دانشکده علوم پایه

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست شناسی گرایش فیزیولوژی جانوری

عنوان پایان نامه
تاثیر محیط ثانویه حاصل از کشت پانکراس موش بر تمایز سلول های بنیادی

استاد راهنما

دکتر فریبا اسماعیلی

استادان مشاور
دکتر فریبا هوشمند

پژوهشگر:
اکرم منصوری بیدکانی

دی ماه 1390

دانشکده علوم پایه

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست شناسی گرایش فیزیولوژی جانوری

در تاریخ.1390/10/27 .با حضور هیأت داوران زیر بررسی و بـا رتبـه/نمـره 19/83 مـورد تصویب نهایی قرار گرفت

استاد راهنمای پایان نامه دکتر فریبا اسماعیلی با مرتبه علمی استادیار امضاء
استاد مشاور پایان نامه دکتر فریبا هوشمند با مرتبه علمی استادیار امضاء
استادان داور پایان نامه دکتر هدایت الله شیرزاد و دکتر محمد سعید حیدرنژاد بـا مرتبـه علمـی امضاء

دکتر ابوالفضل سمنانی.
معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی
دانشکده علوم پایه

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات
و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه
متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

خدایا:

به من توفیق عطا کن تا آنچه ـ مرا انوا نش بخشیده ا یگر گذا باشم و به آنان که ذوایای تیره اندیشه آموزگاری خو یش روشن نمو ده اند ا هر فراوان ده و مرا آن شا یستگی عنا یت فرما تا در بازمانده حیات خو یش سزاوار دا نش آفرین جا نب تو باشم و عنا یتی کن تا آموخته ام بی بود نباشد و بتوانم به یاری علم کی مرا دادگانی بنده تبرای تو و یاوری توانا برای بندگانت باشم.

ا ی پدر مهربان که نمود خود ا ختصاص ده و دا نش آنچه ـ را از حقوق ا یشان بمن لازم است به من عطا کن ا ینک قدردا نی و سپاس دارم از اساتید فرهیخته و گرانقدر مرکز خا نم مهر که تحولی عمیق و آفرینشگر در ذهن و آقای دکتر ناصر راهنما که تجربه ان و سرکار خا نم دکتر گیتی امتیازی اساتید مشاور که با حوصله و تواضع فراوان هدایتگر من در انجام این پژوهش بودند.

سپاس خدای را که به من نیز اندیشیدن آموخت.

تقدیم به:

مادرم

سرمایه عاطفی وجودم

و

پدرم

پشتوانه تکیه گاه زندگی ام

و همه کسانی که دوستشان دارم

چکیده:

حدود ۱۵۰ میلیون بیمار دیابتی در سراسر جهان شناسایی شده است. پیوند جزایر پانکراس به عنوان روش مؤثری برای درمان چنین بیمارانی در نظر گرفته شده است. اما مانع عمده در این مسیر کمبود جزایر پانکراس است. مطالعات بسیاری به منظور توسعه جزایر پانکراس و منابع تجدید پذیر بافت جزیره ای جایگزین، انجام شده است. مطالعات اخیر نشان می‌دهد بسیاری از انواع سلول های بنیادی می توانند به عنوان منابع احتمالی برای بدست آوردن سلول های قابل پیوند تولید کننده انسولین (IPCs) باشند. سلول های بنیادی کارسینومای جنینی از نظر تکوینی پرتوان بوده و تحت شرایط مناسب می توانند به همه انواع سلولی تمایز یابند. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر محیط کشت ثانویه پانکراس بر تولید IPCs از سلول های EC (P19) تمایز نیافته انجام شد. نتایج نشان داد که محیط کشت مذکور توانست تمایز این سلول ها را به IPCs به صورت وابسته به غلظت القا کند. اوج پاسخ تمایزی در غلظت ۵۰% محیط کشت ثانویه بود. رنگ آمیزی دیتیزون برای ردیابی IPCs مشتق از EC استفاده شد. سلول های تمایز یافته نسبت به پروتئین های ویژه سلول های بتا، یعنی انسولین-پروانسولین و رسپتور پاسخ ایمنی مثبت دادند. RT-PCR بیان ژن مربوط به سلول بتای پانکراس یعنی Pdx-1 را نشان داد. نتایج حاصل از این پژوهش مشخص نمود که تولید سلول های IPCs با ویژگی های سلول های بتای پانکراس از سلول های تمایز نیافته EC امکان‌پذیر است.

واژه های کلیدی: سلول های بنیادی کارسینومای جنینی، محیط کشت ثانویه، سلول های تولید کننده انسولین، انسولین – پروانسولین، گیرنده بتا، Pdx-1.

فهرست مطالب صفحه

فصل اول: مقدمه ۶
۱-۱ آناتومی پانکراس ۶
۱-۲ بافت‌شناسی پانکراس ۷
۱-۳ فاکتورهای موٴثر بر بیان ژن انسولین ۸
۱-۴ جنین شناسی پانکراس ۱۰
۱-۵ تکوین طبیعی بخش پشتی و شکمی پانکراس ۱۳
۱-۶ تکوین آزمایشگاهی بخش پشتی و شکمی پانکراس ۱۴
۱-۷ زمانبندی فرایندهای ریخت زایی و تمایز سلولی در پانکراس در حال تکوین ۱۶
۱-۸ تکوین جزایر لانگرهانس ۱۷
۱-۹ کنترل تمایز سلول‌های بتا به وسیله مزانشیم ۲۰
۱-۱۰ عوامل موثر در تکوین پانکراس ۲۱
۱-۱۱Isl1 ۲۲
۱-۱۲Hes1، Ngn3 و مسیر سیگنال رسانی Notch ۲۲
۱-۱۳ Pax4 ۲۳
۱-۱۴ Pax6 ۲۳
۱-۱۵ Nkx2.2 و Nkx6.1 ۲۳
۱-۱۶ MafA و MafB ۲۴
۱-۱۷Mist1 ۲۴
۱-۱۸ Pdx-1 ۲۴
فصل دوم: مروری بر مطالعات گذشته ۲۷
۲-۱تمایز سلول‌های بنیادی به سلول های β در شرایط آزمایشگاهی ۲۷
۲-۲ تولید سلول های ترشح کننده انسولین از سلول‌های کبدی ۳۰
۲-۳ تمایز سلول‌های بنیادی بند ناف به سلول های بتا پانکراس ۳۰
۲-۴ تمایز سلول‌های بنیادی چند استعدادی پوست به سلول‌های تولید کننده انسولین ۳۰
۲-۵ تمایز سلول‌های مزانشیم مغز استخوان به سلول‌های انسولین‌ساز ۳۱
۲-۶ تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های انسولین‌ساز ۳۱
۲-۷ تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسان به سلول‌های انسولین مثبت ۳۳
۲-۸ تمایز سلول‌های انسولین‌ساز از سلول‌های پیش‌ساز عصبی ۳۴
۲-۹ تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی انسان به سلول‌های انسولین‌ساز ۳۴
۲-۱۰تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی به سلول‌های ترشح کننده انسولین به وسیله لامینین و فیبرونکتین ۳۵
۲-۱۱تمایز سلول‌های کارسینومای جنینی ۳۵
۲-۱۲ محیط کشت ثانویه ۳۶
فصل سوم: مواد وروش‌ها 42
۳-۱ کشت وتکثیر سلول‌های سرطانی جنینی P19 ۴۲
۳-۲ انجماد و ذخیره سلول‌های سرطانی جنینی P19 ۴۴

۳-۳ حیوان آزمایشگاهی ۴۴
۳-۳-۱ جداسازی و کشت سلول‌های پانکراس موش نوزاد یک هفته‌ای نژاد balb/c ۴۵
۳-۳-۲ کشت اولیه پانکراس ۴۵
۳-۴ کشت چسبنده سلول در ظرف کشت ژلاتینه شده ۴۸
۳-۵ رنگ آمیزی دیتیزون ۴۹
۳-۶ تهیه محیط کشت ثانویه پانکراس ۵۰
۳-۷ القای تمایز سلول‌های سرطانی جنینی P19 به سلول‌های انسولین‌ساز با استفاده از محیط کشت ثانویه پانکراس موش یک هفته‌ای ۵۰
۳-۷-۱ تولید اجسام شبه جنینی ۵۰
۳-۷-۲ تکثیر سلول‌ها ۵۱
۳-۷-۳ القای تمایز ۵۲
۳-۷-۳-۱ پروتکل تمایز سلول‌های کارسینومای جنینی P19 به سلول های انسولین‌ساز به روش انتخاب سلول‌های نستین مثبت با استفاده از محیط کشت ثانویه پانکراس نوزاد موش یک هفته‌ای ۵۲
۳-۷-۳-۲ القای تمایز مستقیم سلول‌های کارسینومای جنینی P19 به سلول‌های انسولین‌ساز با استفاده از محیط کشت ثانویه پانکراس نوزاد موش یک هفته‌ای ۵۲
۳-۷-۴ تعیین غلظت مناسب محیط کشت ثانویه برای القای تمایز سلول‌های انسولین‌ساز از سلول‌های سرطانی جنینی P19 ۵۴
۳-۷-۵ بررسی بیان نشانگرهای پروانسولین و رسپتور انسولین سلول‌های تمایز یافته به روش ایمنوفلورسنس ۵۵
۳-۷-۶ بررسی بیان ژن Pdx-1 در سلول‌های انسولین‌ساز تمایز یافته ۵۷
۳-۸ استخراج آ ر ان ا کل از سلول کشت شده ۵۷
۳-۸-۱ روش جداسازی آ ر ان ا کل ۵۹
۳-۸-۲ تعیین غلظت آ ر ان ا استخراج شده ۶۱
۳-۸-۳ الکتروفورز ژل آگارز ۶۱
۳-۸-۴ واکنش رونویسی معکوس ۶۵
۳-۸-۵ واکنش PCR ۶۹
۳-۹ طراحی پرایمر ۶۷
فصل چهارم: نتایج ۷۰
فصل پنجم: بحث ۷۷
۵-۱ جدا سازی و کشت سلول‌های پانکراس نوزاد یک هفته ای موش کوچک آزمایشگاهی ۷۷
۵-۲ تمایز سلول های سرطانی جنینی (P19) به سلول های انسولین ساز ۷۸
۵-۳ تعیین غلظت مناسب محیط کشت ثانویه برای القای فنوتیپ سلول های انسولین ساز ۷۸
۵-۴ بررسی مورفولوژیک سلول های انسولین ساز حاصل از اثر محیط کشت ثانویه پانکراس نوزاد یک هفته ای موش کوچک آزمایشگاهی ۷۹
۵-۵ ارزیابی نشانگرهای سلول‌های انسولین‌ساز در سلول‌های تمایز یافته با اثر محیط کشت ثانویه به روش ایمنوفلورسنس ۷۹

۵-۶ ارزیابی بیان ژن فاکتور pdx-1 در سلول‌های سرطانی جنینی P19 تیمار شده با محیط کشت ثانویه پانکراس نوزاد یک هفته‌ای موش کوچک آزمایشگاهی 81
منابع 83

فهرست شکل‌ها

شکل 1-1: پانکراس 8
شکل 1-2: پروموتر ژن انسولین 10
شکل 1-3: مقطع ساژیتال رویان در مراحل مختلف تشکیل 11
شکل 1-4: مراحل تشکیل پانکراس 12
شکل 1-5: پانکراس در هفته ششم 12
شکل 1-6: نمایی شماتیک از منشأ و ریخت زایی در مراحل ابتدایی تکوین بخش پشتی و شکمی پانکراس 14
شکل 1-7: تکوین بخش پشتی و شکمی پانکراس از کل روده جنین موش یازده روزه در شرایط آزمایشگاه 15
شکل 1-8: تکوین پانکراس موش 17
شکل 1-9: سیگنال‌هایی از بافت‌های اطراف آندودرم پانکراس، تکوین جزایر لانگرهانس و بلوغ سلول های اندوکرین را تحریک می‌کند. 19
شکل 1-10: تمایز سلول بتا 20
شکل 4-1: بافت پانکراش موش یک هفته‌ای 71
شکل 4-2: اجسام شبه جنینی 71
شکل 4-3: رنگ آمیزی دیتیزون سلول‌های انسولین‌ساز 72
شکل 4-4: تمایز سلول های بنیادی کارسینومای جنینی(انسولی‌ن-پروانسولی‌ن) 73
شکل 4-5: تمایز سلول های بنیادی کارسینومای جنینی(رسپتور بتا) 74
شکل 4-6: الگوی باندینگ RNA سالم 74
شکل 4-7: بررسی بیان ژن pdx-1 در سلول‌های تمایز یافته 75

فهرست جدول‌ها

جدول 3-1: محدوده جداسازی در ژل با درصدهای متفاوت آگارز 63
جدول 3-2: برنامه واکنش PCR در دستگاه ترمال سایکلر 69
جدول 4-1: اثر محیط کشت ثانویه بر تمایز سلول‌های P19 76

فصل اول

مقدمه

۱-۱ آناتومی پانکراس

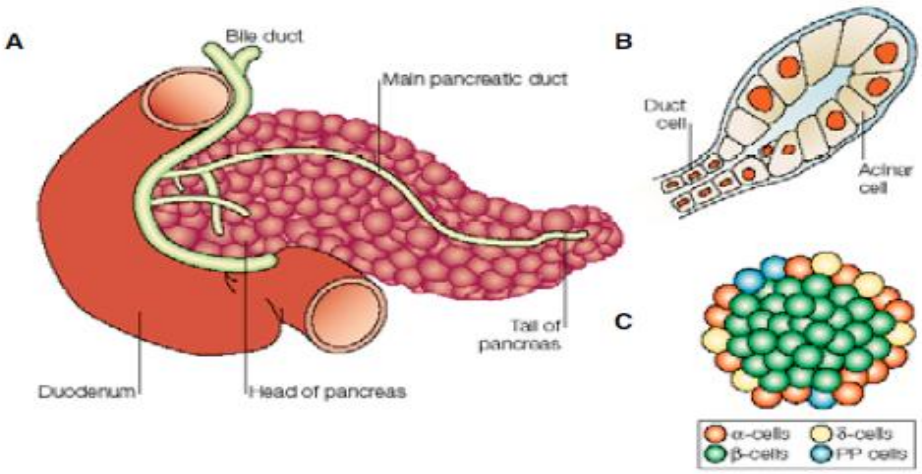
پانکراس یا لوزالمعده غده‌ای است به طول تقریبی ۱۵ سانتی‌متر که در خلف صفاق قرار گرفته دارای سر، گردن، تنه و دم می‌باشد سر پانکراس به داوازده متصل است. این عضو در جلو ورید اجوف تحتانی، آئورت و کلیه چپ قرار داشته و دم آن تا طحال ادامه می‌یابد. پانکراس دارای یک مجرای اصلی یا مجرای ویرسونگ است که پس از اتصال به مجرای ویرسونگ است که پس از اتصال به مجرای صفراوی مشترک به داوازده باز شده و یک مجرای فزعی که کمی بالاتر از پاپیلای کوچک داوازده باز می‌شود (امینی، ۱۳۷۹). سطح قدامی پانکراس با سطح خلفی معده مجاور است. سطح تحتانی آن نیز با زاویه دئودنوژوژنال و زاویه کولیک چپ مجاورت دارد. در قسمت فوقانی سطح خلفی دو ناودان عرضی وجود دارد که از ناودان فوقانی شریان و از ناودان تحتانی ورید طحالی عبور می‌کند. در انتهای راست کنار فوقانی، یک برجستگی به نام توبروزیته امنتال، تنه سلیاک از آئورت منشعب می‌شود. دم پانکراس در داخل دو لایه پریتونئال قرار گرفته است و توسط رباط لینورنال به ناف طحال متصل است شریان و ورید طحالی نیز در ضخامت آن هستند. مجاری مترشحه پانکراس عبارتند از مجرای پانکراتیک فرعی وارد پاپیلادئودنئال مینور می‌شود. شریان‌های پانکراس از شریان طحالی، شریان هپاتیک و شریان مزانتریک فوقانی می‌آیند. وریدها نیز هم‌نام شریان‌ها هستند و بالاخره وارد پورتال می شوند. اعصاب نیز از شبکه سیالیک می‌آیند (خاکی، ۱۳۷۹).

۱-۲ بافت شناسی

پانکراس شامل دو بخش درون ریز و برون‌ریز است که آنزیم‌های که آنزیم‌های گوارشی و هورمون‌ها را تولید می‌کنند. آنزیم‌های تولید شده توسط سلول‌های بخش برون‌ریز که به شکل آسینوس‌ها مرتب شده‌اند، ذخیره و ترشح می‌شوند. هورمون‌ها در توده‌هایی از سلول‌های پوششی آندوکرین به نام جزایر لانگرهانس سنتز می‌شود. بخش برون ریز پانکراس، غده آسینار مرکبی مشابه غده پاروتید است. در مقاطع هیستولوژیک، از

اتصال مجاری بینابینی، مجاری داخل لوبولی بزرگتر تشکیل می‌شوند این مجاری به یکدیگر متصل شده و مجاری بین لوبولی بزرگ‌تر را ایجاد می‌کنند که با اپی‌تلیوم منشوری مفروش شده‌اند و در داخل بافت همبند سپتوم‌ها قرار می‌گیرند. سیستم مجاری پانکراس فاقد مجاری مخطط است. آسینوس‌های برون ریز پانکراس از تعدادی سلول‌های سروزی که یک حفره را احاطه کرده‌اند تشکیل شده است. این سلول‌ها به شدت قطبی اند، یک هسته کروی دارند و مشخصه‌های سلول‌های ترشح کننده پروتئین را نشان می‌دهند. تعداد گرانول‌های زیموژنی که در هر سلول وجود دارد وابسته به مرحله گوارشی است و در حیواناتی که گرسنه هستند به حداکثر می‌رسد. جزایر لانگرهانس از اعضای درون ریز کوچکی تشکیل شده‌اند که هورمون‌های مختلفی تولید می‌کنند. این جزایر به صورت توده های گرد سلولی در میان بافت برون ریز پانکراس قرار دارند (شکل۱-۱) (رجحان، ۱۳۷۴). جزایر لانگرهانس به طور عمده در ناحیه دمی پانکراس وجود دارند (eduard,2006). اگرچه اغلب این جزایر بین صد تا دویست میکرومتر قطر دارند و دارای چند صد سلول هستند؛ ولی گروه‌های کوچک سلول‌های اندوکرین نیز در میان سلول‌های اگزوکرین پانکراس یافت می‌شوند. در انسان تعداد جزایر لانگرهانس پانکراس ممکن است متجاوز از یک میلیون باشد که تعداد این جزایر در ناحیه دمی پانکراس کمی بیش از سایر نواحی این غده است. کپسول ظریفی از الیاف رتیکولر، هر یک از نواحی را در بر می‌گیرد و آن را از بافت پانکراسی مجاور جدا می‌کند. هر جزیره از سلول‌های چند وجهی یا گردی که به صورت طناب‌هایی قرار گرفته و دارای خاصیت رنگ پذیری کمی هستند تشکیل شده است. این طناب‌ها با شبکه‌ای از مویرگ‌های خونی از یکدیگر جدا می‌شوند (شکل۱-۱). پنج نوع سلول به نام های آلفا، بتا، دلتا، اپسیلون و پلی‌پپتید پانکراسی [۱] در جزایر لانگرهانس شناسایی شده‌اند (Hideaki, 2008). در صفحات سلولی بخش درون ریز پانکراس سلول های ترشح کننده سروتونین نیز قرار دارند (رجحان، ۱۳۷۴). گرانول‌های ترشحی سلول‌های جزایر لانگرهانس بر حسب گونه جانوری مورد بررسی، متفاوت هستند. در انسان، سلول‌های نوع A دارای گرانول‌های منظم با یک هسته مرکزی متراکم هستند که در اطراف این هسته یک ناحیه روشن و پس از آن غشای گرانول قرار دارد. سلول‌های نوع B مولد انسولین دارای گرانول‌های نامنظم هستند و بخش مرکزی گرانول از کریستال‌های نامنظم انسولین که با فلز روی (zn) ترکیب شده‌اند، تشکیل می‌شود. سلول‌های ε هورمون گرلین [۲] را ترشح می‌کنند (Hideaki, 2008). تعداد این نوع سلول‌ها نسبت به یکدیگر در جزایر مختلف مقدار ثابتی نیست و بسته به محل مورد بررسی در پانکراس تفاوت‌های چشمگیری دارد. در جزایر لانگرهانس پانکراس انسان سلول‌های B یا بتا بیشترین مقدار را دارد. هم سلول‌های درون ریز و هم رگ‌های خونی جزایر با رشته‌های عصبی خودکار تغذیه می‌شوند. پایانه‌های سمپاتیک و پاراسمپاتیک، در ارتباط نزدیک با حدود ده درصد از سلول‌های A، B و D دیده شده‌اند. این اعصاب در واقع بخشی از سیستم کنترل انسولین و گلوکاگون هستند. احتمالاً ارتباطی از نوع اتصالات سوراخدار تغییرات یونی حاصل از تخلیه نورون‌های خودکار را به سلول‌های دیگر منتقل می‌کنند (رحجان, ۱۳۷۴).

[۱] pancreatic polypeptide
[۲] Ghrelin



شکل۱-۱: پانکراس شامل دو بخش اندوکرین و اگزوکرین است. A) پانکراس بالغ در مجاورت دئودنوم است. B) بخش اگزوکرین پانکراس آنزیم‌های گوارشی را تولید و ترشح می‌کند. این آنزیم‌ها از طریق سیستم مجرایی پانکراس به روده کوچک منتقل می‌شوند.

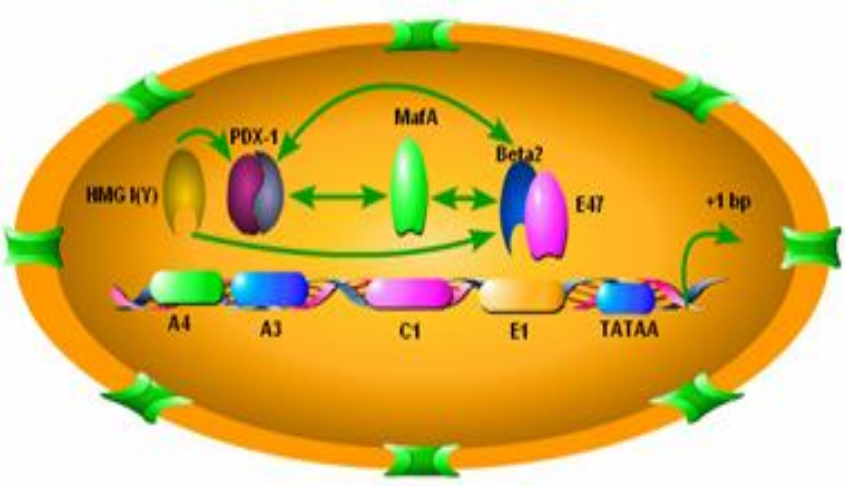
کپسول نازکی از جنس بافت همبند، پانکراس را پوشانده و تیغه‌هایی به داخل این غده می‌فرستد این کپسول پانکراس را به لوبول‌هایی تقسیم می‌کند. آسینوس‌ها با تیغه پایه احاطه شده‌اند. این تیغه پایه خود با غلاف ظریفی از رشته‌های رتیکولر پشتیبانی می‌شود. پانکراس دارای یک شبکه مویرگی غنی است که در فرایند ترشح این غده اهمیت دارد (منتظری، ۱۳۸۷).

۱-۳ فاکتورهای موٴثر بر بیان ژن انسولین

سلول‌های بتا در قسمت مرکزی جزایر لانگرهانس دارند و به وسیله انواع سلول‌های دیگر احاطه شده‌اند. سلول های بتا تولید کننده انسولین، شصت تا هشتاد درصد از سلول‌های اندوکرین را به خود اختصاص می‌دهند. این سلول‌ها در پاسخ به افزایش مقدار گلوکز خون بعد از جذب مواد غذایی انسولین ترشح می‌کنند. انسولین ترشح شده به عنوان سیگنالی برای بافت‌های هدف مانند کبد، ماهیچه و بافت چربی عمل می‌کند تا این بافت‌ها بتوانند گلوکز را جذب کنند. به علاوه انسولین، تولید گلوکز را در کبد مهار می‌کند (Eduard, 2006). مهمترین فاکتور رونویسی انسولین در سلول‌های بتا، فاکتور رونویسی پانکراتیک/ دئودنوم همئوباکس -۱ است. در جزایر بالغ پانکراس، این فاکتور فقط در سلول‌های بتا بیان می‌شود و نقش مهمی در رونویسی ژن انسولین تحریک شده با گلوکز دارد (Jiaqiang, 2007). Pdx-1 برای حفظ فنوتیپ سلول بتا و تکوین پانکراس ضروری است. این فاکتور به باکس A3 از پروموتر ژن انسولین متصل می‌شود. Pdx-1 به تنهایی فعالیت کمی دارد؛ اما وقتی با با پروتئین هترودایمر هلیکس لوپ هلیکس بازی[۳] واکنش می‌دهد به یک فاکتور قوی تبدیل می‌شود. فاکتورهای هلیکس لوپ هلیکس کلاس A بازی هترودایمری است که در بافت‌های متنوعی بیان می‌شود؛ ولی فاکتورهای هلیکس لوپ هلیکس کلاس بازی B به صورت اختصاصی در سلول بتا بیان می‌شود. فاکتور رونویسی مهم انسولینی دیگر MafA است که به خانواده Maf از فاکتورهای رونویسی تعلق دارد.

[۳] Basic helix loope helix

فاکتور MafA به جایگاه C1 در پروموتر انسولین متصل می‌شود. MafA فاکتور رونویسی خاص سلول‌های بتا است گلوکز به وسیله فاکتورهای MafA و Pdx-1 بیان ژن انسولین را تنظیم می‌کند. علاوه بر pdx-1، E47/BETA2/NeuroD و MafA و فاکتورهای دیگر رونویسی، بیان پروتئین انسولین را تحت تاثیر قرار می‌دهند. هیستون‌ها و پروتئین‌های متصل شونده به DNA از گروه با تحرک زیاد اتصال pdx-1 و فاکتورهای هلیکس لوپ هلیکس کلاس بازی فاکتورهای هلیکس لوپ هلیکس کلاس بازی به جایگاهای E و A را افزایش می‌دهد. پروتئین با تحرک زیاد نوع یک مهمی است که به جایگاه A3/A4 از پروموتر انسولین متصل می‌شود(Ohneda, 2000). پروتئین‌های دیگر که در رونویسی انسولین شرکت می‌کنند شامل فاکتورهای هسته‌ای کبدی یا هپاتیکی و خانواده PAX هستند (شکل ۱-۲) (Poitout, 2006).

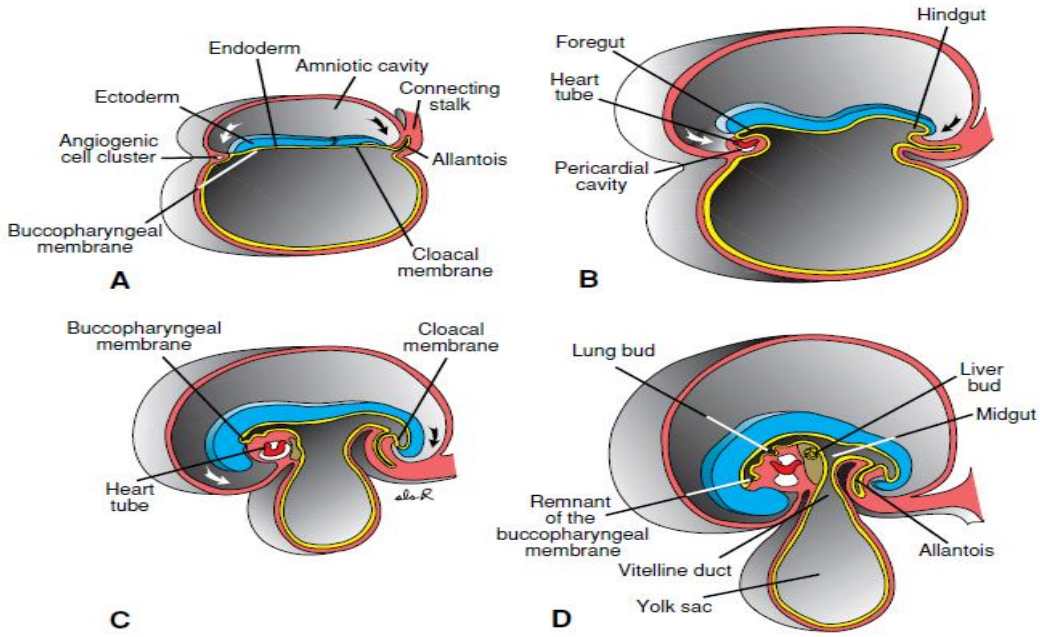


شکل ۱-۲: پروموتر ژن انسولین، سازمان دهی پروتئین مبدا و عناصر فعال‌سازی رونویسی مهم شامل فاکتورهای رونویسی نشان داده شده اند. عناصر A3، C1، E1 در بیان خاص انسولین در سلول‌های بتا به کار برده شده است. این فاکتورها منحصرا" عمل خود را با واسطه توزیع داخل سلولی فاکتورهای pdx-1، MafA و Beta2 انجام می‌دهند. علاوه بر فاکتورهای رونویسی، پروتئین‌های متصل شونده به DNA مثل HMG 1(Y) می‌توانند اتصال pdx-1 و Beta2/E47 به عناصر پاسخگو را تحریک کنند.

۱-۴ جنین شناسی پانکراس

در نتیجه چین خوردگی‌های سری- دمی و طرفی رویان، بخشی از حفره کیسه زرده که پوشش آندودرمی دارد در داخل بدن رویان قرار گرفته و روده اولیه را تشکیل می‌دهد. دو بخش دیگر حفره با پوشش آندودرمی یعنی کیسه زرده و آلانتوئیس، در خارج از بدن رویان باقی می‌مانند (شکل۱-۳ A-D) در دو قسمت انتهایی سری و دمی رویان، روده اولیه یک لوله‌ای بن بست بوده و به ترتیب پیشین روده[۴] و پسین روده[۵] را تشکیل می‌دهد. بخش میانی یا میان روده[۶] به طور موقت به‌وسیله مجرای زرده‌ای[۷] یا ساقه زرده‌ای[۸] به کیسه زرده مرتبط است (شکل ۱-D۳). آندودرم داخل مجرای گوارشی به پارانشیم غددی نظیر هپاتوسیت‌ها، سلول‌های درون ریز و سلول‌های برون ریز پانکراس تبدیل می‌شود. استروما یا بافت همبند این غدد از مزودرم احشایی مشتق می‌شود.

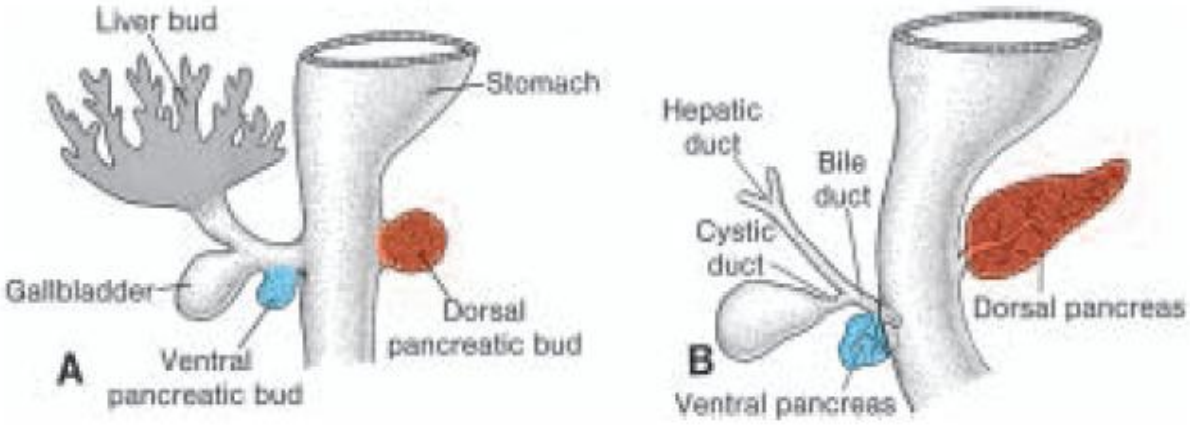
[۴] Forgut
[۵] Hindgut
[۶] Midgut
[۷] Vitellin duct
[۸] Yolk Stalk



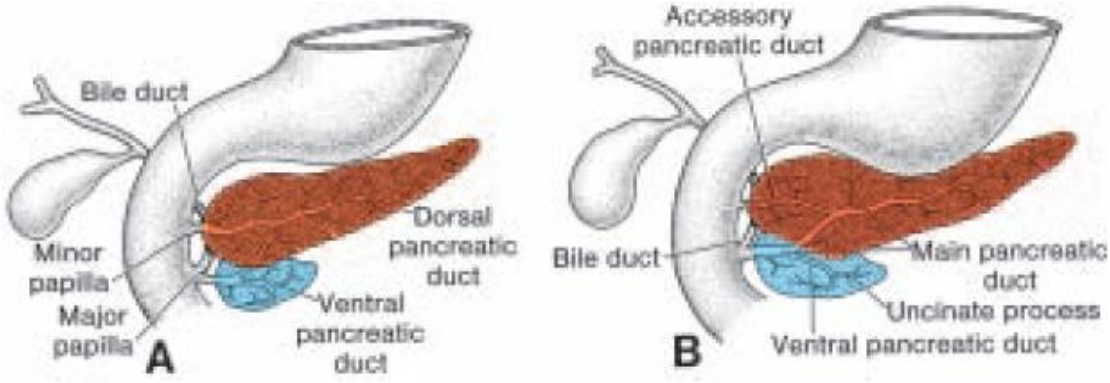
شکل۱-۳: مقطع ساژیتال رویان در مراحل مختلف تشکیل، برای نشان دادن اثر چین‌خوردگی‌های سری-دمی بر حفره‌ی پوشیده شده از آندودرم. به تشکیل پیشین روده، میان روده و پسین روده دقت کنید. A) رویان پیش از تشکیل سومیت. B) رویان با هفت سومیت. C) رویان با ۱۴ سومیت. D) پایان ماه اول (ابوالحسنی، ۱۳۸۵).

پانکراس به‌وسیله دو جوانه پشتی و شکمی که از پوشش آندودرمی دئودنوم منشا می‌گیرند، تشکیل می‌شود (شکل۱-۴). جوانه‌ی پشتی پانکراس در مزانتر پشتی قرار دارد و جوانه شکمی پانکراس نزدیک به مجرای صفراوی است (شکل ۱-۴). هنگامی که دئودنوم به سمت راست چرخیده و به شکل C در می‌آید، جوانه شکمی پانکراس به سمت عقب حرکت کرده و جابجایی آن مشابه جابجایی مدخل مجرای صفراوی است (شکل ۱-۴). سرانجام جوانه شکمی بلافاصله در زیر و پشت جوانه پشتی قرار می‌گیرد (شکل ۱-۵). سپس پارانشیم و دستگاه مجاری جوانه‌های شکمی و پشتی در هم ادغام می‌شوند (شکل ۱B-۵). جوانه‌ی شکمی، زایده‌ی چنگکی[۹] و قسمت تحتانی سر پانکراس را تشکیل می‌دهد. مابقی پانکراس از جوانه‌ی پشتی مشتق می‌شود. مجرای پانکراتیک اصلی (مجرای ویرسونگ) توسط بخش دیستال مجرای پشتی پانکراس، و همه‌ی مجرای شکمی پانکراس تشکیل می‌شود (شکل B ۱-۵). بخش پروگزیمال مجرای پشتی پانکراس یا مسدود می‌شود، یا به صورت مجرای کوچکی به نام مجرای پانکراتیک فرعی یا مجرای سانتورینی[۱۰] باقی می‌ماند. مجرای اصلی لوزالمعده همراه با مجرای صفراوی در محلی به نام پاپیلای ماژور[۱۱] به دئودنوم وارد می‌شود. ورود مجرای فرعی از طریق پاپیلای مینور[۱۲] است. در حدود ده درصد موارد مجاری ادغام نمی‌شوند، و به صورت جداگانه اولیه باقی می‌مانند.

[۹] Uncinate process
[۱۰] Major papilla
[۱۱] Majorpapilla
[۱۲] Minorpapilla



شکل۱-۴: مراحل تشکیل پانکراس. A) سی روزه (تقریبا" پنج میلی متر). B) سی و پنج روزه (تقریبا" هفت میلی متر). ابتدا جوانه شکمی پانکراس نزدیک به جوانه کبدی است؛ اما بعدا" به سمت عقب رفته؛ به سوی پشت دئودنوم و به طرف جوانه پشتی پانکراس حرکت می‌کند.



شکل ۱-۵: A) پانکراس در هفته ششم. جوانه شکمی پانکراس در تماس نزدیک با جوانه پشتی پانکراس است. B) مجرای صفراوی و مجرای حاصل از ادغام مجاری پانکراس در پاپیلای ماژور به دئودنوم وارد می‌شوند. مجرای فرعی پانکراس (در صورت وجود) در پاپیلای مینور به دئودنوم وارد می‌شود.

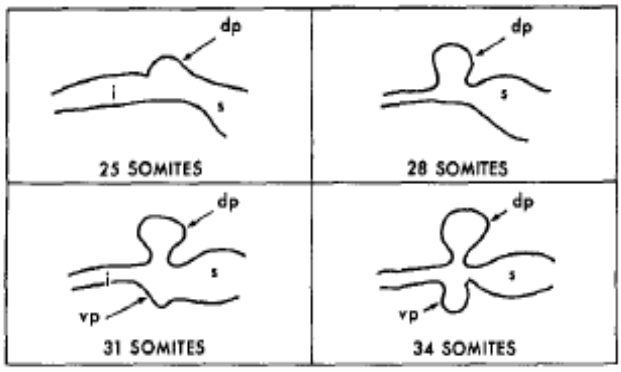
جزایر پانکراس در سومین ماه زندگی جنینی، از بافت پارانشیمی پانکراس تشکیل شده و در سراسر بافت آن پراکنده می‌شوند. ترشح انسولین حدود ماه پنجم آغاز می‌شود. سلول‌های ترشح کننده گلوکاگون و سوماتواستاتین نیز از سلول‌های پارانشیمی به وجود می‌آیند (ابوالحسنی، ۱۳۸۴). مزودرم احشایی اطراف پانکراس، بافت همبند پانکراس را تشکیل می‌دهد. فاکتور رشد فیبروبلاستی[۱۳] و اکتیوین (عضوی از خانواده‌ی TGF-β[۱۴] که توسط نوتوکورد تولید می‌شود از بیان Shh[۱۵] در آندودرم روده که منجر به تشکیل پانکراس می‌شود جلوگیری می‌کنند. در نتیجه؛ بیان ژن هومئوباکس لوزالمعده و دئودنال ۱ (pdx-1)، که ژن اصلی تشکیل پانکراس است، فعال می‌شود و به این ترتیب

[۱۳] FGF2: fibroblastic grows factor
[۱۴] Transforminggrows factor
[۱۵] Sonic hedghog

بخش پشتی و شکمی تشکیل می‌شود. سیگنال رسانی از طریق مسیرهای اکتیوین و Shh اندازه و شکل پانکراس را کنترل می کند (Wong, 2011). اگرچه همه‌ی عوامل موٴثر در تکوین پانکراس هنوز به طور کامل شناخته نشده‌اند، اما به نظر می‌رسد که فعالیت یک جفت ژن هومئوباکس Pax4 و Pax6 نحوه آرایش سلول‌های آندوکرین را در جزایر لانگرهانس تعیین می‌کنند؛ به نحوی که سلول‌هایی که هر دو ژن را بیان می‌شوند به سلول‌های بتا (انسولین)، دلتا (سوماتواستاتین)، و گاما (پلی پپتید پانکراس) تبدیل می‌کنند؛ در حالی که سلول‌هایی که فقط ژن PAX6 را بیان می‌کنند به سلول‌های آلفا (گلوکاگون) تبدیل می‌شوند (ابوالحسنی، ۱۳۸۴).

۱-۵ تکوین طبیعی بخش پشتی و شکمی پانکراس

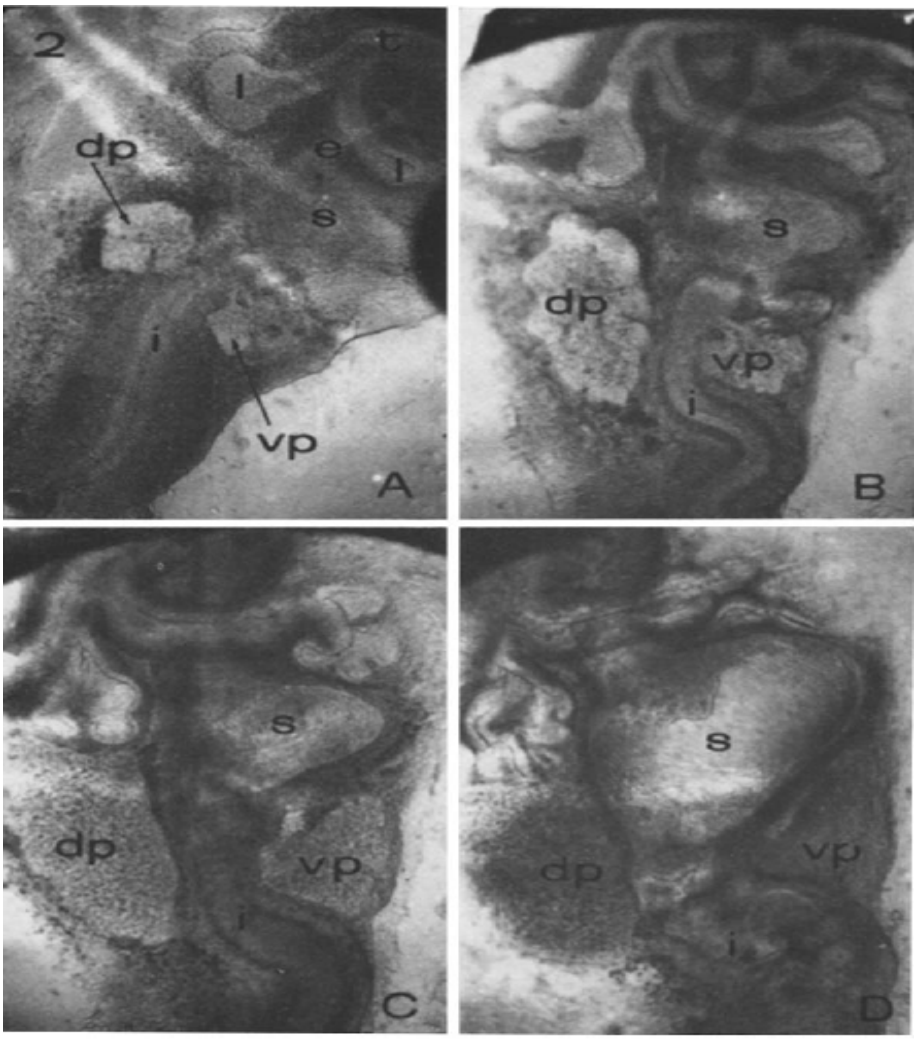
بررسی آندودرم لوله گوارش جدا شده به تشخیص زمان ایجاد دیورتیکول پانکراسی پشتی و شکمی در جنین موش کمک می‌کند. بخش پشتی پانکراس نخست به صورت برآمدگی در مراحل بیست تا بیست و پنج سومیتی (در حدود روز یازدهم جنینی) در موقعیت پشتی معده فرضی ایجاد می‌شود. پانکراس شکمی موش نخست در مرحله بیست و نه تا سی سومیتی، حدود داوزده ساعت بعد از ایجاد بخش پشتی پانکراس ایجاد می‌شود. جوانه شکمی آندودرم لوله گوارش در موقعیت جلویی-عقبی به عنوان دیورتیکول شکمی ایجاد می‌شود. هر دو بخش پانکراس از نظر جنین‌شناسی تکوین مشابهی دارند. پانکراس شکمی تا سه یا چهار روز کوچکتر باقی می‌ماند. این بخش تحت تاثیر تغییرات فیزیکی مثل ایجاد لوب در طی دوازده تا بیست و چهار ساعت بعد از بخش پشتی پانکراس تشکیل می‌شود؛ اما ساختار قابل مشاهده‌ای از آسینی‌ها در آن وجود دارد. سپس گرانول‌های زیموژن یا نابالغ در سلول‌های لوب‌های پشتی و شکمی تا روز هجدهم شکل‌گیری ایجاد می‌شوند. چرخش و انعطاف معده و روده تا روز پانزدهم در بدن جنین باعث می‌شود دو بخش پانکراس نزدیک هم قرار گیرند. ادغام شدن دو لوب نخست در روز شانزدهم انجام شده و در روز هجدهم کامل می‌شود (Brian, 1970).



شکل ۱-۶: نمایی شماتیک از منشأ و ریخت زایی در مراحل ابتدایی تکوین بخش پشتی و شکمی پانکراس. آنالوگ کبدی در حال تکوین به صورت طبیعی در جلوی بخش شکمی پانکراس وجود دارد. بررسی هایی برای این نما روی آندودرم لوله گوارش جدا شذه از جنین یازده تا دوازده روزه موش در مرحله بیست و پنج تا سی وپنج سومیتی انجام شده است. dp:پانکراس پشتی، S: معده، i: روده، vp: پانکراس شکمی

۱-۶ تکوین آزمایشگاهی بخش پشتی و شکمی پانکراس

در تحقیقی توانایی آندودرم و مزودرم اطراف آن (کل لوله گوارش) در تشکیل آزمایشگاهی پانکراس برای آنالیز بیشتر تکوین بخش پشتی و شکمی پانکراس مورد بررسی قرار گرفت (Wessells, 1967). در این آزمایش به دلیل این که لوب های کبدی جدا شده بودند، بافت کبد آشکار نشد. اما روده تمایز یافته، معده، مری، نای و شش تکوین پیدا کردند. به علاوه، بخش های پشتی و شکمی پانکراس از موقعیت های مقابل به هم لوله گوارش بوجود آمدند. ریخت زایی پانکراس در محیط کشت با تکوین طبیعی آن یکسان است بدین ترتیب که ابتدا بخش پشتی پانکراس تشکیل می شود؛ در حالی‌که بخش شکمی دوازده تا بیست و چهار ساعت بعد ظاهر می شود. اتصال بین لومن لوله گوارش و لومن پانکراس شکمی در این کشت به طور کامل برقرار شده بود. کشت مداوم دو بخش پانکراس که در موقعیت‌های مقابل هم از لوله گوارش هستند، احتمالا منجر به تشکیل گرانول‌های زیموژن می‌شود (شکل۱-۷). بررسی دقیق کشت هفت روزه بخش پشتی و شکمی پانکراس نشان می دهد که مجرای پانکراس شکمی همیشه به میزان مشابه مجرای بخش جلویی پانکراس پشتی وارد لوله گوارش می‌شود. مشاهدات میکروسکوپ الکترونی نشان دهنده وجود آسین های اگزوکرین در هر دو لوب پانکراس تا روزششم کشت است. در این زمان سلول‌های آسینار دارای تعدادی گرانول‌های زیموژن تمایز یافته هستند. به علاوه، سلول های اندوکرین تمایز یافته در هر دو لوب وجود داشته و به وسیله گرانول های ترشحی خاص آن‌ها قابل شناسایی هستند. بعد از روز هفتم کشت بافت آمیلاز در لوب‌های پشتی و شکمی بوجود می آید. در موجودات دیگر گلوکاگون در لوب های پشتی ایجاد می شود. آمیلاز و گلوکاگون به عنوان پروتئین های موجود در بخش اگزوکرین و اندوکرین پانکراس در سطوح تمایز یافته وجود دارند. با کشت آزمایشگاهی کل لوله گوارش مشخص شد که بخش پشتی و شکمی پانکراس تکوین یافته دارای مقادیر متفاوتی آمیلاز و گلوکاگون هستند. تمایز بیوشیمیایی و ریخت زایی پانکراس در لوله گوارش کشت داده شده و در حضور واسطه های مشخص رخ می دهد (Brian, 1970).



شکل ۱-۷: تکوین بخش پشتی و شکمی پانکراس از کل روده جنین موش یازده روزه در شرایط آزمایشگاه . A) روز دوم کشت، هردو لوب پانکراس از لوله گوارش بوجود آمده اند. معده شروع به شکل گرفتن کرده است، جوانه های شش تشکیل یافته اند و نای از مری جدا شده است. B) روز چهارم کشت، دو بخش پانکراس به صورت مداوم رشد یافته اند و هر دو لوب تشکیل می شوند. لوب پشتی تا این زمان اندازه خود را نسبت به لوب شکمی حفظ می کند. C) روز ششم کشت، رشد بیشتر انجام شده و هر دو بخش پشتی و شکمی پانکراس در معرض تغییرات جدا شدن قرار می گیرند. این تغییرات منجر به پیدایش آسین ها و تشکیل گرانول‌های زیموژن می‌شود. برونشیول ها همچنان منشعب می شوند. D) هفت و نیم روز پس از محیط کشت، بخش شکمی پانکراس کوچکتر از بخش پشتی پانکراس است. هر دو لوب به علت تشکیل گرانول های زیموژن نمایی شفاف به روده می دهند. پانکراس پشتی :dp,پانکراس شکمی:vp ، روده :i، معده :s، مری :e، جوانه های شش:l، نای:t

۱-۷ زمانبندی فرایندهای ریخت زایی و تمایز سلولی در پانکراس در حال تکوین

فرایند ریخت زایی و تکوین پانکراس در انسان در حدود روز بیست و پنجم جنینی (Liu,1962) و در موش در روز نهم جنینی شروع می‌شود(Slack, 1995). تشکیل جوانه پانکراس به وسیله برهم‌کنش لایه‌های زاینده آندودرم،

اکتودرم و مزودرم تا پایان گاسترولاسیون در روز هفتم جنینی موش ادامه دارد. لایه زاینده آندودرم به دستگاه گوارش و اندام های منشعب از آن مانند پانکراس تبدیل می شود. قبل از روز هشتم جنینی، آندودرم پانکراس پشتی از نوتوکورد جدا می شود. مزانشیم پشتی با تحت تاثیر قرار دادن ناحیه پانکراسی آینده و اپی تلیوم مجاور، منجر به شکل گیری حرکات درون روی جوانه پانکراس پشتی در روز نهم جنینی می شود. در روز دهم جنینی نیز جوانه شکمی پانکراس بوجود می‌آید. همان طور که هر دو بخش پشتی و شکمی پانکراس تشکیل می شوند سلول های اپی تلیال پانکراس، اطراف مزانشیم را احاطه می کنند. سیگنال های مزانشیمی، تکثیر، منشعب شدن و رشد اپی تلیوم پانکراس در حال تکوین را تحریک می کند. این سیگنال‌ها سرانجام منجر به منشعب شدن و تمایز بخش آسینار و ساختار مجرایی پانکراس، که تا روز چهاردهم جنینی به وضوح قابل تشخیص است می شوند (Pulkkinen, 2003). همان طور که معده و دئودنوم شروع به چرخش می‌کنند، جوانه های پشتی و شکمی پانکراس سرانجام به هم متصل و حدود روز هفدهم جنینی برای تشکیل یک اندام منفرد با هم ادغام می‌شوند (Golosow, 1962; Slack, 1995; Slack, 1995). نشانگرهای تمایز سلولی اندوکرین در مراحل ابتدایی تکوین پانکراس قابل شناسایی هستند. بیان mRNA سوماتواستاتین در آندودرم لوله گوارش موش در حدود روزهای هفتم تا هشتم جنینی نشان داده شده است. mRNA انسولین و گلوکاگون در روزهای هشتم تا نهم و mRNA پلی پپتید پانکراس به زودی بعد از این زمان بیان می شود. هورمون‌های گلوکاگون و انسولین در روز نهم جنینی در پانکراس قابل جداسازی است؛ اما پلی‌پپتید پانکراسی نخست در روز هجدهم جنینی یافت می‌شود. رونویسی کربوکسی پپتیداز و آمیلاز در روزهای دهم تا دوازدهم آشکار می شود. سلول های اندوکرین در مراحل ابتدایی تکوین با مجراهای پانکراسی همراه هستند و جزایر بالغ لانگرهانس محتوی سلول های تولید کننده انسولین نخست در حدود روزهای هجدهم تا نوزدهم جنینی آشکار می‌شوند (شکل۱-۸). تشکیل جزایر بالغ نیازمند حرکت سلول های اندوکرین به خارج از اپی تلیوم، مهاجرت سلول ها از طریق ماتریکس خارج سلولی، بازآرایی سلولی، و فرایند های اتصال سلولی است (Pulkkinen, 2003).