بسم الله الرحمن الرحیم

پژوهشکده رویان
مرکز تحقیقات علوم سلولی
مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی جانوری گرایش تکوینی

عنوان:

تولید سلول های ترشح کننده انسولین از طریق هم کشتی سلول های بنیادی مزانشیمی بندناف با سلول های مزانشیم پانکراس

نگارش:

ریحانه خوش چهره

استاد راهنما:

دکتر مرضیه ابراهیمی

اساتید مشاور:

دکتر حسین بهاروند

دکتر محمدرضا باغبان اسلامی نژاد

پاییز ۱۳۸۹

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم به پاس زحمات بی دریغشان

و

همسر مهربانم به خاطر همراهی های همیشگی اش

با تشکر فراوان از:

استاد عزیزم، سرکار خانم دکتر مرضیه ابراهیمی برای راهنمایی و هدایت های مفید و ارزشمندشان.

جناب آقای دکتر حسین بهاروند، معلم عزیزم که در طول دوران تحصیل از ایشان زیاد آموختم.

جناب آقای دکتر محمدرضا باغبان اسلامی نژاد به پاس مشاوره های راهگشای ایشان.

دانشگاه علم و فرهنگ

پژوهشگاه رویان

و

همه دوستان عزیزم در آزمایشگاه تماین ۲.

چکیده فارسی:

سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان و بندناف، سلول هایی چندتوان هستند که قابلیت تغییر تمایزی به انواع مختلفی از سلول ها از جمله سلول های تولید کننده انسولین را ،اگرچه با بازده نسبتا کم، دارا می باشند. مطالعات نشان داده اند که کنام پانکراس که از سلول های مختلفی از جمله سلول های اپیتلیالی، اندوتلیالی و استرومایی تشکیل شده است، در شکل گیری پانکراس نقش بسزایی ایفاء می کنند. هدف این مطالعه ،بررسی توانمندی سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان و سیاهرگ بندناف در تمایز به دسته های شبه جزیره ای دارای عملکرد در هم کشتی با سلول های استرومایی پانکراس می باشد.

روش ها: سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان و سیاهرگ بندناف از دهندگان سالم تهیه و کشت داده شدند. پاساژ سوم سلول ها که بیان بالایی از CD44 CD90, CD73, CD105 و بیان بسیار پایین CD11b، CD34 و CD45 را دارا بودند، در حضور ترکیبات القاء کننده و سلول های استرومایی پانکراس به سلول های شبه جزیره ای تمایز داده شدند. سلول های انسولین و پپتید-C مثبت توسط روش های ایمونوسیتوشیمی و ترشح انسولین در پاسخ به غلظت های مختلف گلوکز توسط روش ELISA ارزیابی گردید. Real Time PCR به منظور ارزیابی کمی بیان انسولین،Glut2، Nkx6.1 و Nkx2.2 در سطح mRNA مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج: نتایج ما نشان داد که تنها سلول های بنیادی مزانشیمی مغزاستخوان قادرند به سلول های تولیدکننده انسولین تمایز یابند. سلول های انسولین و پپتید-C مثبت به ترتیب ۲/۶±۱۵/۸ و ۵/۵±۱۳/۵ درصد کل سلول های تمایز یافته را به خود اختصاص می دانند. اگرچه این سلول ها انسولین را به درستی در پاسخ به غلظت های مختلف گلوکز ترشح نمی کردند.نتایج ما نشان داد که انسولین و Glut2 توسط سلول های مزانشیمی پانکراس در سطح mRNA افزایش بیان پیدا می کنند.هیچ اختلاف معنی داری بین سلول هایی که به مزانشیم پانکراس هم کشتی داده شده بودند با سلول هایی که به تنهایی کشت داده شده بودند از نظر بیان انسولین در سطح پروتئین،وجود نداشت.

نتیجه گیری: نتایج ما نشان داد که سلول های بنیادی مزانشیمی مغزاستخوان در مقایسه با سلول های بنیادی مزانشیمی سیاهرگ بندناف، قادرند به سلول های تولیدکننده انسولین تمایز یابند.علاوه بر این، سلول های استرومایی پانکراس سبب افزایش نعداد سلول های پیش ساز بتا می شوند.

واژگان کلیدی: سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان، انسولین، تغییر تمایزی.

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) derived from bone marrow are multi potent cells that have the capacity to trans-differentiate into a variety of cell types including insulin islet cells. However the efficacy is low. It has been reported that pancreatic niche including stromal, epithelial and endothelial cells is important in pancreatic organogenesis. The aim of this study is to explore the potential of marrow and Umbilical cord vein MSC to differentiate into functional islet like cells in co-culture with pancreatic mesenchymal cells.

Methods: BM-MSCs and UC-MSCs were obtained from healthy donors and were cultured. MSCs with high CD90, CD73, CD105, CD44 and very low CD34 and CD45 expression were differentiate into Islet-like cells under defined conditions and in presence of pancreatic MSCs . Insulin and c-peptide positive cells were evaluated with immune-florescence and insulin release after glucose challenge was tested by ELISA. QRT-PCR was done to detect expression of Insulin, Glut2, Nkx6.1 and Nkx2.2 at mRNA level.

Results: our results showed that only BM-MSC can differentiated to insulin secreting cells. About 15.8%±2.6 and 13.5%±5.5 of cells were positive for Insulin and c-peptide, respectively. However they were not functional when treated by different concentration of glucose. Our results revealed that expression of Insulin and Glut2 upregulated by pancreatic MSCs only at mRNA level, and significant differences were not between cells which co-cultured with pancreatic Mesenchyme and cells which cultured alone.

Conclusion: Our results showed that 1. Human BM-MSCs in compare with umbilical cord vein MSCs are able to differentiate into insulin producing cells in vitro and 2. Pancreatic Mesenchyme may increase β precursors, however it needs to be study more .

Keywords: Bone marrow mesenchymal stem cells, insulin ,trans-differentiation

پژوهشکده رویان
مرکز تحقیقات علوم سلولی
مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل

Thesis Presents for the MS.c. Degree in Developmental Biology

Title:

Generation of insulin secreting cells by co-culture of Umbilical cord Mesenchymal stem cells and pancreatic Mesenchymal cells

By:
R.Khoshchehreh

Supervisor:
Dr. M. Ebrahimi

Advisors:
Dr.H. Baharvand
Dr.M. Baghban Eslami Nejad

September 2010

فصل اول - مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته..... ۷
مقدمه:..... ۸
مروری بر مطالعات گذشته:..... ۱۱
۱-۱- دیابت قندی..... ۱۱
۱-۱-۱- روش های درمان دیابت ۱۲
۱-۲- ساختمان و عملکرد پانکراس..... ۱۳
۱-۲-۱- بخش درون ریز پانکراس..... ۱٤
۱-۲-۲- بخش برون ریز پانکراس ۱٦
۱-۲-۳- سلول های بنیادی پانکراسی ۱٦
۱-۲-۴- سلول بتا ۱٦
۱-۳-بیوسنتز و ترشح انسولین..... ۱۷
۱-۴- مسیر تکوین پانکراس..... ۲۰
۱-۵- نقش مزانشیم پانکراس در تکوین سلول های بتا..... ۲۳
۱-۶- سلول های بنیادی و کاربردشان در تولید سلول های انسولین ساز..... ۲۴
۱-٦-۱-تعریف سلول های بنیادی ۲٤
۱-۶-۲- انواع سلول های بنیادی ۲۵
۱-۶-۲-۱-سلول های بنیادی جنینی ۲۵
۱-۶-۲-۲-سلول های بنیادی بالغ..... ۲٦
۱-۶-۲-۲-۱-سلول های بنیادی مزانشیمی ۲۷
۱-۶-۳- تمایز انواع سلول های بنیادی به سلول های انسولین ساز ۳۰
۱-۶-۳-۱- سلول های بنیادی جنینی ۳۰
۱-۶-۳-۲- سلول های بنیادی مزانشیمی..... ۳۱

۱-۶-۳-۲-۱- سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به عنوان منبعی برای سلول های مولد انسولین ۳۲
۱-۶-۳-۲-۲- سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی به عنوان منبعی برای سلول های مولد انسولین ۳۲
۱-۶-۳-۲-۳- سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بندناف به عنوان منبعی برای سلول های مولد انسولین ۳۳
فصل دو- مواد وروش ها..... ۳۵
مواد مصرفی:..... ۳۸
روش ها:..... ۴۱
۲-۱- جداسازی و کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی انسان از دیوارۀ سیاهرگ بندناف..... ۴۱
۲-۲- تهیه و کشت سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی از نمونه های آسپیرایسیون مغز استخوان..... ۴۲
۲-۳- جداسازی و کشت سلول های مزانشیمی از پانکراس نوزاد رت ۷ روزه..... ۴۲
۲-۴- ارزیابی میزان بیان مارکرهای سلول های بنیادی مزانشیمی با استفاده از روش فلوسایتومتری..... ۴۳
۲-۵- بررسی پتانسیل تمایزی سلول های بنیادی مزانشیمی به دودمان های مزانشیمی..... ۴۵
۲-۵-۱- تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول های استخوانی ٤٥
۲-۵-۲- تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به چربی ٤٥
۲-۶- تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول های تولید کننده انسولین..... ۴۶
۲-۷- هم کشتی مستقیم سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با سلول های مزانشیمی پانکراس نوزاد رت ۷ روزه..... ۴۸
۲-۸- بررسی های بافت شناسی..... ۴۹
۲-۸-۱- ایمونوهیستوشیمي برش هاي بافتي پانکراس ٤٩
۲-۹- آنالیز و بررسی تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول های تولید کننده انسولین..... ۵۱
۲-۹-۱- بررسی با میکروسکوپ نوری ٥١

۲-۹-۲- ایمونوسیتوشیمي ۵۱
۲-۹-۳- بررسی بیان ژنی توسط روش Quantitative Real Time PCR ۵۲
۲-۹-۴- بررسی میزان ترشح انسولین و پپتید-C ۵٤
۲-۹-۴-۱- سنجش انسولین: ۵٤
۲-۹-۴-۲- سنجش پپتید-c: ۵۵
۲-۱۰-آنالیز آماری ۵۶
فصل سوم- نتایج ۵۸
۳-۱- مشاهدات میکروسکوپ نوری در مورد وضعیت رشد و گسترش سلول های بنیادی مزانشیمی ..۵۹
۳-۱-۱- سلول های بنیادی مزانشیمی بندناف ۵۹
۳-۱-۲- سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ٦۱
۳-۲- بررسی آنتی ژن های سطحی سلول های بنیادی مزانشیمی بندناف، مغز استخوان و سلول های مزانشیمی پانکراس به روش فلوسایتومتری..... ۶۳
۳-۳-تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به استخوان و چربی..... ۶۵
۳-۳-۱-تمایز به استخوان..... ٦۵
۳-۳-۲- تمایزبه چربی ٦۷
۳-۴- بررسی تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی بندناف و مغز استخوان به سلول های تولید کننده انسولین با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی..... ۶۸
۳-۵- بررسی اثر هم کشتی مستقیم سلول های مزانشیمی پانکراس رت در تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول های تولید کننده انسولین به روش ایمونوسیتوشیمی..... ۷۱
۳-۶- نتایج بررسی بیان ژنی توسط روش Quantitative Real Time PCR..... ۷۳
۳-۷- بررسی عملکرد سلول های تمایز یافته از طریق بررسی میزان ترشح انسولین و پپتید-C با روش الایزا..... ۷۵
فصل چهارم- بحث و نتیجه گیری ۷۷

نتیجه گیری:.....۸۷
پیشنهادات.....۸۸
مراجع: ۸۹

فهرست **شکل ها:**

شکل۱–۱– رنگ آمیزی هماتوکسیلین–ائوزین بافت پانکراس.....۱٤
شکل۱–۲– نمایی بخش اگزوکرین (b)و اندوکرین (c)پانکراس.....۱۵
شکل۱–۳– سنتز و ترشح انسولین در سلول بتا.....۱۸
شکل۱–٤– لوله گوارش اولیه در هفتهٔ چهارم جنینی.....۲۱
شکل۱–۵– مسیرسیگنالدهی در تکوین پانکراس.....۲۲
شکل ۱–۲– تصویری از مراحل جداسازی سلول بنیادی مزانشیمی از بندناف.....٤۲
شکل۲–۲– تصویر شماتیک از هم کشتی مستقیم سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با سلول های مزانشیمی پانکراس نوزاد رت.....٤۹
شکل۲–۳–شکل شماتیکی از مراحل انجام کار.....۵۷
شکل۳–۱– نمای میکروسکوپ نوری از ویژگی ظاهری سلول های بنیادی مزانشیمی سیاهرگ بندناف(الف) در هفته اول کشت (سلول بنیادی مزانشیمی با فلش سفید رنگ و سلول اندوتلیال با فلش قرمز رنگ مشخص شده است)، (ب) در پاساژ اول و (ج) حضور کلنی های مواج در پاساژ دوم.....٦۰
شکل ۳–۲– نمای میکروسکوپ نوری از کلنی های مواج سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در پاساژ سوم.....٦۱
شکل۳–۳–نمای میکروسکوپ نوری از ویژگی ظاهری سلول های مزانشیمی پانکراس.....٦۲

شکل ۳-٤- درصد بیان شاخص های اختصاصی سلول های بنیادی مزانشیمی در سه گروه سلولهای بنیادی مزانشیمی سیاهرگ بندناف، سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و سلولهای مزانشیمی پانکراس رت.....٦٤

شکل۳-۵- رنگ آمیزی آلیزارین رد سلولهای بنیادی مزانشیمی سیاهرگ بندناف(الف)، سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان(ب) و سلولهای مزانشیمی پانکراس رت(ج) تمایز یافته به استخوان. رنگ آلیزارین رد رسوبات کلسیمی را به رنگ قرمز به نمایش می گذارد.....٦٦

شکل۳-٦- رنگ آمیزی اویل رد سلول های بنیادی مزانشیمی مغزاستخوان تمایز یافته به چربی.در شکل واکوئل چربی با فلش مشخص شده است.....٦٧

شکل ۳-۷ (الف۱و ب۱) رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین بافت پانکراس انسان را نشان می دهد که جزیره لانگرهانس داخل دایره مشخص شده است،.....۷۱

شکل ۳-۸- نتایج حاصل از روش ایمونوسیتوشیمی تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول های تولید کننده انسولین در هم کشتی مستقیم با سلول های مزانشیمی پانکراس نوزاد رت ۷ روزه.....۷۲

فهرست جداول

جدول ۲-۱ لیست تجهیزات مورد استفاده.....۳٦

جدول ۲-۲ لیست مواد مورد استفاده.....۳۸

جدول ۳-۲- لیست آنتی بادی های مورد استفاده در روش فلوسایتومتری.....٤٤

جدول۲-٤ مشخصات پرایمر های استفاده در این مطالعه.....۵۳

جدول ۳-۱- نتایج تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول های تولید کننده انسولین از سه روش تمایزی ٦۸

جدول ٤-۱- مقایسه سه روش تمایزی از نظر ترکیبات بکار رفته در مسیر تمایز به سلول های انسولین ساز..۸۰

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱- نتایج بررسی بیان ژنی توسط روش Quantitative Real Time PCR بزای بیان ژنهای Insulin، GLUT2،Nkx6.1و Nkx2.2 در دو گروه تمایزی بدون هم کشتی و با هم کشتی مستقیم در سه مقطع زمانی: روز صفر تمایز،پایان مرحله دوم تمایز و پایان مرحله سوم (مرحله نهایی) تمایز. کلیه داده ها بر اساس (Mean±SE) ارائه شده اند..... ۷٤

نمودار ۳-۲- سنجش میزان ترشح پپتید-c (الف) و انسولین(ب) را در دو گروه با و بدون هم کشتی در دو غلظت مختلف ۵ mM و ۲۷/۵ mM گلوکز را نشان می دهد که هیچ اختلاف معنی داری بین گروه ها مشاهده نشد (p> ۰/۰۵). محیط رویی فاز آخر تمایز نیز توسط آزمون سنجش پپتید-c در دو گروه تمایزی سنجیده شده است. ۷۶

فصل اول

مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

مقدمه:

افزایش روز افزون بیماران مبتلا به دیابت در کل دنیا و مشکلات متعددی که این افراد به صورت کوتاه و بلند مدت با آنها درگیر می شوند،سبب تلاش های فراوانی برای درمان این بیماری شده است.با توجه به مشکلات روش های درمانی رایج نظیر تزریق انسولین یا پیوند جزایر لانگرهانس (اعم از تعداد کم افراد دهنده و احتمال رد پیوند)، تلاش های گسترده ای روی تولید سلولهای مولد انسولین و درمان دیابت با استفاده از سلول درمانی صورت گرفته است. در این راستا، تمایز سلولهای بنیادی جنینی یا بزرگسال به سلولهای بتای پانکراسی مولد انسولین یکی از روش های نوین درمان دیابت،خصوصاً دیابت نوع I است[1].

مطالعات زیادی روی تولید سلولهای مولد انسولین[1](IPCs) از سلولهای بنیادی جنینی صورت گرفته است که از جملهٔ آنها می توان به مطالعات مربوط به Lumelsky و همکاران در سال ۲۰۰۱[۲] ،D'Amour و همکاران در سال ۲۰۰۶[۳] و بهاروند و همکاران در سال ۲۰۰۶[۴] اشاره کرد،بطوریکه در نهایت این مطالعات به تولید سلولهای ترشح کنندهٔ انسولین منجر شده اند،اگرچه میزان ترشح انسولین این سلولها در پاسخ به تغییرات گلوکز خون خیلی رضایت بخش نبوده است. استفاده از سلولهای بنیادی جنینی دارای مشکلاتی از جمله محدودیت های اخلاقی در بکارگیری آنها و شکل گیری تراتوما بعد از پیوند به حیوان دیابتی است[۲]. در نتیجه سلولهای بنیادی بزرگسال که از نظر قابلیت تمایزی سلول هایی چند توان هستند، می توانند گزینه دیگری برای استفاده در درمان دیابت به روش سلول درمانی باشند.

سلولهای بنیادی مزانشیمی از دستهٔ سلولهای بنیادی بزرگسال هستند که می توانند از بافتهای مختلفی از جمله مغز استخوان،بافت چربی،خون بندناف،دیوارهٔ بندناف،مایع آمنیوتیک و ... جداسازی شوند.در واقع مغز استخوان به عنوان منبع عظیم برای سلولهای بنیادی مزانشیمی معرفی شده است. مطالعات متعددی در رابطه با تمایز این سلولها به سلولهای مولد انسولین صورت گرفته است که از جملهٔ آنها می توان به مطالعات Moriscot و همکاران در سال2005 [۵] oh وهمکاران در سال ۲۰۰۴[6] ،Karnieli و همکاران در سال ۲۰۰۷[۷] و Sun Yu وهمکاران در سال ۲۰۰۷[۸]اشاره کرد که در تمامی این موارد

[1] Insulin Producing Cells

محققان موفق به تولید سلول های مولد انسولین از سلولهای بنیادی مزانشیمی شده اند.سلولهای بنیادی مزانشیمی بندناف نبز به عنوان منبع دبگری برای سلول های بنیادی مزانشیمی به شمار می آید. این سلول ها دارای خصوصیات ویژه ای از جمله بیان nanog,oct4 وSSEA4 که از مارکرهای اختصاصی سلولهای بنیادی جنینی هستند،می باشند[۹, ۱۰]. Kuo Ching Chao و همکارانش در سال ۲۰۰۸، سلولهای بنیادی مزانشیمی که از ژل وارتون بند ناف گرفته بودند را به دسته های سلولی شبه جزیره ای بالغ تمایز دادند . این سلولها قابلیت ترشح انسولین در محیط های خارج و داخل بدن را داشتند[۱۱] .علاوه بر این Bo Sun و همکاران در سال ۲۰۰۷ و Feng Gao و همکاران در سال ۲۰۰۸ توانستند از سلولهای بنیادی مزانشیمی خون بندناف سلولهای ترشح کنندۀ انسولین تولید کنند[۹, ۱۲].

از موارد دیگری که برای تولید بهتر سلولهای مولد انسولین باید مد نظر داشت مطالعۀ کنام[1] پانکراس و به ویژه سلولها حاضر در پانکراس و نقش آنهاست.بطوریکه Attali و همکارانش در سال ۲۰۰۷ نقش بسیار مؤثر سلولهای مزانشیمی پانکراس در کنترل تمایز سلولهای بتای پانکراس را به اثبات رسانده اند [۱۳]. علاوه بر این Duvillie و همکاران در سال ۲۰۰۶ اینطور بیان کرده اند که سلولهای مزانشیم پانکراس زمان تمایز سلولهای بتا را نیز کنترل می کنند[۱۴].Lee وهمکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که عصارۀ پانکراس دارای فاکتورهایی است که نوزایی جزیره ها رادر حیوانات دیابتی شده، القاء می کند. آنها عصارۀ پانکراس را بر روی سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی اثر داده و مشاهده نمودند که ژنهایی که در مراحل ابتدایی تکوین پانکراس دخیل اند، در این سلول ها افزایش بیان پیدا می کنند[۱۵]. Chio و همکاران نیز در سال ۲۰۰۵ نتایج مشابهی در همین زمینه بدست آورده بودند[۱۶]. بدین ترتیب به نظر می رسد نقش سلول های مزانشیمی به عنوان یکی از عوامل شکل دهنده کنام پانکراس، نقشی کلیدی و اثرگذار در تکوین پانکراس و به ویژه سلول های بتا باشد.

[1] Niche

با توجه نقش سلول های مزانشیمی پانکراس در تکوین پانکراس و مشکلات موجود در رابطه با تولید سلول های انسولین ساز، که از آن جمله کمبود بازده تمایز و عملکرد نامطلوب سلول های حاصل از تمایز می باشند، لذا در این مطالعه بر آن شدیم تا اثر هم کشتی سلول های مزانشیمی حاصل از پانکراس رت را روی تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و دیواره سیاهرگ بندناف به سلول های انسولین ساز بررسی کنیم.

مروری بر مطالعات گذشته:

۱-۱- دیابت قندی

دیابت قندی [۱](DM) گروهی از اختلالات متابولیک را شامل می شود که از نظر صفت ظاهری افزایش قند خون[۲] با یکدیگر مشترکند. چندین نوع مختلف DM وجود دارد که بر اثر واکنشهای پیچیدهٔ ژنتیکی، عوامل محیطی و انتخاب نحوهٔ زندگی ایجاد می گردند. بسته به اتیولوژی DM، عوامل دخیل در هایپرگلایسمی ممکن است شامل کاهش ترشح انسولین، کاهش مصرف گلوکز و افزایش تولید گلوکز باشند. دو گروه گستردهٔ DM شامل نوع ۱ و نوع ۲ طرح ریزی شده اند. DM نوع ۱A در نتیجه تخریب خود ایمنی سلول بتا ایجاد می گردد که معمولا موجب کمبود انسولین خواهد شد. DM نوع ۱B نیز با کمبود انسولین به علاوهٔ تمایل به ایجاد کتوز مشخص می گردد. با اینحال ، افراد مبتلا به DM نوع ۱B فاقد شاخص های نشان دهندهٔ فرایند تخریب خود ایمنی سلولهای بتا می باشند. مکانیسم های ایجاد کنندهٔ تخریب سلول بتا در این بیماران ناشناخته باقی مانده اند[۱۷].

DM نوع ۲ شامل گروه متنوعی از اختلالات است که معمولا با شواهدی مبنی بر درجات متغییر مقاومت به انسولین ، اختلال انسولین و افزایش تولید گلوکز مشخص می گردند. هر چند DM نوع ۱ در اغلب موارد پیش از ۳۰ سالگی ایجاد می گردد، فرآیندهای خود ایمنی تخریب سلول بتا می توانند در هر سنی حاصل شوند. در واقع ، تخمین زده می شود که بین ۵ تا ۱۰ درصد افراد مبتلا به DM که پس از۳۰ سالگی دچار این بیماری می شوند، دارای DM نوع ۱ می باشند. اگرچه DM نوع ۲ معمولا با افزایش سن بروز می یابد ، این اختلال در کودکان، خصوصا در نوجوانان چاق نیز رخ می دهد . دیابت در هر چهار مدل خود ، حداقل ۲۰۰ میلیون نفر را در سراسر جهان درگیر خود کرده است که حدود ۱۰ درصد موارد مربوط به دیابت نوع ۱ می باشد[۱۷].

[1] Diabetes Mellitus
[۲] Hyperglisemia

۱-۱-۱- روش های درمان دیابت

کشف و تخلیص انسولین در سال ۱۹۲۱ توسط بانتینگ (Banting) و بست (Best) درمان موثری را فراهم کرد که هنوز هم از لحاظ بالینی استاندارد است و به بیماران دیابت نوع ۱ امکان می دهد زندگی نسبتا طبیعی داشته باشند. اگرچه پیشرفته ترین روشهای تهیه انسولین و رژیمهای شدید انسولینی می توانند سطح گلوکز خون را بهبود بخشند، اما کنترل برون زای انسولین نمی تواند یک کنترل پیوسته گلوکز خون و جلوگیری از نارضایتی های افراد دیابتی را تضمین کند. در واقع ، محققان در حال جستجوی درمانهای جایگزین برای روش درمانی تزریق انسولین می باشند. امروزه به خوبی پذیرفته شده است که درمان دیابت نوع ۱ و در بسیاری موارد دیابت نوع ۲ نیاز به ترمیم و یا جایگزینی سلولهای تولید کنندۀ انسولین وجود دارد. پیدا کردن یک جایگزین دارای عملکرد برای سلول بتای از دست رفته و یا بازگرداندن قابلیت های ترمیم شدن سلول بتا ، یک هدف بزرگ برای حوزۀ تحقیقات بر روی دیابت می باشد[۱۸].

در سالهای اخیر موفقیت در زمینه پیوند جزایر پانکراسی با استفاده از روش ادمونتون نشان داد که عدم وابستگی به انسولین در مدت زمان طولانی در بیماران با دیابت نوع ۱ می تواند بدست بیاید[۱۹]. در مقایسه با پیوند کل پانکراس ، پیوند جزایر پانکراس انسانی به لحاظ تکنیکی راحتر بوده و حالت ناخوشی کمتری را باعث می شود و جزایر جدا شده را نیز می توان فریز کرده و به صورت بانک نگهداری نمود[۲۰].

علی رغم دستاوردهای این روش ، پیوند جزایر هنوز راه حل مناسبی برای درمان دائمی مبتلایان به دیابت با مزایای طولانی مدت در همه بیماران دیابتی، ارائه نمی کند. در یک پیگیری ۵ ساله بعد از پیوند جزایر ، تنها تعداد کمی از بیماران (حدود۱۰درصد) بطور میانگین حدود ۱۵ ماه به تزریق انسولین نیازی نداشتند[۲۱]. علاوه بر این ، تعداد جزایر مورد نیاز برای اینکه فرد نیازی به تزریق انسولین نداشته باشد بسیار بالاست، در حالیکه دهندگان پانکراس بسیار محدود می باشند. مطالعات نشان داده اند که برای یک درمان موفقیت آمیز، حدودا به ۸۵۰۰۰۰ جزیره نیاز است[۲۱].

در دسترس بودن سلولهای بتای زنوژنیک ، مثل جزایر لانگرهانس خوک و مشابهت آنها با جزایر انسانی،بکارگیری زنوگرافتها را در بیماران دیابتی مورد توجه قرار داده است، ولی رد شدن این زنوگرافتها توسط سیستم ایمنی یک چالش بزرگی در برابر این روش می باشد[۲۲]. علاوه بر این، خطر انتقال عفونت از حیوانات به انسان نیز از دیگر چالش های پیش روی این روش درمانی است[۲۳].

بنابر نتایج حاصل از پیوند جزایر پانکراسی و محدودیت های موجود محققین بر آن شدند که به تحقیق در زمینه تولید منابع جدیدی از سلولهای انسولین ساز بپردازند. در سالهای اخیر پیشرفتهای مهمی در زمینه تمایز سلول های بنیادی به سلول های بتای پانکراسی مولد انسولین به دست آمده است و امیدهای زیادی در این زمینه وجود دارد.

در ادامه برای آشنایی با سلول های انسولین ساز، به اختصار در خصوص ساختار و مسیر تکوین سلول های انسولین ساز اشاره می گردد و سپس به تحقیقات بعمل آمده در زمینه تولید سلول های انسولین ساز از منابع مختلف سلولی پرداخته خواهد شد.

۱-۲- ساختمان و عملکرد پانکراس

پانکراس یک عضو پشت صفاقی است که با یک کپسول از بافت پیوندی احاطه شده است که این کپسول پارانشیم را از طریق دیواره های باریکی جدا می کند که این دیواره ها حاوی اعصاب ، عروق خونی و لنفاتیک و مجاری دفعی می باشند(شکل۱–۱). پانکراس غده ای است که ترشح ، سنتز ، تقسیم بندی هورمونهای مهم ترشحی و آنزیم های گوارشی را به عهده دارد. پانکراس بطور روزانه نزدیک به ۱۲۰۰ میلی لیتر از شیرۀ پانکراسی را که برای هضم کربوهیدراتها ، پروتئین ها و چربی های غذا ضروری است ، ترشح می کند. غده پانکراس از دو بخس درون ریز و بروی ریز تشکیل شده است(شکل ۱–۲).بخش درون ریز[1] پانکراس یک قسمت کوچکی از حجم کل غده را به خود اختصاص داده و هورمون های کنترل کننده متابولیسم کربوهیدرات ها را ترشح می کند. هر دو قسمت درون ریز و برون ریز[2] پانکراس درخصوصیات عملکردی خود ، از هم مستقل هستند[۲۴]

[1] Endocrine
[2] Exocrine