پانکراس، از مجرای شکمی و بخش دور مجرای پشتی پانکراس به وجود می‌آید. بخش نزدیک مجرای پشتی پانکراس یا مسدود می شود، یا به صورت مجرای کوچکی به نام مجرای پانکراسی فرعی (مجرای سانتورینی[2]) باقی می‌ماند. مجرای اصلی پانکراس همراه با مجرای صفراوی در محلی به نام پاپیلای ماژور[3] وارد دئودنوم می‌شود. ورود مجرای فرعی به دئودنوم از طریق پاپیلای مینور[4] صورت می‌گیرد (Sadler, 2004).

در هفته نهم تکوین جنینی، دسته‌های سلولی مجزایی در انتهای مجاری پانکراس ایجاد می‌شود که در نهایت سلول‌های آسینی پانکراس را به وجود می‌آورند. در حین اتساع مجاری پانکراسی، تعدادی دسته سلولی، از دیواره‌های انشعابات کوچکتر مجاری، به طرف بیرون توبول‌ها جوانه می‌زنند و به استرومای غده در حال تکوین مهاجرت می‌کنند. این دسته‌های سلولی با پیوستن به یکدیگر جزایر پانکراسی را ایجاد می‌کنند (شکل ۱-۱). سلول‌های آلفا، دلتا و بتا به ترتیب در هفته دهم، یازدهم و سیزدهم جنینی، در جزایر پانکراسی پدیدار می‌شوند (Faas, 2007). ترشح انسولین حوالی ماه پنجم جنینی آغاز می‌شود. مزودرم احشایی اطراف جوانه‌های پانکراس، بافت همبند پانکراس را تشکیل می‌دهد (Sadler, 2004).



1- Uncinate process
2- Santorini duct
3- Major papilla
4- Minor papilla

شکل ۱-۱ تکوین پانکراس در انسان. سلول‌های آسینی و جزایر پانکراسی به ترتیب از دسته‌های سلولی انتها و دیواره مجاری پانکراس منشأ می‌گیرند (Faas, 2007).

۱-۲-۱ عوامل رشد مؤثر در تکوین پانکراس

عوامل رشد فیبروبلاستی[1] و اکتیوین B[2]، از عوامل رشد مؤثر در تکوین پانکراس هستند که در قسمت زیر به شرح آن‌ها می‌پردازیم.

۱-۲-۱-۱ عوامل رشد فیبروبلاستی

تکوین پانکراس نیز مانند بقیه اندام‌ها نظیر ریه و کلیه، وابسته به ارتباط متقابل اپی‌تلیوم و مزانشیم اطراف است. تکثیر سلول‌های اپی‌تلیال پانکراس مرهون تعدادی از عوامل رشد فیبروبلاستی ترشح شده از مزانشیم است. عوامل رشد فیبروبلاستی از تنظیم کننده‌های مهم تکوین در مراحل جنینی و عامل قوی در مراحل رگ‌زایی به شمار می‌روند. حضور این عوامل در تشکیل سه لایه زاینده جنینی، تکوین سیستم عصبی، ریه و چشم ضروری است (Martin, 1998).

خانواده عامل رشد فیبروبلاستی شامل بیست و دو عضو است که از بافت‌های متفاوتی ترشح می‌شوند. وزن مولکولی اعضای این خانواده بین هفده تا سی و چهار کیلو دالتون متغیر است و بین اسید آمینه‌های ساختاری آن‌ها سیزده تا هفده درصد تشابه وجود دارد (Margalit *et al*., 2003). عوامل رشد فیبروبلاستی از طریق چهار گیرنده تیروزین‌کینازی (FGRR1-4[3]) اثر خود را اعمال می‌کنند. بیان دو دسته گیرنده FGFR1 و FGFR2 در اکتودرم اولیه جنینی، سبب پیشرفت تکوین این ناحیه می‌شود (Caricasole *et al*., 1998). عوامل رشد فیبروبلاستی ابتدا در مزودرم اولیه بیان می‌شوند و سپس بیان نشانگرهای ویژه آندودرمی را القا می‌کنند (Wells *et al*., 2000). FGF2، از جمله عواملی است که در هنگام شکل‌گیری پانکراس از نوتوکورد ترشح شده و بر تکوین پانکراس اثر می‌گذارد. این عامل سبب بیان ژن هومئوباکس دئودنال پانکراسی- ۱[4] در کشت سلول‌های آندودرمی در محیط آزمایشگاهی و تکثیر سلول‌های اپی‌تلیالی پانکراس می‌شود (Spassky *et al*., 2002). FGF7 در مراحل آخر تکوین پانکراس جنینی و FGF1، FGF2، FGF4، FGF5، FGF7 و FGF10 در سلول های بتای پانکراس بالغ بیان می‌شود (Hart *et al*., 2000). بیان بیش از اندازه FGF7 در سلول‌های بتا سبب از بین رفتن رشد منظم جزیره و ظاهر شدن سلول‌های کبدی در بین جزایر لانگرهانس می‌شود (Krakowski *et al*., 1999).

۱-۲-۱-۲ اکتیوین B

اکتیوین B از اعضای خانواده فاکتور رشد تغییر شکل دهنده[5] است، که توسط ناحیه‌ای از نوتوکورد که در نزدیکی آندودرم سازنده پانکراس قرار دارد ترشح می‌شود. اکتیوین B یکی از عوامل تنظیم کننده اندازه و شکل پانکراس است. ActRIIA و ActRIIB، دو نوع گیرنده اکتیوین B هستند که در اپی‌تلیوم پانکراس

1- Fibroblast growth factors: FGF
2- ActivinB
3- Fibroblast growth factors receptors 1-4
4- Pancreatic duodenal homeobox 1: Pdx-1
5- Transforming growth factor-β: TGF-β

جنینی بیان می‌شوند. با اتصال اکتیوین B به ActRIIA و ActRIIB پروتئین‌های سیتوپلاسمی Smad2، Smad3 و Smad 4 فعال شده و موجب رشد سلول‌های اندوکرین می‌شوند (Kim and Hebrok, 2001). از طرفی اکتیوین B و FGF2 می‌توانند برگیرنده‌های خاصی اثر بگذارند و بیان ژن shh[1] را مهار کنند. مهار بیان این ژن سبب تعیین آندودرم پانکراسی و بیان فاکتورهای رونویسی مهم در این قسمت از آندودرم می‌شود (Erickson *et al*., 1997).

۱-۲-۲ ژن‌های دخیل در تکوین پانکراس

نوتوکورد با ترشح اکتیوین B و FGF2 مانع از فعال شدن ژن shh که در پیشرفت تمایز روده‌ای دخیل هستند می‌شود. این رویداد سبب فعال شدن ژن Pdx-1 می‌شود. pdx-1، عضوی از خانواده فاکتورهای رونویسی هومئودمین[2] است که در تکوین پانکراس نقش کلیدی دارد. این فاکتور رونویسی مهمترین نقش را در تمایز سلول‌های پیش ساز پانکراسی به سمت سلول بتا ایفا می‌کند (Schwitzgebel, 2001).

فاکتور Pdx-1 توسط آزمایش‌های مختلف شناسایی شده و دارای اسامی متفاوتی مانند فاکتور پیش برنده انسولین-۱[3]، فاکتور نسخه‌برداری سوماتواستاتین-۱[4] و فاکتور دئودنوم و جزیره-۱[5] است (Kim and Hebrok, 2001). الگوی بیان Pdx-1 در پانکراس در حال تکوین در تمام مراحل حفظ شده و باعث می‌شود آن بخش از آندودرم که این فاکتور را بیان می‌کند به پانکراس تبدیل شود. این فاکتور ابتدا در قسمت کوچکی از آندودرم روده جلویی بیان می‌شود. بیان این فاکتور در جوانه پشتی و شکمی پانکراس دیده شده است (Offield *et al*., 1996). از روز یازدهم تا سیزدهم جنینی، Pdx-1 در سرتاسر انشعابات مجرایی در حال تکوین پانکراس موش بیان می‌شود. همان طور که بخش برون ریز پانکراس و جزایر طی روزهای چهاردهم تا پانزدهم جنینی شروع به ایجاد سلول‌های تولید کننده هورمون می‌کنند، بیان این فاکتور به بخش درون ریز تغییر می‌کند. بیان همزمان Pdx-1 و آنزیم آمیلاز در روز سیزدهم جنینی در سلول‌های بخش برون‌ریز پانکراس مشاهده شده است. بیان فاکتور Pdx-1 تا روز شانزدهم به طور واضحی کاهش می‌یابد و از بخش اگزوکرین پانکراس بالغ غیر قابل جداسازی است. در طی مراحل بعدی تکوین جزایر لانگرهانس تا روز هجدهم جنینی، بیان Pdx-1 به طور عمده محدود به سلول‌های بتای بالغ جزایر لانگرهانس می‌شود (Offield *et al*., 1996).

در سلول‌های بتای بالغ Pdx-1 تنظیم کننده بیان ژن انسولین در پاسخ به گلوکز است (Melloul, 2004). در موجودات بالغ، انسولین از سلول‌های بتای پانکراس در پاسخ به غلظت بالای گلوکز ترشح می‌شود. سلول‌های بتا به عنوان حسگر گلوکز عمل می‌کنند. این سلول‌ها با بیان پروتئین انتقال دهنده گلوکز و آنزیم گلوکوکیناز حضور گلوکز در محیط را حس کرده و مصرف آن را کنترل می‌کنند. گلوکز از طریق انتقال دهنده گلوکز-۲[6] وارد سلول بتا شده و به وسیله آنزیم گلوکوکیناز فسفریله می‌شود. این آنزیم متابولیسم گلوکز را کاتالیز می‌کند (Melloul, 2004). آنزیم گلوکوکیناز و پروتئین انتقال دهنده گلوکز در سلول های بتا برای

1- Sonic hedgehog
2- Homeodomain
3- Insulin promoter factor: Ipf-1
4- Somatostatin transcription factor 1 :stf-1
5- Islets and duodenum x-1 :Idx-1
6- Glucose transporter 2: GLUT2

پاسخ به گلوکز مورد نیاز هستند. در نهایت فاکتور Pdx-1 باعث می‌شود سیگنال گلوکز با سنتز و ترشح انسولین همراه شود. Pdx-1 علاوه بر تنظیم بیان ژن انسولین، بیان ژن‌های انتقال دهنده گلوکز-۲، گلوکوکیناز و سوماتواستاتین را از طریق برهمکنش با نواحی پروموتر آن‌ها تنظیم می‌کند (Watada *et al.*, 1996). غیر فعال‌سازی ژن Pdx-1 در موش‌ها سبب عدم تکوین پانکراس می‌شود (Melloul, 2004). جوانه-های ابتدایی پانکراس در موش‌های فاقد Pdx-1 تشکیل می‌شوند. بنابراین بیان این فاکتور برای تشخیص پانکراس از آندودرم ضروری نیست؛ ولی وجود این فاکتور برای تکوین انواع سلول‌های اندوکرین و تمایز و بلوغ سلول‌های بتا مهم است (Ahlgren *et al*., 1996). در موش‌های با نقص هتروزیگوت ژن Pdx-1 کاهش بیان ژن‌های انتقال دهنده گلوکز-۲ و انسولین، و افزایش آپوپتوزیس سلول‌های بتا و جزایر لانگرهانس غیر طبیعی مشاهده می‌شود (Jonsson *et al.*, 1994).

تمایز پانکراس از سلول‌های اپی‌تلیالی بیان‌کننده ژن‌های Hnf3b[1]، HlxB9، Hnf6 و Pdx-1 آغاز می‌شود. ژن‌های Hnf1b، Hnf3β، Hnf6 و Hnfy در برنامه‌ریزی چگونگی تکوین آندورم نقش دارند (Li *et al*., 2000). Hnf3β، یکی از ژن‌های تنظیمی کلیدی در شکل‌گیری ریه، کبد و پانکراس است (Cirillo *et al*., 2002). در موش‌های فاقد این ژن ، ناحیه پیشین و میانی آندودرم تشکیل نمی‌شود (Ang *et al*., 1994). Hnf6 در تعیین سرنوشت پانکراس نقش اساسی دارد و مانند پلی بین ژن‌های خاص آندودرمی و ژن‌های خاص پانکراسی عمل می‌کند. پانکراس موش‌هایی که فاقد ژن Hnf6 هستند، بخش درون‌ریز ندارد. ژن Hnf6 توسط Hnf4 و Hnf1β بیان و سبب فعال شدن ژن Pdx-1 و Hnf3β می‌شود (Lahuna *et al*., 2000).

Hlxb9[1] از جمله ژن‌هایی است که در سلول‌های بتای بالغ بیان می‌شود. در طی تکوین، بیان ژن Hlxb9 تنها در آندودرم شکمی و پشتی صورت می‌گیرد. بیان این ژن در آندودرم حالت گذرا و موقتی دارد (Li *et al*., 1999). تحریک بیان این ژن ابتدا توسط پیام‌های ارسالی از نوتوکورد و سپس به وسیله Pdx-1 صورت می‌گیرد. Hlxb9 به عنوان بازدارنده تشکیل لوله عصبی عمل می‌کند (Li *et al*., 1999).

Hnf6، ژن کلیدی دیگری است که بیان ژن‌های Hnf3β و Ngn3[2] را القا می‌کند. پس از ایجاد سلول-های Pdx-1 مثبت در مراحل اولیه تکوین پانکراس، ژن‌های Ngn3، NeuroD[3]، Nkx2.2[4]، Pax6[5] و lsl-1[6] بیان می‌شوند (Sommer *et al*., 1996). بیان ژن Ngn3، قبل از تمایز سلول‌های برون‌ریز پانکراس در سلول-های پیش‌ساز اپی‌تلیالی صورت می‌گیرد. در جنین موش، بیان Ngn3 در مرحله جوانه زدن پانکراس، هنگامی که سلول‌های ترشح کننده گلوکاگون شروع به تمایز می‌کنند، آغاز می‌شود (Apelqvist *et al*., 1999). تا مرحله سیزده و نیم روز جنینی Ngn3 کم بیان می‌شود؛ در حالی‌که بعد از این مرحله، میزان بیان این ژن به شدت افزایش می‌یابد. در غیاب فعالیت ژن Ngn3، تمام سلول‌های پانکراسی از بین می‌روند (Gradwohl *et al*., 2000).

1- Hepatic nuclear factor3b
2- Neurogenin3
3- Neurogenic differentiation
4- NK2 transcription factor related, locus 2
5- Paired box gene 6
6- Islet-1

Isl-1، از عوامل هومئودمینی است که علاوه بر سلول‌های بتا، در سلول‌های عصبی و مزودرمی نیز شناسایی شده است. بیان Isl-1 برای تکوین مزانشیم جوانه پانکراس و نیز برای تمایز اپی‌تلیوم بخش پشتی پانکراس به سلول‌های آندوکرین مورد نیاز است؛ در حالی‌که در مزانشیم شکمی پانکراس بیان این ژن دیده نمی‌شود. تکوین بخش شکمی پانکراس و مزانشیم همراه آن در موش‌های فاقد این فاکتور تحت تأثیر قرار نمی‌گیرند (Soria *et al*., 2001).

Pax4 و Pax6 دو پروتئین هومئودمین دیگر هستند که حضور آن‌ها برای تمایز سلول‌های بتا ضروری است. نقش اصلی Pax4 کنترل تکوین سلول‌های بتا و دلتا است. موش‌هایی که فاقد ژن Pax4 هستند در سه روز اول بعد از تولد به دلیل حذف سلول‌های بتا و دلتا می‌میرند. فاکتور رونویسی Pax6، در تکوین نهایی هر چهار دسته سلول درون‌ریز دخالت دارد. سلول‌های بتا در غیاب ژن Pax6 تکوین پیدا می‌کنند؛ اما نمی‌توانند تمام خصوصیات سلول‌های بتای بالغ را داشته باشند (Blyszczuk *et al*., 2003).

ژن Nkx2.2 یکی از ژن‌های هدف Pdx-1 است که در کامل شدن تمایز سلول‌های بتا اهمیت زیادی دارد. آغاز بیان ژن Nkx2.2 در سلول‌های پیش‌ساز اپی‌تلیومی کمی پس از شروع بیان ژن Pdx-1 صورت می‌گیرد. بیان این ژن را می‌توان ابتدا در سلول‌های اجدادی و در مرحله تمایز نهایی، در سلول‌های ترشح کننده انسولین، گلوکاگون و پلی پپتید پانکراسی مشاهده کرد. فقدان این ژن سبب عدم بلوغ نهایی سلول‌های درون‌ریز می‌شود (Cissell *et al*., 2003).

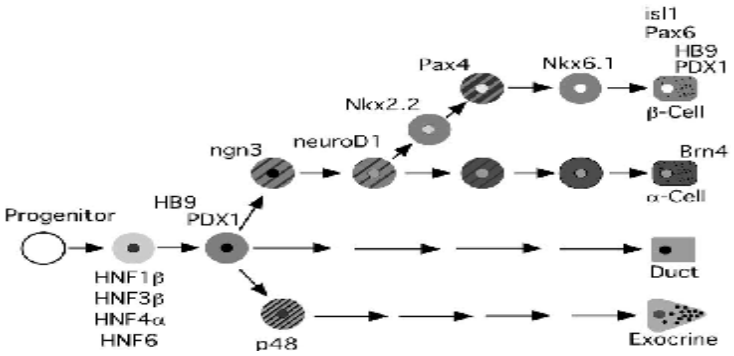
Nkx6.1[1]، از دسته ژن‌های خاص سلول‌های بتا است. این ژن توسط فاکتورهای رونویسی Pdx-1 و Nkx2.2 فعال می‌شود (Watada *et al* 2000). هنگام تکوین پانکراس و شکل‌گیری جوانه‌های پشتی و شکمی بیان Nkx6.1 را می‌توان کمی پس از بیان ژن Pdx-1 ملاحظه کرد (Grapin-botton and Da, 2000). فقدان ژن Nkx6.1 سبب حذف سلول‌های بتای بالغ می‌شود، در حالی‌که برای تکوین سلول‌های آلفا مشکلی به وجود نمی آید (Soria, 2001).

Lpf1[2] از ژن‌هایی است که سلول‌های اجدادی را به سمت تشکیل ساختارهای برون‌ریز و درون‌ریز پانکراس پیش می‌برد (Kim *et al*., 2002). غلظت کم اکتیوین B ترشح شده از نوتوکورد، سبب القای بیان این ژن در آندودرم پانکراسی می‌شود. مطالعات نشان داده است که اتصال Lpf1 به DNA، توسط پروتئین هومئودمین رده Pbx-1[3] صورت می‌گیرد (Hebrok *et al*., 2000). Lpf1 و Pbx-1 با یکدیگر کمپلکسی تشکیل می‌دهند که در تکوین پانکراس نقش دارد. در غیاب فاکتور Pbx-1 بیان ژن‌های Isl-1 و Ngn3 که از تنظیم کننده‌های مهم تکوین پانکراس هستند مختل می‌شود. بیان ژن Pbx-1 از مرحله ده و نیم روز جنینی در مزانشیم مجاور با جوانه پانکراسی آغاز می‌شود. در مرحله چهارده و نیم روز جنینی، بیان Pbx-1 تنها در سلول‌های اپی‌تلیالی مجرا و سلول‌های مزانشیمی پانکراس صورت می‌گیرد. در پانکراس فرد بالغ، این ژن در سلول‌های مجرا و بخش درون‌ریز و برون‌ریز بیان می‌شود (Kim *et al*., 2002).

ژن P48، یک پروتئین چهل و هشت کیلو دالتونی را کد می‌کند که زیرواحد مختص به پانکراس در کمپلکس پروتئین تریمری Ptf1 است. بیان P48 در جوانه‌های شکمی و پشتی پانکراس اتفاق می‌افتد (Kim

1- NK6 transcription factor related, locus1
2- Long polar fimbriae1
3- Pre-B-cell leukemia homeobox-1

(*et al*., 2002). P48 در تشکیل بخش درون‌ریز و برون‌ریز پانکراس نقش مهمی ایفا می‌کند (شکل ۱-۲) (Moritoh *et al*., 2003).



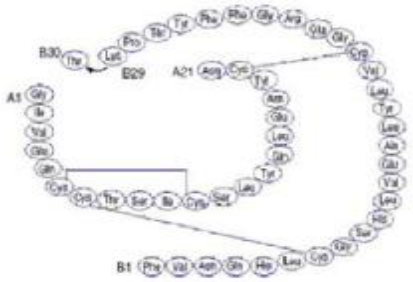
شکل ۱-۲ فاکتورهای رونویسی دخیل در تکوین پانکراس. شکل فوق زنجیره‌ای از فاکتورهای رونویسی را نشان می‌دهد که تکوین پانکراس را در مراحل مختلف تنظیم می‌کنند (Wilson *et al*., 2003).

۱-۳ هورمون انسولین

برای اولین بار در سال۱۹۲۱ به وجود انسولین در عصاره جدا شده از جزایر لانگرهانس پی برده شد پس از آن به سرعت اثر این هورمون در کاهش قند خون شناخته شد. انسولین نخستین پروتئینی بود که نوع و ردیف کامل اسید آمینه‌های آن تعیین، و از راه مصنوعی تهیه شد. این هورمون اولین پروتئینی بود که به کمک روش‌های تولید DNA نوترکیب برای مصارف جهانی تهیه شد (Rosenfeld, 2002).

۱-۳-۱ ساختار شیمیایی هورمون انسولین

انسولین هورمونی پلی‌پپتیدی با وزن مولکولی ۵۸۰۸ دالتون است. این هورمون از دو زنجیره آمینو اسیدی A و B تشکیل شده است. زنجیره‌های A و B به ترتیب دارای بیست و یک و سی آمینو اسید هستند. این دو زنجیره به کمک دو پل دی‌سولفیدی ، یکی بین اسیدهای آمینه شماره هفت دو زنجیره و دیگری میان اسیدهای آمینه شماره بیست زنجیره A و شماره نوزده زنجیره B با یکدیگر اتصال دارند. علاوه بر این، ریشه‌های اسید آمینه ردیف شش و یازده نیز در داخل زنجیره A، به وسیله پیوند دی‌سولفیدی به یکدیگر متصل هستند (شکل ۱-۳) (Olsen *et al*, 1996).



شکل ۱-۳ ساختار شیمیایی انسولین. دو زنجیره A و B موجود در ساختار انسولین توسط پیوندهای دی سولفیدی به هم متصل هستند (Chaykin, 2007).

۱-۳-۲ بیوسنتز انسولین

بیوسنتز و بسته بندی هورمون انسولین در درون سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس غده پانکراس صورت می‌گیرد. پره‌پروانسولین[1]، مولکول پیش‌ساز اولیه هورمون انسولین است که توسط ریبوزوم‌های مستقر بر شبکه آندوپلاسمی خشن سلول‌های بتا ساخته می‌شود. این مولکول پیش‌ساز اولیه، دارای بیست و سه اسید آمینه آب‌گریز به نام قطعه رهبر است که به داخل شبکه آندوپلاسمی هدایت می‌شود. با جدا شدن قطعه رهبر از مولکول پیش‌ساز پره‌پروانسولین در داخل شبکه آندوپلاسمی، مولکول پروانسولین ایجاد می‌شود. مولکول پروانسولین از شبکه آندوپلاسمی به دستگاه گلژی انتقال یافته و تحت تأثیر آنزیم‌های پروتئولیز کننده، به دو زنجیره آمینواسیدی A و B و پپتید C تجزیه می‌شود. دو زنجیره A و B به وسیله پیوندهای دی‌سولفیدی به یکدیگر اتصال یافته و انسولین کامل را به وجود می‌آورند. سپس مولکول‌های انسولین به کمک اتم روی به هم متصل شده و به صورت ساختارهای هگزامر در گرانول‌های ترشحی بالغ ذخیره می‌شوند (Dodson and Steiner, 1998).

۱-۳-۳ عوامل محرک ترشح انسولین

افزایش گلوکز خون، مهمترین عامل فیزیولوژیک تنظیم کننده ترشح انسولین از سلول‌های بتا پانکراس است. علاوه بر افزایش گلوکز خون، اسیدهای آمینه آرژنین، لیزین و لوسین نیز از محرک‌های قوی ترشح انسولین هستند. پلی‌پپتید مهار کننده معده‌ای، گاسترین و سکرتین از طریق افزایش غلظت آدنوزین مونوفسفات حلقوی[2] داخل سلولی در تحریک ترشح انسولین شرکت می‌کنند. غلظت‌های زیاد هورمون رشد، کورتیزول، استروژن و پروژسترون در دراز مدت منجر به افزایش ترشح انسولین می‌شوند (Clenaghan, 2007).

۱-۳-۴ گیرنده انسولین

انسولین برای شروع اثراتش بر سلول هدف، ابتدا به گیرنده پروتئینی غشایی خود متصل شده و آن را فعال می‌کند. گیرنده هتروتترامری انسولین از دو زیر واحد آلفا و دو زیر واحد بتا تشکیل شده است که با

1- Pre pro insulin
2- Cyclic adenosine monophosphate: cAMP