دانشکده علوم پایه

**پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی جانوری**

# تولید سلول های ترشح کننده انسولین از سلول های بنیادی با استفاده از عصاره پانکراس


**استاد راهنما:**

**دکترفریبا اسماعیلی**

**استاد مشاور:**

**دکترفریبا هوشمند**

**پژوهشگر:**

**مرضیه ابراهیمی هفشجانی**


**اسفند ماه ۱۳۹۰**


**pdfMachine**
**Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

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

**pdfMachine**
**Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

**Shahrekord University**
**Faculty of Sciences**

# Production of insulin-secreting cells from stem cells by using pancreas extract

M. Sc. thesis of the department of biology

**By:**
Marzyeh Ebrahimi

**Supervisor:**
Dr. Fariba Esmaeili

**Advisor:**
Dr. Fariba Houshmand

March. 2012

**pdfMachine**
**Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

**این مجموعه هر چند کوچک اما حاصل بزرگواری ها، صبوری ها و فداکاری های فراوان تقدیم می شود به:**

**عزیزترین و گران بهاترین هدیه های آسمانی زندگی ام:**
**آنان که بسان خورشید آسمان تاریک زندگی ام را نورانی نمودند. ستارگان پر فروغی که از درخشندگی در شب های تار نا امیدی نهراسیدند و در پیچ و خم مسیر کمال همواره یار و مدد کارم بودند.**

**پدر بزرگوارم**
**مفهوم بی دریغ مهربانی و صداقت، او که وسعت افق های پیش رویم همواره از نگاه های بلندش روشن است.**

**مادر مهربانم**
**آیینه عاطفه و پارسایی، اوکه دلخوشی های امروزم را مدیون دلواپسی های همیشگی او هستم.**

**و**
**خواهران عزیز و برادر مهربانم**
**که همواره پشتیبان و حامی من بودند**

**pdfMachine**
**Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

**با تشکر و قدردانی از:**

**بزرگوارانی که در تمامی مراحل تحصیل و تحقیق یاور و پشتیبانم بوده اند**

- **استاد فرزانه و گرانقدرسرکار خانم دکتر فریبا اسماعیلی به دلیل تلاش ها و راهنمایی های دقیق و بی دریغ شان که همواره یاری گری مطمئن در انجام این پژوهش بودند**
- **استاد ارجمند سرکار خانم دکتر فریبا هوشمند که با ارائه رهنمودهای بنیادین سهم بسزایی در به ثمر رسیدن این پژوهش داشتند**
- **جناب آقای دکتر مجید شریفی تهرانی مدیر محترم گروه زیست شناسی و سایر اساتید محترم گروه زیست شناسی دانشگاه شهرکرد**
- **سرکار خانم دکتر بهناز صفار رئیس محترم پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه شهرکرد**

**و**

- **از تمام دوستان عزیزم که به یادماندنی‌ترین و شیرین‌ترین خاطرات دوران تحصیل را برایم رقم زدند**

**pdfMachine**
**Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!**
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

## فهرست مطالب


| عنوان | صفحه |
|---|---|
| **فصل اول: مقدمه** | |
| ۱-۱ پانکراس | ۷ |
| ۱-۲ تکوین پانکراس در موش | ۹ |
| ۱-۳ تکوین پانکراس در انسان | ۹ |
| ۱-۳-۱ تکوین بخش درون ریز پانکراس | ۱۱ |
| ۱-۳-۲ نقش مزانشیم در تمایز پانکراس | ۱۳ |
| ۱-۴ هورمون انسولین | ۱۵ |
| ۱-۴-۱ ساختار شیمیایی هورمون انسولین | ۱۶ |
| ۱-۴-۲ بیوسنتز انسولین | ۱۶ |
| ۱-۴-۳ ترشح انسولین | ۱۶ |
| ۱-۴-۴ گیرنده انسولین و مسیر سیگنالی آن | ۱۷ |
| ۱-۴-۵ چگونگی عمل انسولین | ۱۷ |
| ۱-۴-۶ اثرات متابولیک انسولین | ۱۸ |
| ۱-۴-۶-۱ اثرانسولین بر متابولیسم کربوهیدرات ها | ۱۸ |
| ۱-۴-۶-۲ اثرانسولین بر متابولیسم چربی ها | ۱۸ |
| ۱-۴-۶-۳ اثرانسولین بر متابولیسم پروتئین ها | ۱۹ |
| ۱-۵ دیابت و درمان آن | ۱۹ |
| ۱-۶ سلول های بنیادی | ۲۲ |
| ۱-۶-۱ خود تجدیدی سلول بنیادی | ۲۳ |
| ۱-۶-۲ دسته بندی سلول های بنیادی بر اساس منشأ | ۲۳ |
| ۱-۶-۲-۱ سلول های بنیادی جنینی | ۲۳ |
| ۱-۶-۲-۲ سلول های بنیادی زاینده جنینی | ۲۵ |
| ۱-۶-۲-۳ سلول های بنیادی رویانی | ۲۵ |
| ۱-۶-۲-۴ سلول های بنیادی بند ناف | ۲۵ |
| ۱-۶-۲-۵ سلول های بنیادی بالغ | ۲۶ |
| ۱-۶-۲-۶ سلول های بنیادی تراتوکارسینوما | ۲۷ |
| ۱-۷ سلول های P19 | ۲۸ |
| ۱-۸ تمایز سلول بنیادی به سلول های بتای پانکراس در شرایط آزمایشگاهی | ۲۹ |
| ۱-۸-۱ تمایز سایر انواع سلول های جزایر لانگرهانس به سلول های بتا | ۳۰ |
| ۱-۸-۲ تمایز سلول های بنیادی مغز استخوان به سلول های انسولین ساز | ۳۲ |
| ۱-۸-۳ تمایز سلول های بنیادی کبدی به سلول های بتای پانکراس | ۳۳ |
| ۱-۸-۴ تمایز سلول های بنیادی جنینی به سلول های انسولین ساز | ۳۳ |
| ۱-۸-۵ تمایز سلول های بنیادی بند ناف به سلول های تولید کننده انسولین | ۳۵ |
| ۱-۸-۶ تمایز سلول های بنیادی تراتوکارسینومایی به سلول بتای پانکراس | ۳۶ |
| ۱-۹ روش های مختلف تمایز سلول های بنیادی به سلول های بتای پانکراس | ۳۶ |

۱-۱۰ عصاره پانکراس ۳۷

**فصل دوم: مواد و روش ها**

۲-۱ حیوان آزمایشگاهی ۴۳
۲-۲ استخراج و جمع آوری عصاره پانکراس از نوزاد یک تا دو هفته ای موش کوچک آزمایشگاهی ۴۴
۲-۳ تعیین غلظت پروتئین عصاره با استفاده از بردفورد ۴۷
۲-۴ کشت و تکثیر سلول های P19 ۴۹
۲-۴-۱ کشت سلول های P19 ۵۰
۲-۴-۲ منجمد کردن سلول های به منظور ذخیره سازی بلند مدت سلول های P19 ۵۱
۲-۴-۳ ذوب کردن سلول های P19 ۵۲
۲-۵ القای تمایز در سلول های P19 با استفاده از عصاره پانکراس ۵۳
۲-۵-۱ تهیه اجسام شبه جنینی ۵۳
۲-۵-۲ انتقال اجسام شبه جنینی به ظرف ژلاتینه مخصوص کشت سلول ۵۴
۲-۵-۳ القای تمایز اجسام شبه جنینی با عصاره پانکراس ۵۵
۲-۶ ارزیابی سلول های حاصل از تمایز تحت اثر عامل القایی عصاره پانکراس ۵۶
۲-۶-۱ رنگ آمیزی دیتیزون ۵۷
۲-۶-۲ شمارش سلول ها با استفاده از لام نئوبار ۵۸
۲-۶-۳ بررسی بیان نشانگرهای اختصاصی سلول های بتا در سلول های حاصل از تمایز تحت اثر القایی عصاره پانکراس به روش ایمنوفلورسنس ۵۸
۲-۶-۴ اندازه گیری میزان انسولین درون سلولی و انسولین ترشح شده توسط سلول های تمایز یافته تحت اثر القایی عصاره پانکراس به روش الایزا ۶۱
۲-۶-۴-۱ اندازه گیری میزان انسولین ترشح شده در پاسخ به تغییرات گلوکز محیط توسط سلول های تیمار شده با عصاره پانکراس ۶۱
۲-۶-۴-۲ اندازه گیری میزان انسولین درون سلولی در سلول های تمایز یافته تحت اثر القایی عصاره پانکراس ۶۲
۲-۶-۴-۳ آزمون الایزا ۶۴

**فصل سوم: نتایج**

۳-۱ تهیه عصاره پانکراس نوزاد یک تا دو هفته ای موش آزمایشگاهی وتعیین غلظت آن ۶۸
۳-۲ القای فنوتیپ سلول های انسولین سازدر سلول های P19 با استفاده از عصاره پانکراس ۷۰
۳-۲-۱ کشت و تکثیر سلول های P19 ۷۰
۳-۲-۲ تولید اجسام شبه جنینی ۷۰
۳-۲-۳ استفاده از عصاره پانکراس در القای تمایز سلول های P19 به سلول های تولید کننده انسولین ۷۱

۴-۲-۳ تعیین بهترین غلظت عصاره پانکراس جهت تمایزسلول های بتا ۷۲
۵-۲-۳ ردیابی بیان نشانگرهای اختصاصی سلول های بتا در سلول های تمایز یافته تحت تأثیر عصاره پانکراس ۷۴
۶-۲-۳ بررسی قابلیت ترشح انسولین توسط سلول های تمایز یافته در پاسخ به گلوکز به روش الایزا ۷۶
۷-۲-۳ تعیین غلظت انسولین درون سلولی ۷۶
۸-۲-۳ آزمون الایزا ۷۸
۱-۸-۲-۳ مقایسه میزان انسولین ترشح شده در پاسخ به غلظت های مختلف گلوکز توسط هر یک از نمونه ها ۸۲
۲-۸-۲-۳ مقایسه میزان انسولین ترشح شده توسط سلول های تیمار شده با غلظت های متفاوت عصاره پانکراس در محیط فاقد گلوکز ۸۳
۳-۸-۲-۳ نتایج حاصل از آنالیز آماری میزان انسولین ترشح شده توسط سلول های تیمار شده با غلظت های متفاوت عصاره پانکراس در محیط با غلظت ۵/۵ میلی مولارگلوکز ۸۴
۴-۸-۲-۳ نتایج حاصل از آنالیز آماری میزان انسولین ترشح شده توسط سلول های تیمار شده با غلظت های متفاوت عصاره پانکراس در محیط با غلظت ۲۵ میلی مولارگلوکز ۸۵
۵-۸-۲-۳ نتایج حاصل از آنالیز آماری مقدار انسولین درون سلولی ۸۵

**فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری**
۱-۴ بررسی مورفولوژی سلول های انسولین ساز حاصل از تمایز سلول های P19 تحت اثر عصاره پانکراس ۸۸
۲-۴ تعیین غلظت مناسب عصاره پانکراس جهت القای فنوتیپ سلول های انسولین ساز در سلول های P19 ۹۰
۳-۴ بررسی بیان نشانگرهای اختصاصی سلول های انسولین ساز در سلول های تمایز یافته با عامل القایی عصاره پانکراس ۹۱
۴-۴ اندازه گیری میزان انسولین ترشح شده و انسولین درون سلولی سلول های انسولین ساز در پاسخ به افزایش غلظت گلوکز محیط ۹۳
۵-۴ نتیجه گیری ۹۶
۶-۴ پیشنهادات ۹۷
**منابع** ۹۸

## فهرست اشکال


| عنوان | صفحه |
|---|---|
| شکل ۱-۱ موقعیت آناتومیکی پانکراس | ۷ |
| شکل ۱-۲ بخش درون ریز پانکراس | ۸ |
| شکل ۱-۳ پیام های داخل سلولی مؤثر در تکوین پانکراس | ۱۳ |
| شکل ۱-۴ گیرنده انسولین | ۱۷ |
| شکل ۱-۵ تمایز سلول های بنیادی غیر پانکراسی به سلول بتا | ۳۱ |
| شکل ۲-۱ نوزاد موش | ۴۳ |
| شکل ۲-۲ مراحل استخراج عصاره پانکراس | ۴۶ |
| شکل ۲-۳ مراحل تعیین غلظت عصاره پانکراس | ۴۹ |
| شکل ۲-۴ کیت الایزا | ۶۶ |
| شکل ۳-۱ منحنی استاندارد تعیین غلظت عصاره پانکراس | ۶۹ |
| شکل ۳-۲ سلول P19 | ۷۰ |
| شکل ۳-۳ اجسام شبه جنینی | ۷۱ |
| شکل ۳-۴ سلول های دیتیزون مثبت | ۷۲ |
| شکل ۳-۵ بیان نشانگرهای اختصاصی سلول های بتا | ۷۵ |
| شکل ۳-۶ منحنی استاندارد تعیین غلظت پروتئین درون سلولی | ۷۷ |
| شکل ۳-۷ منحنی استاندارد کیت الایزا | ۷۹ |
| شکل ۳-۸ نمودار میزان انسولین در غلظت های متفاوت گلوکز | ۸۱ |

## فهرست جداول

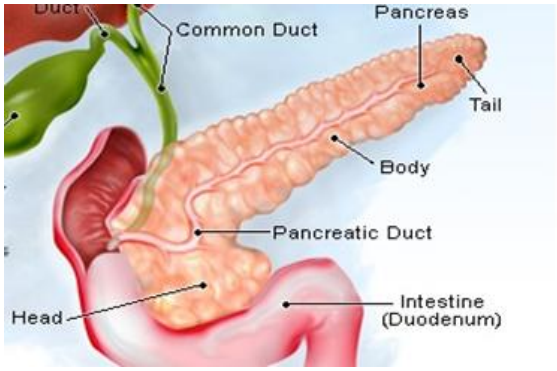

| عنوان | صفحه |
|---|---|
| جدول۲-۱ استاندارد های BSA تهیه شده برای تعیین غلظت عصاره پانکراس | ۴۸ |
| جدول۳-۱ میزان جذب نوری استاندارد های BSA تهیه شده برای تعیین غلظت عصاره پانکراس | ۶۹ |
| جدول ۳-۲ تأثیر غلظت های مختلف عصاره پانکراس نوزاد موش در تمایز سلول های بنیادی | ۷۳ |
| جدول ۳-۳ استاندارد های تهیه شده از BSA برای تعیین غلظت پروتئین درون سلولی | ۷۶ |
| جدول۳-۴ غلظت کل پروتئین درون سلولی در گروه های آزمایش | ۷۷ |
| جدول۳-۵ نتایج حاصل از اسپکتروفتومتری استانداردهای کیت الایزا | ۷۸ |
| جدول۳-۶ نتایج حاصل از اسپکتروفتومتری گروه های آزمایش | ۷۹ |
| جدول۳-۷ غلظت نرمال شده انسولین در گروه های آزمایش بر حسب نانوگرم بر میلی لیتر | ۸۰ |

# فصل اول

## مقدمه

## ۱-۱ پانکراس

پانکراس یا لوزالمعده یکی از غدد بزرگ گوارشی است که به طور موازی با معده و در زیر آن قرار گرفته است. طول تقریبی آن ۲۲ سانتی متر و وزن آن ۱۰۰ تا ۱۵۰ گرم است. پانکراس از نظر تشریحی به سه قسمت سر، تنه و دم تقسیم می‌شود (شکل ۱-۱). اطراف پانکراس را کپسولی از جنس بافت پیوندی احاطه کرده است که در بعضی نواحی به وسیله مزوتلیوم صفاق پوشیده می‌شود. از کپسول محیطی استطاله‌هایی به داخل غده وارد می‌شود و آن را به لوب‌هایی تقسیم می‌کند؛ ولی این تقسیم بندی چندان واضح و مشخص نیست (Ellis, 2007). پانکراس در ناحیه سر به دوازدهه متصل است و مجرای اصلی آن یا مجرای ویرسونگ بعد از اتصال به مجرای مشترک صفراوی به دوازده باز می‌شود.



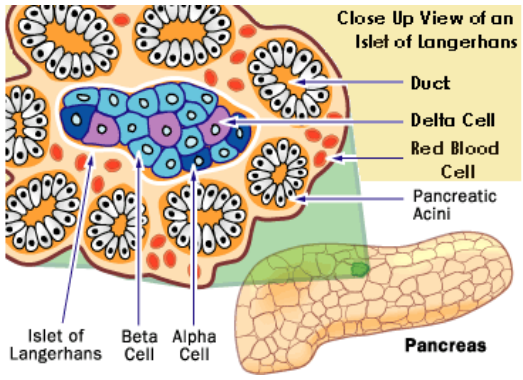

**شکل ۱-۱ موقعیت آناتومیکی پانکراس. این اندام در انحنای معده قرار گرفته و از سه قسمت سر، تنه و دم تشکیل شده است** (Ellis, 2007).

پانکراس از دو نوع بافت اصلی تشکیل شده که عبارتند از: ۱)سلول های آسینار[1] که شیره گوارشی را به داخل دوازدهه ترشح می‌کنند و بخش برون ریز پانکراس[2] را تشکیل می‌دهند. این بخش تولید کننده آنزیم‌های آمیلاز, لیپاز, فسفاتاز و پروآنزیم‌هایی مثل الاستاز، پروکربوکسی پپتیداز، تریپسینوژن، پپسینوژن و داکسی ریبونوکلئاز می‌باشد ۲) جزایر لانگرهانس که هورمون‌های گلوکاگون، سوماتوستاتین، پلی‌پپتید پانکراس[3] و انسولین را تولید و مستقیماً به داخل خون ترشح می‌کنند. این جزایر بخش درون ریز[4] پانکراس را تشکیل می‌دهند. بخش درون‌ریز پانکراس به صورت توده‌های روشنی لابه‌لای سلول‌های مجرایی پانکراس پراکنده شده است. اگر چه 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 می شوند. تعداد این جزایر در انسان بالغ به طور متوسط به یک تا دو میلیون می‌رسد. تعداد جزایر لانگرهانس در بخش انتهایی پانکراس بیشتر از بخش ابتدایی آن است. هر جزیره از سلول‌های چند وجهی یا گردی که به صورت طناب‌هایی قرار گرفته‌اند و دارای خاصیت رنگ‌پذیری کمی هستند تشکیل شده است. این طناب‌ها با شبکه‌ای

[1] Acinar
[2] Exocrine
[3] Pancreatic polypeptid: p.p
[4] Endocrine

از مویرگ‌های خونی از یکدیگر جدا می‌شوند. هم سلول‌های درون ریز و هم رگ‌های خونی جزایر با رشته‌های عصبی خودکار عصب‌دهی می شوند (Gao et al., 2003). پایانه‌های سمپاتیک و پاراسمپاتیک، در ارتباط نزدیک با سلول‌های جزایر هستند و در واقع بخشی از سیستم کنترل کننده ترشح انسولین و گلوکاگون را تشکیل می‌دهند (Skandalakis et al., 1993). با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی مشخص شده که هر جزیره لانگرهانس از چند نوع سلول به شرح زیر تشکیل شده است ( شکل ۱-۲).

- سلول های آلفا[1] یا سلول‌های A: این سلول‌ها پانزده تا بیست درصد سلول‌های جزایر پانکراس را تشکیل می‌دهند و از سایر سلول‌های مستقر در جزایر لانگرهانس درشت‌ترند. تعداد سلول های A در نواحی محیطی جزایر بیشتر از نواحی مرکزی است. دو نوع سلول A وجود دارد. نوع اول هورمون گاسترین ترشح می‌کند و نوع دوم در پاسخ به کاهش گلوکز خون هورمون گلوکاگون را ترشح می‌کند.
- سلول‌های بتا[2] یا سلول های B: سلول های B کوچکتر و فراوان‌تر از سلول‌های A هستند. حدود شصت و پنج تا نود درصد کل سلول‌های پانکراسی را تشکیل می‌دهند. این سلول‌ها بیشتر در مرکز جزایر قرار دارند و در پاسخ به کاهش گلوکز، هورمون انسولین را تولید می‌کنند.
- سلول‌های دلتا[3] یا سلول‌های C: این سلول‌ها تقریباً ده تا سی در صد سلول‌های پانکراس را تشکیل می‌دهند و هورمونی به نام سوماتواستاتین ترشح می‌کنند. این هورمون آزاد شدن هورمون انسولین و گلوکاگون را مهار می‌کند. علاوه بر این ماده‌ای به نام پپتید روده‌ای مؤثر بر عروق[4] تولید می کنند. VIP غدد برون ریز پانکراس را تحریک می‌کند.
- سلول‌های F: این سلول‌ها نه فقط در جزایرلانگرهانس وجود دارند؛ بلکه در بین سلول‌های برون ریز نیز پراکنده‌اند و هورمون پلی پپتید پانکراسی را ترشح می کنند (Snoeck et al., 1990).




**شکل۱-۲ بخش درون ریز پانکراس. جزایر لانگرهانس در بین سلول های مجرایی پراکنده شده اند و شامل سلول های آلفا، بتا و دلتا هستند** (Sno.k et al., 1990)

[1] Alpha cells
[2] Beta cells
[3] Delta cell
[4] Vascular Intestinal peptide: VIP

## ۱-۲ تکوین پانکراس در موش

بعد از شکل‌گیری محور جلویی- پشتی بدن جنین و کامل شدن مرحله گاسترولاسیون که از روز ششم مرحله جنینی آغاز شده است، در حدود روز هشتم اندودرم نهایی جنین تشکیل لوله گوارش را آغاز می‌کند. بیان فاکتورهای نسخه برداری ویژه لوله گوارش مانند فورین[1] در این مرحله آغاز می‌شود. در حدود روز نهم سلول‌های اندودرم لوله گوارشی در ناحیه‌ای که محل اتصال بخش میانی و پشتی روده است جدا شده و ژن های هومئوباکس دئودنال پانکراسی-۱[2] نوروژنین۳[3] و فاکتور هسته‌ای هپاتوسیت۱ [4] را به طور ویژه بیان می‌کنند (شکل ۱-۳). در آغاز این مرحله سیگنال‌های واسطه‌ای رتینوئیک اسید نقش اساسی را در ایجاد الگودهی روده و ناحیه پانکراس آینده جنین ایفا می کنند (Prado et al., 2004). در جنین نه روزه شواهد مورفولوژیکی اولیه پانکراس ظاهر می شود؛ بدین صورت که بخشی از ناحیه پشتی روده ضخیم شده و جوانه پانکراسی را ایجاد می‌کند. در این مرحله به وسیله پیام‌های ارسالی از نوتوکورد بیان فاکتورهای رشد فیبروبلاستی[5] در جوانه پانکراسی آغاز می‌شود و جوانه تخصص یافتگی لازم را برای ایجاد پانکراس پیدا می-کند (St-Onge et al., 1997).

## ۱-۳ تکوین پانکراس در انسان

در انسان اولین نشانه از تشکیل پانکراس در روز نهم و در مرحله بیست و دو تا بیست و پنج سومیتی مشاهده می‌شود. در این مرحله مزانشیم پشتی منقبض شده و برون خزیدگی منطقه اندودرمی از جوانه پشتی رخ می‌دهد. جوانه شکمی در کنار کبد در مرحله سی سومیتی شکل می‌گیرد. وقتی لوله گوارش در مرحله پنجاه و شش تا شصت سومیتی یا روز چهارده‌ام جنینی در جهت عقربه‌های ساعت می‌چرخد دو جوانه پانکراسی در ناحیه پشتی و شکمی روده ایجاد می‌شوند. در حدود هفته پنجم جنینی جوانه شکمی به سمت جوانه پشتی مهاجرت می‌کند. این دو جوانه یک هفته بعد به هم متصل می‌شوند. پیام‌های از مزودرم باعث تکثیر سلول‌های اپیتلیال پانکراس و مهاجرت و برون خزیدگی این سلول‌ها می‌شود. آندودرم پشتی قبل از اتصال به آئورت پشتی در مجاورت نوتوکورد است. در این مرحله آندودرم پشتی پانکراس نزدیک آئورت پشتی و مزانشیم پشتی است و آندودرم شکمی- جانبی پانکراس در کنار مزودرم کاردیوژنیک قرار می‌گیرد (Nikolova et al., 2006). بین هفته هفتم تا هشتم جنینی، پانکراسی شامل سلول‌های هرمی با اتصالات سست و به صورت مزانشیمی تشکیل می‌شود. سلول‌های مجرایی و جزایر لانگرهانس هر دو از لایه اندودرم در زمان تکوین جنین شکل می‌گیرند. در پستانداران قورباغه و جوجه هر دو جوانه سلول‌های اگزوکرین و اندوکرین را می‌سازند. شکل‌گیری پانکراس در نتیجه برهمکنش بین مزودرم و اندودرم انجام می‌شود.

پیام هایی از نوتوکورد برای شکل‌گیری پانکراس لازم است و پیام های ارسالی از مزانشیم باعث تحریک رشد اپیتلیوم اندودرمی می شود (Kim and Hebrok, 2001). در ابتدای شکل گیری پانکراس بیان ژن سیتوکراتین ۱۹[6] آغاز شده و سلول های اجدادی را به سمت تولید سلول های مجرایی پانکراس پیش می‌برد.

[1] Furin
[2] Pancreatic duodenal homoeobox-1: Pdx1
[3] Neurogenin 3:Ngn3
[4] Hepatic nuclear factor: Hnf1
[5] Fibroblast growth factor: FGF
[6] Cytokeratin-19

در روزهای بعد بیان ژن‌های دیگر از جمله هموباکس دئودنوم پانکراسی آغاز شده و سلول های اندوکرین جزایر لانگرهانس پانکراس تکوین خود را آغاز می‌کنند. فاکتورهای نسخه برداری که در این مرحله بیان می‌شوند نقش دو گانه ای را ایفا می کنند؛ بدین معنی که هم در تمایز سلول‌های اولیه به سلول‌های اندوکرین و هم در حفظ فنوتیپ سلول‌های تمایز یافته نقش دارند.

مهمترین فاکتوری که در تمایز سلول‌های بتای پانکراس ایفای نقش می کند فاکتورPdx1 است. این فاکتور توسط آزمایشگاه‌های مختلف شناسایی شده و به اسامی متفاوتی مانند فاکتور پیش برنده انسولین۱[1] (Krapp et al., 1998) فاکتور نسخه‌برداری سوماتواستاتین۱،[2] (Leonard et al., 1993) و فاکتور دئودنوم و جزیره ۱[3] (Stoffers et al., 1997) نامیده شده است. الگوی بیان Pdx1 در پانکراس در حال تکوین در تمام مراحل حفظ شده و باعث می‌شود آن بخش از اندودرم 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، Pdx1 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 Pdx1 و آنزیم آمیلاز در روز سیزدهم جنینی در سلول‌های بخش برون‌ریز پانکراس مشاهده شده است. بیان فاکتور Pdx1 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 Pdx1 به طور عمده محدود به سلول‌های بتای بالغ جزایر لانگرهانس می شود (Offield et al., 1996). در سلول های بتای بالغ Pdx1 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[4] 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 پاسخ به گلوکز مورد نیاز هستند. در نهایت فاکتور Pdx1 باعث می‌شود سیگنال گلوکز با سنتز و ترشح انسولین همراه شود. Pdx1 علاوه بر تنظیم بیان ژن انسولین، بیان ژن‌های انتقال دهنده گلوکز−۲، (Waeber et al., 1996) گلوکوکیناز و سوماتواستاتین را از طریق برهمکنش با نواحی پروموتر آن‌ها تنظیم می‌کند (Watada et al., 1996). غیر فعال‌سازی ژن Pdx1 در موش‌ها باعث عدم تکوین پانکراس می‌شود. در این موش‌ها بدشکلی دئودنوم و فقدان غدد برونر مشاهده شده است (Melloul, 2004). جوانه‌های ابتدایی پانکراس در موش‌های فاقد Pdx1 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

[1] Insulin promoter factor: Ipf-1
[2] Somatostatin transcription factor 1 :stf-1
[3] Islets and duodenum x-1 :Idx1
[4] Glucose transporter 2: GLUT2

بتا مهم است (Ahlgren et al., 1996). در موش‌های با نقص هتروزیگوت ژن Pdx1 کاهش بیان ژن‌های انتقال دهنده گلوکز-۲ و انسولین، و افزایش آپوپتازیس سلول‌های بتا و جزایر لانگرهانس غیر طبیعی مشاهده می شود (Jonsson et al., 1994).

### ۱-۳-۱ تکوین بخش درون ریز پانکراس

جزایر پانکراسی در سومین ماه زندگی جنینی، از بافت پارانشیمی پانکراس تشکیل شده و در سرتا سر بافت آن پراکنده می‌شوند. ترشح انسولین از ماه پنجم آغاز می‌شود. سلول‌های ترشح کننده گلوکاگون و سوماتواستاتین نیز از سلول‌های پارانشیمی به وجود می آیند. مزودرم احشایی اطراف پانکراس، بافت همبند پانکراس را تشکیل می‌دهد. فاکتورهای رشد فیبروبلاستی و اکتیوین[1] تولید شده توسط نوتوکورد از بیان ژن shh[2] که مهار کننده بیان ژن Pdx1 است جلوگیری می کنند. در نتیجه بیان ژن Pdx1 که ژن اصلی تشکیل بخش درون ریز پانکراس است فعال می شود (Lau et al., 2006). اگر چه همه مسیرهای سیگنال رسانی کنترل کننده اندازه و شکل جزایر پانکراس هنوز به طور کامل شناخته نشده است، اما به نظر می‌رسد مسیرهای سیگنال رسانی Notch، Wnt و shh بیش از مسیرهای دیگر در کنترل تکثیر و تمایز سلول‌های اندوکرین و نحوه آرایش سلول‌های جزایر لانگرهانس نقش دارند (Wessells and Cohen, 1967). مسیر سیگنال رسانی Notch عامل مهمی در دورهای از تمایز سلول‌های سوماتیک در جنین مهره‌داران است (Dale and Pourqui., 2001). نقش اصلی این مسیر تنظیم ساعت بیولوژیک تکوین جنین است و به عنوان ابزاری تکوینی برای ریخت‌زایی و تکوین اندام محسوب می‌شود. مسیر Notch نقش اولیه‌ای در تعیین سرنوشت سلولی در پانکراس در حال تکوین دارد. مطالعات اخیر نشان می‌دهد این مسیر در تنظیم سرنوشت سلول‌های اندوکرین و اگزوکرین نقش دارد و به وسیله مکانیسم مهار جانبی دارای عملکردهای تنظیمی در تکوین پانکراس است (Lammert et al., 2001). پیام های Notch در مراحل اولیه تکامل پانکراس روی حفظ حالت بنیادی پیش سازهای پانکراس، ایجاد توانایی رشد و مورفولوژی صحیح، القای تمایز سلول‌های اندوکرین و اگزوکرین با سرکوب بیان نوروژنین۳ نقش دارد (Lammert et al., 2001). نوروژنین۳ در روز نهم جنینی شروع می‌شود و در روز پانزدهم یعنی زمان اوج تمایز سلول‌های اندوکرین و به طور عمده در هنگام تولد کاهش می‌یابد. فاکتور نوروژنین۳ در پانکراس بالغ به میزان کم بیان می‌شود. موش‌های فاقد ژن نوروژنین۳ نمی‌توانند سلول‌های پیش‌ساز اندوکرین را ایجاد کنند. از این رو این ژن به عنوان نشانگر سلول‌های پیش ساز جزایر اندوکرین پانکراس در نظر گرفته می شود (Gradwohl et al., 2000). نحوه عملکرد نوروژنین۳ به علت وجود فاکتورهای رونویسی خاصی است که به صورت مجموعه‌ای سرنوشت سلول‌های اندوکرین را تعیین می‌کنند.

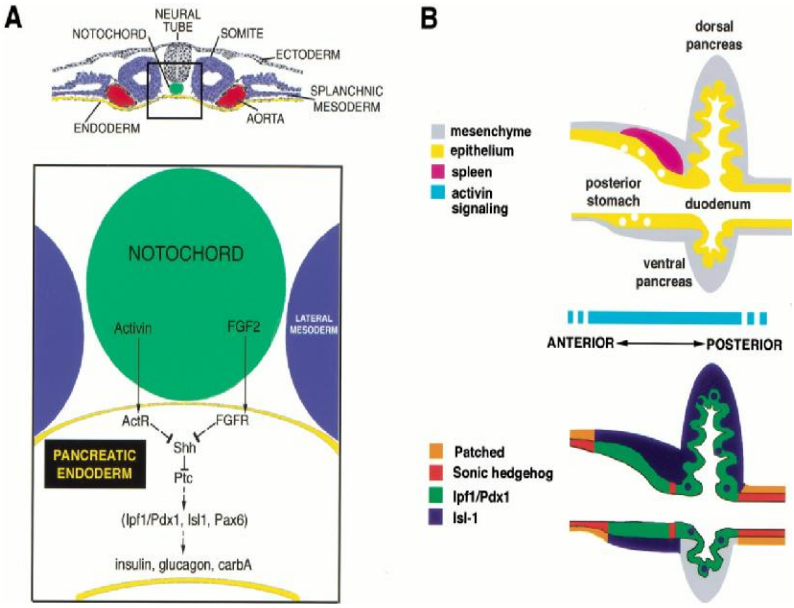
Hes-1 بیان نوروژنین۳ را به وسیله اتصال به چندین جایگاه خاموش کننده نزدیک به جایگاه رونویسی سرکوب می‌کند و بنابراین از طریق مسیر سیگنال رسانی Notch مانع ایجاد پیش سازهای اندوکرین می‌شود. Hes-1 در پانکراس بیان می شود؛ ولی در سلول‌های اندوکرین وجود ندارد. موش‌های فاقد ژن Hes-1 در

[1] Activin
[2] Sonic hedghog

معرض حذف سریع سلول‌های پیش ساز پانکراس و تکوین سلول‌های اندوکرین قرار می‌گیرند (Jensen et al., 2000).

پیام های مسیر Wnt از نوتوکورد منشأ می‌گیرند و از طریق بیان اکتیوین‌ها سبب تکثیر سلول‌های پانکراسی می شوند. اکتیوین‌ها اعضایی از فاکتورهای رشد تغییر شکل دهنده هستند که در تکوین پانکراس دارای اهمیت اند (Ogawa et al., 1993). مطالعات نشان می دهد غلظت فیزیولوژیک اکتیوین A باعث القای بیان ژن Pdx1، انسولین و گلوکاگون می شود. این فعال‌سازی نتیجه اثر مستقیم اکتیوین A در تحریک تمایز سلول‌های پانکراس است (Wells and Melton, 1999). یکی از مهمترین فاکتورها برای شروع و حفظ بیان ژن های مورد نیاز تکوین پانکراس اکتیوین B است. این فاکتور از نوتوکورد منشأ گرفته و باعث ریخت زایی اندام پانکراس می شود. بیان کم بتا اکتیوین در اپیتلیوم باعث کاهش بیان Pdx1 در پیش سازهای پانکراس و کاهش سلول‌های انسولین مثبت می شود (Heiser et al., 2006). یکی دیگر از واسطه های مسیر Wnt رتینوئیک اسید است. مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد رتینوئیک اسید برای القای بیان ژن Pdx1 و انسولین در پیش‌سازهای آندودرمی پانکراس لازم است (Kawahira et al., 2005). انکوبه کردن اجسام شبه جنینی با ترانس رتینوئیک اسید باعث بیان نشانگرهای سلول‌های اندوکرین پانکراس در این سلول‌ها شد (Attali et al., 2007).

پیام‌های خانواده shh در سراسر لوله گوارش جنین به جز در قسمت اندودرم جوانه پشتی پانکراس بیان می‌شوند. این پیام‌ها اندازه توده پانکراس را تحت کنترل دارند (Kim et al., 1997). بیان بیش از حد shh تحت کنترل پروموتور Pdx1 در اواسط تکوین باعث مهار شکل‌گیری سلول های اپیتلیال، آسینار و کاهش بیان ژن نوروژنین۳ می شود (Kawahira et al., 2005).




**شکل۱-۳ پیام های داخل سلولی مؤثر در تکوین پانکراس** (A) **بالا: ارتباط بین نوتوکورد و اندودرم پانکراس با بافت های مجاور در برش عرضی ناحیه کادر با جزئیات بیشتر در زیر آن نشان داده شده است. خلاصه ای از مسیر های پیام رسانی که از طریق آن ها بیان ژن های اندودرم پانکراسی تنظیم می شود.** (B) **شکل شماتیک از مورفولوژی (بالا) و بیان ژن (در پائین) دربرش طولی-میانی[1] از بخش خلفی روده اولیه در موش ۱۳ روزه** (Kim and Hebrok, 2001).

### ۱-۳-۲ نقش مزانشیم در تمایز پانکراس

برهمکنش‌های بین سلولی نقش مهمی در بیان ژن‌های اختصاصی فرایند تنظیم شده تمایز ایفا می‌کند. یکی از برهمکنش‌های مهم سلولی در تمایز سلول‌های کبدی، ریه و پانکراس برهمکنش اپیتلیوم و مزانشیم است. بافت مزانشیم به طور کلی بافت همبند سست مشتق شده از مزودرم جنینی است. آزمایشات انجام گرفته در زمینه تکثیر سلول‌های اپیتلیومی پانکراس در حضور و عدم حضور مزانشیم نشان می‌دهد که فاکتورهای مزانشیمی برای تکثیر سلول‌های اپیتلیالی لازم و ضروری هستند. اگر چه هویت این فاکتورها کاملاً شناخته شده نیست اما لیگاندهای تیروزین کیناز، خانواده فاکتورهای رشد فیبروبلاستی[2] و فاکتور رشد تغییر شکل دهنده[3] از عوامل مورد مطالعه توسط گروه‌های مختلف برای تعیین فاکتورهای بر همکنشی بین اپیتلیوم و مزانشیم هستند. از بین این فاکتورها خانواده FGF بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. چنین به نظر می‌رسد که فاکتورهای این خانواده عامل اصلی این برهمکنش هستند. مشاهدات نشان می‌دهد که گیرنده FGFIIIb روی سلول‌های اپیتلیالی قرار گرفته و به FGF های یک، هفت و ده متصل می‌گردد. همچنین مطالعات حاکی از آن است که در مراحل اولیه تکوین پانکراس فاکتور رشد FGF7 بیان می‌شود. این فاکتور در اجسام شبه جنینی بیان همزمان ژن‌های دو بخش درون‌ریز و برون‌ریز پانکراس را افزایش می‌دهد. فاکتور FGF7 باعث افزایش تکثیر اپیتلیوم پانکراس جدا شده می‌شود (Elghazi et al., 2002). در آزمایشی اپیتلیوم جدا شده از

[1] Sagittal
[2] Fibroblastic grows factor
[3] Transforming growth factor :TGF

مزانشیم را در معرض FGF7 و FGF10 قرار دادند. در این آزمایش سلول‌های اپیتلیالی به تکثیر خود ادامه دادند (Scharfmann, 2000). همچنین تیمار سلول‌های اپیتلیالی مجرای پانکراس رت‌های بالغ که از مزانشیم اطراف خود جدا شده بود در حضور فاکتور FGF7 رشد و تکثیر این سلول‌ها را در پی داشت (Dudek and Lawrence, 1988). حذف فاکتورFGF7 از محیط کشت ثانویه سلول‌های پانکراسی موش در شرایط آزمایشگاهی باعث شد بیشتر سلول‌های پیش ساز پانکراسی به سلول های اندوکرین تبدیل شوند (Elghazi et al., 2002).

حضور مزانشیم برای تمایز سلول‌های اگزوکرین پانکراس ضروری به نظر می رسد. تکوین سلول‌های کربوکسیلاز A و آمیلاز جدا شده از پانکراس در حضور مزانشیم به طور نرمال پیش می‌رود و در غیاب مزانشیم متوقف می‌شود (Gittes et al., 1996). در سلول‌های اپیتلیالی تیمار شده با فاکتوهای FGF1,10 رشد بیست برابری بافت اگزوکرین در مقایسه با زمان فقدان این فاکتور گزارش شد (Miralles et al., 1998). هنوز کاملاً مشخص نیست که فاکتورهای رشد فیبروبلاستی از چه مسیری باعث القای تمایز سلول های پیش‌ساز آمیلاز می شوند؛ ولی به نظر می رسد که این فاکتورها به طور غیر مستقیم و از طریق فعال کردن واسطه‌های مولکولی دیگر باعث القای تمایز این سلول ها می شوند (Miralles et al., 1998).

اخیراً مشخص شده که پیوند اپیتلیوم پانکراس جنینی جدا شده از مزانشیم اطراف وقتی به کپسول کلیه پیوند زده شود بعد از ده روز ساختارهای مشابه جزایرلانگرهانس را تشکیل می‌دهد. این یافته نشان می‌دهد که در دوران جنینی برای تکوین سلول‌های اندوکرین پانکراس نیاز کمی به حضور مزانشیم است. در حالی که تمایز سلول‌های اپیتلیوم تمایز نیافته پانکراس رت بالغ به ساختارهای سلولی اندوکرینی تنها در حضور مزانشیم امکان پذیر است (Gittes et al., 1996) این نتایج نشان می‌دهد که مکانیسم کنترل تمایز سلول‌های اندوکرین در دوران قبل از جنینی با دوران بعداز جنینی کاملاً متفاوت است (Gittes et al., 1996). جداسازی سلول‌های اپیتلیوم جنینی پانکراس رت در غیاب مزانشیم اطراف آن منجر به تشکیل سلول‌های اندوکرین از طریق مکانیسم نامشخصی شد. این مشاهدات نشان می‌دهد که پیام‌هایی از مزانشیم برای مهار تمایز سلول‌های اندوکرین ارسال می‌شود. بخش‌های اندوکرین و اگزوکرین پانکراس درارتباط نزدیک با سلول های مزانشیمی هستند. در یک جزیره لانگرهانس نحوه آرایش سلول‌های آلفا، بتا، گاما و دلتا نسبت به یکدیگر متفاوت است به طوری که سلول های بتا همواره در قسمت مرکزی جزیره قرار می‌گیرند. این مشاهدات بیانگر این حقیقت است که سلول‌های مختلف جزیره اگر چه از سلول‌های پیش ساز مشابهی ایجاد می‌شوند اما قرار گرفتن آن‌ها در موقعیت‌های مختلف موجب پذیرفتن سرنوشت های تکوینی متفاوتی می شود (Jacquemin et al., 2006). بر این اساس پیشنهاد می‌شود که در طی تکوین جنین سلول‌های اپیتلیالی که در تماس نزدیک با مزانشیم هستند نسبت به سلول های دورتر تمایز کمتری به سلول های اندوکرین نشان می دهند (Gittes et al., 1996).

در سال ۲۰۰۶ داولی[1] و همکارانش برای نشان دادن نقش فاکتورهای ارسالی از مزانشیم در تکوین بخش اندوکرین پانکراس سه گروه آزمایش ترتیب دادند. در گروه اول اپیتلیوم به تنهای روی فیلتر کشت داده شد. در گروه دوم اپیتلیوم از مزانشیم جدا و هر کدام در یک طرف فیلتر کشت داده شدند. در گروه سوم مزانشیم و اپیتلیوم با هم و در تماس نزدیک کشت داده شدند. در گروهی که مزانشیم و اپیتلیوم در تماس

[1] Davillie

مستقیم با هم بودند مهار بیان ژن نوروژنین۳ مشاهده شد. فاکتور رونویسی نوروژنین۳ در سلول‌های پیش ساز اندوکرین بیان می شود و بیان این فاکتور برای تکوین سلول‌های اندوکرین ضروری است. در گروهی که توسط فیلتر جدا شده بودند نوروژنین۳ بیان اما تکوین سلول‌های بتا دیده نشد. بنابراین نقش مزانشیم شروع تأخیری تمایز سلول‌های اندوکرین با صادر کردن پیام‌های به سلول‌های پیش ساز پانکراس است. این سلول‌ها تا مراحل انتهایی رشد جنین در وضعیت پیش‌سازی باقی می‌مانند (Jacquemin et al., 2000).

در آزمایشی با کشت اپیتلیوم در حضور و عدم حضور مزانشیم به بررسی نقش مزانشیم در بیان ژن های پانکراسی در این دو گروه پرداخته شد. نتایج این مطالعه نشان داد که مزانشیم تعداد نهایی سلول‌های بتا را کنترل می‌کند. در این آزمایش مشخص شد که تعداد سلول‌های بتای در گروه کشت اپیتلیوم پانکراس جنینی در حضور مزانشیم نسبت به اپیتلیوم پانکراس جنینی بدون مزانشیم بیشتر است. تحقیقات نشان می‌دهد پیام‌های ارسالی از مزانشیم از طریق افزایش تکثیر سلول های Pdx1 مثبت باعث افزایش تعداد سلول‌های بتا می شود (Kaneto et al., 2005). تکوین سلول های بتا توسط سیگنال‌های از مزانشیم افزایش می‌یابد فاکتورهایی مانند فاکتور رشد فیبروبلاستی، اکتیوین و رتینوئیک اسید در طی تکوین جنینی پانکراس از بافت های مزانشیمی اطراف پانکراس ترشح می شوند. مطالعات نشان می دهد که این فاکتورها نقش اساسی در بیان ژن های Pdx1 و انسولین دارند (Wells and Melton, 1999). تیمار اجسام شبه جنینی با رتینوئیک اسید باعث القای بیان ژن Pdx1 در این سلول‌ها شد (Kawahira et al., 2005). فاکتور مزودرمی دیگری که در تمایز سلول های بتای جزایر اندوکرین پانکراس نقش دارد اکتوین A است. اکتوین A از طریق فعال کردن مسیر wnt سبب القای تمایز سلول های بتا می‌شود. در حضور اکتیوین A تکثیر سلول های بتا افزایش می یابد.

در پانکراس بالغ سلول‌های جدید اندوکرین از سلول‌های اجدادی خود در مجرای پانکراس منشأ می‌گیرند (Bonner-Weir, 2000a). محققین معتقدند که بعضی از انواع سلول‌های بنیادی جزایر لانگرهانس به صورت مخلوط با سلول‌های مجرای پانکراس هستند. این سلول‌ها در هنگام تکوین جنینی سبب ایجاد سلول‌های بخش اندوکرین می شوند. منشأ سلول‌های جدید جزایر لانگرهانس درافراد بالغ هنوز کاملاً مشخص نیست. گروهی معتقدند که سلول‌های بنیادی در میان سلول‌های مجرایی یا حتی در میان سلول‌های جزایرلانگرهانس وجود دارند و در هنگام نیاز سلول‌های جدید را ایجاد می کنند (Heins et al., 2005). در صورتی که گروهی معتقدند که سلول‌های مجرایی خود به عنوان منشأ و پیش ساز سلول‌های جزایرلانگرهانس عمل می‌کنند. دلیل این ادعا این است که در سلول‌های پیش‌ساز سلول‌های بتا علاوه بر ژن انسولین ژن پروتئین‌های سیتوکراتین نیز که مشخصه سلول‌های مجرایی است بیان می شوند. در این میان گروه دیگری از محققین عقیده دارند که سلول‌های جدید لانگرهانس از سلول‌های بنیادی موجود در خون بوجود می آیند (Kim et al., 1997).

## ۴-۱ هورمون انسولین

انسولین نخستین پروتئینی است که خواص هورمونی آن شناخته شد و اولین پروتئینی است که به صورت خالص و متبلور تهیه شد. همچنین اولین پروتئینی است که نوع و ردیف کامل اسید آمینه آن تعیین