تمایز سلولهای بنیادی پوست انسان به سلولهای سازنده انسولین در محیط برون‌تن با استفاده از گلوکز و عصاره پانکراس ترمیمی

مریم مهرابی[۱،۲]، سامان حسینخانی[۱]، سیروس جلیلی[۳] و علی مصطفایی[۲،۴*]

[۱] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی

[۲] کرمانشاه، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی

[۳] کرمانشاه، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی

[۴] کرمانشاه، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۱۶

چکیده

سلول درمانی یکی از روشهای امیدوارکننده در درمان دیابت نوع۱ می باشد. یکی از مناسب ترین گزینه ها برای این منظور، سلولهای پیش ساز مشتق از پوست Skin-derived precursors cells (SKP) است که پتانسیل تمایز به سلولهای سازنده انسولین Insulin producing cells (IPC) را دارند. در این مطالعه سلولهای پیش ساز مشتق از پوست انسان Human skin-derived precursors cells (hSKP) جدا و تکثیر شده و تحت تأثیر عصاره پانکراسی (دو روز بعد از ۶۰ درصد پانکراکتومی) به IPC تمایز داده شدند. به منظور تمایز، hSKP ها در محیط DMEM حاوی FBS و عصاره پانکراسی و گلوکز برای مدت ۱۴ روز کشت داده شدند. تولید انسولین این سلولها با رنگ دیتیزون که به طور اختصاصی برای شناسایی انسولین به کار می رود، مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این، بیان انسولین در سلولها با ایمونوسیتوشیمی بررسی شد و ترشح انسولین با استفاده از روش ایمونواسی آنزیمی ELISA مورد تأیید قرار گرفت. تجمعات سلولی خوشه مانند بعد از حدود ۱۴ روز ظاهر شدند. این خوشه ها نسبت به آنتی بادی ضد انسولین مثبت بودند و قادر به ترشح مقادیر قابل تشخیص انسولین در یک رفتار وابسته به غلظت گلوکز بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که hSKP تحت تیمار با عصاره پانکراسی توانایی تمایز به سلولهای سازنده انسولین را دارند که می تواند گامی در جهت سلول درمانی دیابت در آینده باشد.

واژه های کلیدی: دیابت، تمایز، سلولهای پیش ساز مشتق از پوست، سلولهای انسولین ساز

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۳۱-۴۲۷۶۴۷۳ ، پست الکترونیکی: amostafaie@kums.ac.ir

مقدمه

دیابت قندی Diabetes Mellitus (DM) یک اختلال متابو لیکی شایع است، که ۵-۲ درصد جمعیت در کشورهای توسعه یافته به آن مبتلا هستند. بر اساس ارقام جهانی به دست آمده در حال حاضر، حدود ۱۹۴ میلیون نفر از جمعیت جهان به بیماری دیابت مبتلا هستند و پیش بینی شده که این رقم تا سال ۲۰۳۰ به ۳۶۶ میلیون نفر می رسد، البته به شرط اینکه شیوع چاقی تا سال ۲۰۳۰ ثابت باقی بماند (۳۴). دیابت قندی به طور معمول به دو نوع دیابت نوع ۱ (دیابت وابسته به انسولین) اختلالی است که با تخریب خود ایمن سلولهای مولد انسولین در پانکراس (سلولهای بتای جزایر لانگرهانس) مشخص می شود و دیابت نوع ۲ (دیابت غیر وابسته به انسولین) که تحت تأثیر عواملی همچون مقاومت بافتهای محیطی به اثرات انسولین تا عملکرد ناصحیح سلولهای بتای پانکراس ناشی می شود،

تقسیم می شود. درمان معمول دیابت نوع ۱ شامل تزریق روزانه انسولین است، اما این کار سبب حل شدن مسائلی همچون عوارض جدی سیستماتیک درازمدت دیابت نمی‌گردد (۲۵). تاکنون دو راهکار اصلی جهت برطرف کردن مشکل کمبود سلولهای بتا توسط محققان ارائه شده است: ۱) تحریک تولید مجدد سلولهای بتا در پانکراس و ۲) تولید این سلولها در شرایط برون‌تن (۵). مطالعات اخیر پیشنهاد می‌کنند که پانکراس ظرفیت قابل توجهی برای تولید مجدد این نوع سلولها را حفظ می‌کند (۶ و ۳۰)، که ممکن است توسط فاکتورهایی از قبیل پاسخ خودایمن و سمیت سطوح بالای گلوکز خون پوشیده شود (۲۰ و ۲۶). مکانیسم تنظیم پیامهای منجر به تکثیر سلولهای بتا هنوز به خوبی شناسایی نشده است، با این حال شواهد بالینی نشان می‌دهند که دیابت نوع ۱ را می توان با تزریق ساده تعداد کافی از جزایر عملکردی پانکراس درمان کرد (۲۸). متأسفانه، پیوند جزایر نیز به عنوان پیوند هترولوگ به میزان زیادی توسط دفع سیستم ایمنی و همچنین کمبود جزایر از افراد دهنده با مشکل مواجه شده است که این امر سبب شده که محققان برای کشف جایگزینهای مناسب جهت جزایر پانکراسی دهنده، راههای مناسب دیگری را جستجو کنند. سلولهای بنیادی به عنوان یک جایگزین مناسب در این زمینه، چشم‌انداز امیدوار کننده‌ای را فراهم نموده است. سلولهای بنیادی جنینی دارای پتانسیل بالایی جهت تمایز به سوی سلولهای تولید کننده انسولین Insulin-producing cells (IPC) هستند، اگرچه، آنها پس از پیوند پتانسیل تومورزایی دارند (۱۴). در حقیقت، ایجاد و توسعه یک روش ساده و معتبر برای به دست آوردن سلولهای بنیادی اتولوگ که توانایی تمایز به سلولهای IPC عملکردی را دارند، سبب فراهم شدن منبع نامحدود بالقوه‌ای از سلولهای بتا برای پیوند و جهت پیشگیری از دفع ایمنی خواهد شد. مطالعات جدید نشان داده‌اند که سلولهای بنیادی بزرگسال، اگر در محیط کشت یا به دنبال پیوند هتروتوپیک در معرض محیطهای خارجی مناسب قرار بگیرند، پتانسیل تمایزی با محدوده وسیع‌تری از سلولها را خواهند داشت.

پوست، به عنوان بزرگترین عضو بدن، هموستازی خود را برای تکثیر، تمایز و تولید مجدد از طریق سلولهای بنیادی باقی‌مانده در اپیدرم، درم و ضمائم خود حفظ می‌کند. اخیراً سلولهای پیش‌ساز مشتق از پوست Skin derived precursors (SKP) جداسازی شده و این عمل حتی از انسان و پوست دیگر پستانداران نیز توسعه یافته است. این سلولها می‌توانند به هر دو نوع سلولهای عصبی و دودمان مزودرمی شامل انواع سلولهایی که به ندرت در پوست یافت می‌شوند از قبیل نورونها تمایز حاصل کنند (۱۰، ۱۷، ۳۱ و ۳۲). SKP ها با سهولت بیشتری نسبت به دیگر سلولهای بنیادی بالغ قابل دسترس هستند که بدین لحاظ منبع اتولوگ مناسبی جهت سلول درمانی محسوب می شوند.

در مطالعات پیشین سلولهای پیش‌ساز مشتق از پوست فور اسکین انسانی جدا شد و تعیین هویت گردید و تمایز آنها به سلولهای نورون و گلیال مورد بررسی قرار گرفت (۳). علاوه بر آن یک روش کارآمد برای فریز کردن این سلولها به منظور ایجاد بانک سلولی برای استفاده در آینده مورد بررسی قرار گرفت (۴).

در مطالعات پیشین سلولهای بنیادی (سلولهای مزانشیم رت) تحت تأثیر عصاره پانکراسی ترمیمی به سلولهای پانکراتیک تبدیل شدند (۷). هدف در این تحقیق القای تولید سلولهای سازنده انسولین از پیش ساز های مشتق از پوست در حضور عصاره پانکراسی حاصل از ترمیم بعد از ۴۸ ساعت است، این عصاره دارای هورمونها و فاکتورهای رشد جهت تمایز است. در این تحقیق روشن گردید، پیش ساز های مشتق از پوست تحت تأثیر عصاره پانکراسی توانایی تمایز به سلولهای سازنده انسولین را دارا هستند.

مواد و روشها

نمونه های پوست مورد استفاده در این تحقیق، قطعات پوستی فوراسکین حاصل از عمل جراحی داوطلبانه ختنه بودند که از اتاق عمل سرپایی بیمارستان حضرت معصومه کرمانشاه تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند. در این مطالعه تعداد ۴۰ نمونه پوست فوراسکین انسانی در محدوده سنی ۴ هفته تا ۶ سال حاصل از اعمال جراحی داوطلبانه ختنه، مورد استفاده قرار گرفت. به والدین بیماران اطلاعات کافی داده شد و رضایت نامه گرفته شد. مطالعه تحت شرایط رعایت کامل نکات اخلاقی و با تأیید کمیته اخلاقی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام شد. قطعات پوست فوراسکین انسانی در لوله های فالکن حاوی HBSS در شرایط استریل و با حفظ زنجیره سرد (حمل لوله ها قبل و بعد از انتقال نمونه های پوست روی یخ) به آزمایشگاه کشت سلول منتقل گردید. نمونه های فوراسکین توسط HBSS تازه به طور کامل شستشو داده شدند. سپس هر نمونه با استفاده از تیغ بیستوری، قیچی و پنس ریز به طور کامل تشریح شد به طوری که هیپودرم و عروق خونی اضافی پاک سازی گردیده و به قطعات کوچک مستطیل شکل به ابعاد دو میلی متر در سه میلی متر تقسیم شد. سپس قطعات خرد شده مربوط به هر نمونه، به لوله های جداگانه حاوی محلول آنزیم ترمولایزین (۲۵۰ µg/ml در بافر HBSS) جهت جداسازی لایه درم از اپی درم منتقل شده و یک شب در دمای چهار درجه سانتی گراد قرار گرفت. روز بعد، با استفاده از یک فورسپس ریز اپیدرم با دقت از درم جدا شد. قطعات درم مجزا شده، سپس در آنزیم کلاژناز H (یک میلی گرم در میلی لیتر) به مدت ۴۵ دقیقه تحت همزدن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. مخلوط سلولی به دست آمده از هضم بافت درم، فیلتر شده و سپس در ۷۰۰g به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد. رسوب ته لوله، حاوی کلیه سلولهای حاصل از هضم بافت درم بود که جهت کشت اولیه در محیط تکثیری مورد استفاده قرار گرفت. محیط تکثیری از دو محیط کشت DMEM/F12 با نسبت سه به یک تهیه شد و مکملهای زیر با مقادیر مذکور به آن اضافه گردیدند: B27 بدون ویتامین A (دو درصد)، bFGF (۴۰ نانوگرم در میلی لیتر)، EGF (۲۰ نانوگرم در میلی لیتر)، پنی سیلین (۱۰۰ واحد در میلی لیتر)، جنتامایسین (۲۵ میکروگرم در میلی لیتر) و آمفوتریسین (یک میکروگرم در میلی لیتر). سپس رسوب سلولی در پنج میلی لیتر محیط تکثیری به حالت تعلیق درآمد. پس از شمارش، تعلیق سلولی با تراکم زیاد (۰/۸ الی $۱۰^{۶}$× ۱/۲ سلول در هر سانتیمتر مربع) در فلاسکهای ۲۵ سانتیمتر مربع (NUNC) ریخته شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با پنج درصد CO_2 و ۹۵ درصد رطوبت انکوبه شد. لازم به ذکر است در این مرحله چون کشت به صورت معلق بود، کلیه فلاسکهای کشت از قبل توسط پلی-هما پوشانده شده بودند. در هر هفته سه بار محیط تکثیری به فلاسکهای کشت اضافه شد. در روز هفتم پس از کشت، به منظور مضاعف سازی کشت و خالص سازی سلولها، مجموعه های سلولی که به صورت کره (Sphere) شناور بودند جدا و پاساژ داده شدند.

تهیه عصاره پانکراسی: برای تهیه عصاره پانکراسی از رتهای نژاد ویستار هشت هفته ای استفاده شد، رتهایی که به مدت یک شبانه روز غذا دریافت نکرده بودند با تزریق داخل صفاقی(IP) داروهای بیهوشی کتامین-ketamine HCL (50mg/ml Alfasan Holland) HCL- و سدیم پنتوباربیتال Sodium pentobarbital (50mg/ml Lundbeck USA) بیهوش شده طی عمل جراحی تقریباً تمام بخش طحالی پانکراس برداشته شد (۶۰ درصد) و بخش مزانتریک سالم نگه داشته شد. بعد از ۴۸ ساعت رت قطع نخاعی شده، فورا تشریح و پانکراس ترمیمی جمع آوری شد، بافت مورد نظر وزن شده و سریعاً در فسفات بافر سالین خنک (PBS) همراه با مهار کننده پروتئاز کوکتیل (Sigma) قرار داده شد. تمام مراحل در محیط خنک انجام گرفت. در مرحله بعد بافت مورد نظر هموژنیزه گردید. بافت هموژنیزه را طی دو مرحله در دستگاه سانتریفیوژ

قرار داده، مرحله اول ۳۰۰۰ دور در ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و مرحله دوم ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه. در پایان مایع رویی شفاف که همان عصاره مورد نظر است جمع آوری شد، برای سنجش غلظت پروتئین عصاره از روش برادفورد استفاده شده و غلظت پروتئین عصاره اندازه گیری گردید . عصاره تهیه شده در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد برای استفاده های بعدی قرار داده شد.

تمایزSKP به سلول انسولین ساز: برای ایجاد تمایز، هر بار کرههای حاصل از پاساژ پنجم انتخاب شدند. برای ایجاد تمایز به سلول سازنده انسولین، محتوای فلاسکها در ۷۰۰g به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس سلولها با پیپت کردن جدا شده و در محیط کشت تمایزی شناور شدند. با توجه به اینکه در این مرحله، کشت به صورت چسبنده بود، کف فلاسکهای کشت با پلی- دی-لایزین پوشانده شد. سپس سلولهای منفرد با تراکم کم حدود $۵×۱۰^{۵}$ سلول در هر سانتیمتر مربع در فلاسکهای ۲۵ سانتیمتر مربعی (NUNC) پوشش داده شده با پلی- دی- لایزین در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با پنج درصد CO_2 و ۹۵ درصد رطوبت انکوبه شدند. به منظور تمایز به سمت سلولهای سازنده انسولین به مدت ۱۴ روز در محیط کشت DMEM حاوی FCS ۱۰ درصد در حضور عصاره پانکراسی با غلظت ۲۰۰ µg/ml و ۲۰ mmol/L گلوکز قرار گرفتند. محیط کشت هر سه روز یک بار با محیط کشت حاوی مواد تمایزی تعویض می شد.

رنگ آمیزی دیتیزون: تهیه محلول ذخیره دیتیزون: ۵۰ میلی گرم از پودر دیتیزون در ۵ میلی لیتر دی متیل سولفوکساید حل شد. لازم به ذکر است که این محلول ذخیره برای استفاده های بعدی در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای رنگ آمیزی سلولها محلول رقیق تری از دیتیزون با غلظت ۰/۱ mg/ml از ذخیره تهیه شد. برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ذخیره به حجم ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت رسانده شد. سپس این محلول از فیلتر غشایی با منافذ ۰/۲ میکرومتر عبور داده شده تا برای افزوده شدن به محیط کشت سلولها استریل شود. این محلول به عنوان محلول کار مورد استفاده قرار گرفت. برای رنگ آمیزی، سلولها در محلول کار دیتیزون برای ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس سلولها ۳ بار با HBSS شستشو داده و زیر میکروسکوپ معکوس عکسبرداری انجام شد. خوشه های رنگ گرفته به رنگ قرمز در زیر میکروسکوپ قابل مشاهده بود. بعد از آزمایش، پلیت حاوی سلولها با محیط کشت حاوی ۱۰FCS درصد پر شد و رنگ پس از گذشت ۵ ساعت کاملاً ناپدید شد. در بعضی از آزمایشها، تعداد سلولهای رنگ گرفته با دیتیزون در محیط کشت به وسیله شمارش سلولهای قرمز رنگ بعد از تریپسینه شدن به دنبال رنگ آمیزی دیتیزون مشخص شد.

روش انجام ایمنوسیتوشیمی برای تشخیص انسولین: به منظور تأیید تمایز سلولهای SKP انسانی به سلول انسولین ساز و تعیین ماهیت سلولهای تمایز یافته از آنتی بادی اختصاصی انسولین استفاده شد و بیان آن با روش ایمونوسیتوشیمی مورد بررسی قرار گرفت. سلولهای مورد نظر جهت بررسی ایمونوسیتوشیمی در پلیتهای ۹۶ خانه کشت داده شدند و به ترتیب زیر مورد آزمون قرار گرفتند. سلولها با پارا فرمالدئید ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق فیکس گردید. شستشو به وسیلهٔ محلول شستشو (Tween+ PBS ۰/۰۵درصد) دو بار و هر بار پنج دقیقه در درجه حرارت اتاق انجام شد. با محلول نفوذپذیری (PBSحاوی تریتون X-100 یک درصد) پلیتها به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق انکوبه شد. شستشو مانند مرحلهٔ ۳ انجام شد. برای جلوگیری از اتصالات غیراختصاصی مرحله مسدود سازی با محلول بلوک کننده (BSA یک درصد) به مدت ۴۵ دقیقه درحرارت ۳۷ درجه سانتی گراد انجام گردید. در این مرحله آنتی بادی اولیه ضد انسولین جهت شناسایی سلولهای تمایز یافته در

محلول رقیق کننده آنتی بادی که از قبل آماده شده بود با نسبت ۱:۵۰، رقیق و به میزان ۷۰ میکرولیتر به هر خانه پلیت سلولی مورد نظر اضافه شد. در این مرحله پلیت به مدت یک شب در درجه حرارت چهار درجه سانتی گراد انکوبه گردید. شستشو همانند مرحلهٔ ۳ انجام شد. اضافه کردن آنتی بادی ثانویه کونژوگه به FITC: آنتی بادی ثانویه با محلول رقیق کننده آنتی بادی که از قبل آماده شده است به نسبت یک به ۲۰۰ به خوبی مخلوط شده و به میزان ۷۰ میکرولیتر به کلیه چاهکها اضافه شد و یک ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. شستشو مانند مرحلهٔ ۳ ولی سه بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. بررسی در زیر میکروسکوپ فلورسانس انجام شد. سلولهای رنگ شده با هر کدام از آنتی بادیها شمارش و با تعداد کل سلولها مقایسه گردید.

سنجش ترشح انسولین از سلولهای IPC تمایز یافته در پاسخ به تحریک گلوکز: برای تعیین اینکه IPC های تمایز یافته به غلظت گلوکز پاسخگو هستند یا نه، انسولین ترشحی توسط سلولها پس از تأثیر غلظتهای مختلف گلوکز، با استفاده از کیت الایزای فوق حساس انسولین انسانی اندازه گیری شد. برای این منظور سلولها ۳ بار با بافر KRBH شستشو داده شدند و برای مدت یک ساعت در این بافر قرار داده شدند. سپس در آزمایشهای جداگانه سلولها در بافر KRBH حاوی گلوکز با غلظتهای ۰، ۱، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی مولار برای ۲ ساعت انکوبه شدند. سپس مایع رویی جمع آوری شد و توسط کیت الایزای فوق حساس میزان انسولین به طور جداگانه اندازه گیری شد. این کیت برای اندازه گیری کمی دقیق انسولین در سرم یا پلاسمای انسانی طراحی شده است و از شرکتALPCO Diagnostics, Axxora, Germany تهیه شد .

نتایج

کشت اولیه SKP های به دست آمده از فوراسکین انسانی: در روز اول پس از جدا سازی سلولها، یک جمعیت سلولی هتروژن متشکل از سلولهای خونی، فیبروبلاست های درم و سلولهای پیش ساز مشتق از پوست، همگی به صورت سلولهای منفرد مشاهده شدند. سه روز پس از کشت اولیه، سلولهای منفرد شناور شروع به تشکیل کرههای کوچک معلق کردند. بیشتر سلولهای چسبنده در کف ظرف قرار گرفته و در نتیجه در لایه سلولهای معلق، تراکم کمتری نسبت به روز اول مشاهده شد (شکل 1A). در روز هفتم برخی از کرهها به یکدیگر متصل شدند و کرههای بزرگ را تشکیل دادند. تعداد سلولهای منفرد کاهش محسوسی داشت به طوری که در اکثر میدانهای دید انتخابی، ترکیبی از کرههای کوچک و بزرگ مشاهده گردید (شکل1B). در روز هفتم پس از کشت، کرهها با تقسیمات متوالی خود جمعیت سلولی قابل توجهی را ایجاد کردند. به دلیل افزایش تراکم کرهها، تکثیر آنها از این به بعد به کندی صورت گرفت. بنابراین در این تاریخ عمل پاساژ سلولی انجام گرفت. پس از سه الی چهار پاساژ، جمعیتهای خالصی از کرههای شناور به دست آمدند. هر بار اندازه کرهها نسبت به پاساژهای قبلی بزرگتر شد به طوری که از پاساژ پنجم (1C) به بعد کرهها به دلیل بزرگی و سنگینی تمایل به چسبیدن به کف ظرف کشت را نشان دادند. در این مطالعه کرهها به مدت حدود چهار ماه (تقریباً معادل ۱۶ پاساژ متوالی) در محیط کشت گسترش پیدا کرد.

تمایز SKP های به دست آمده از فوراسکین انسانی در شرایط تمایزی IPC: مطابق روش شرح داده شده در بخش روشها، القای تمایز IPC پس از پاساژ پنجم انجام شد. ابتدا سلولهای کرهها با پیپت کردن، جدا و به فلاسکهای پوشش داده شده با پلی- دی-لایزین حاوی محیط تمایزی منتقل شدند. در این مرحله سلولها به کف ظرف چسبیدند.۲۴ ساعت بعد، سلولهای چسبیده به کف

ظرف از نظر مورفولوژی دچار تغییراتی شدند. این سلولها به شکل کشیده در آمده و به صورت یک لایه سلولی دارای زوائد درآمدند (شکل 1D). سلولهایی که در اثر روند انتقال کرهها دچار مرگ سلولی شدند شناور باقی مانده و در مراحل بعدی تعویض محیط کشت حذف شدند. در روز های بعد، سلولهای چسبیده به کف ظرف از نظر مورفولوژی دچار تغییراتی شدند. در این محیط پس از ۷ روز خوشه های شبه جزیره کوچکی تشکیل شد. در روزهای بعد تغییرات مورفولوژیکی کاملاً محسوس بود. خوشه‌های شبه جزیره بیشتر و بزرگتر شده و از کف کمی جدا شده و به شکل معلق در آمدند. به طوری که در روز ۱۴ خوشه های بزرگ کاملاً مشخص شدند (شکل E, G, 1H). بنابراین، بعد از گذشت دو هفته از القای تمایز در حضور عصاره پانکراسی به سلولهای شبه جزیره تولید کننده انسولین تبدیل شدند.

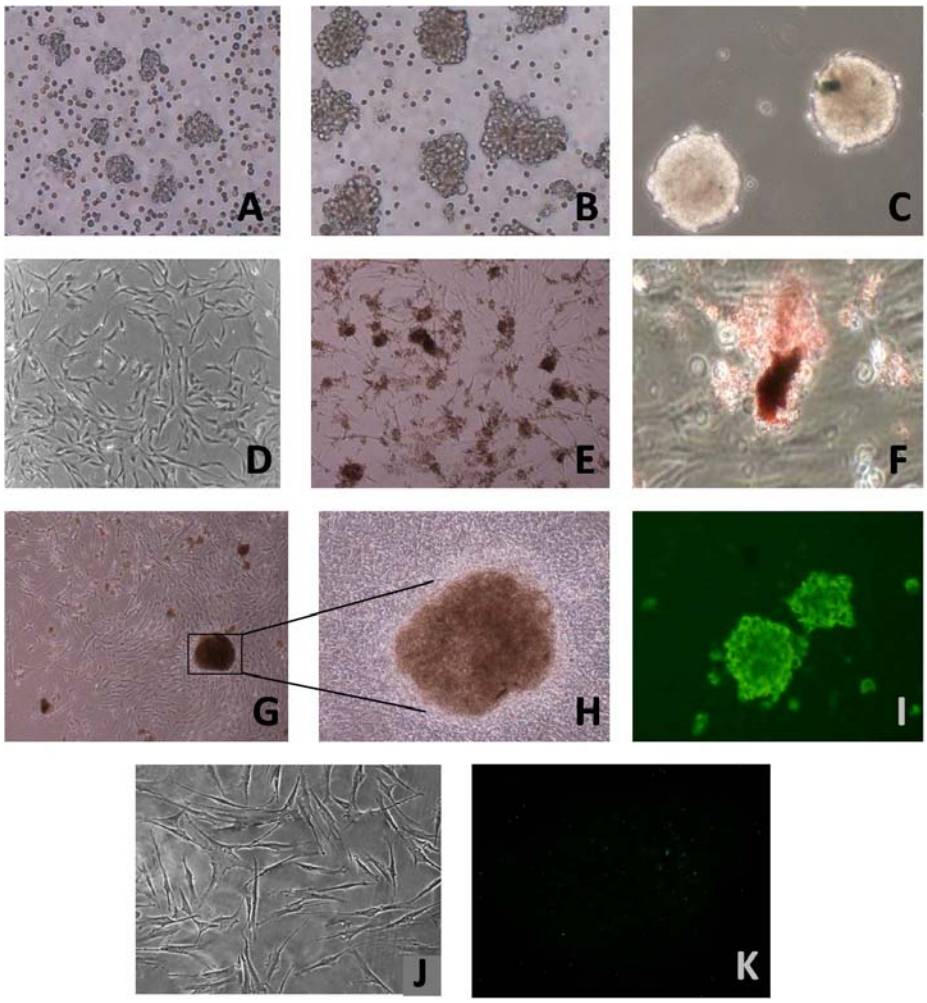
رنگ آمیزی خوشه های شبه جزیره با دیتیزون و ایمونوسیتوشیمی: سلولهای بتا پانکراسی، انسولین را به شکل هگزامری حاوی دو مولکول روی (Zn) بسته بندی می‌کنند. رنگ دیتیزون یک عامل شلاته کننده اتم Zn می باشد، که به طور اختصاصی سلولهای بتا را که حاوی مقادیر فراوانی روی هستند، به رنگ قرمز خونی رنگ آمیزی می کند. خوشه‌های شبه جزیره‌ای ۱۵ دقیقه پس از افزودن رنگ دیتیزون، رنگ قرمز خونی به خود گرفتند (شکل1F). SKPهای تمایز نیافته این رنگ را به خود نگرفتند. این نتایج نشان دهنده تمایز سلولی و وجود انسولین در سلولهای تمایز یافته بود.

جهت بررسی ایمونوسیتوشیمی سلولهای تمایز یافته، ابتدا، سلولها فیکس شده و مراحل ایمونوسیتوشیمی طبق روش مذکور در بخش روشها انجام گردید. خوشه های شبه جزیره نسبت به آنتی بادی انسولین مثبت بودند و حدود ۴۰ درصد سلولها در این خوشه ها انسولین را بیان نمودند. در حالی که سلولهای SKP با آنتی بادی ضد انسولین رنگ نگرفتند. رنگ آمیزی با آنتی بادی اختصاصی انسولین با روش ایمونو فلورسانس (شکل 1I) انجام شد. سلولهای SKP که در طی ۱۴ روز در عدم حضور عصاره پانکراسی کشت یافته بودند (به عنوان گروه کنترل) نیز با روش رنگ آمیزی دیتیزون و ایمونوفلورسانس بررسی شدند. همان طور که در شکل مشاهده می شود این سلولها رنگ نگرفته اند (شکل 1J, K). این نتایج می تواند بیان کننده تأثیر مثبت عصاره پانکراسی بر تمایز سلولها باشد.

به منظور تخمین درصد سلولهای انسولین مثبت در هر نمونه بیولوژیک در روز چهاردهم مرحله آخر تمایز، محدوده هایی به طور تصادفی (در هر نمونه سه تکرار) انتخاب شد. سپس تعداد سلولها در خوشه ها که انسولین مثبت بودند به تعداد کل سلولهای موجود محاسبه گردید. میانگین به دست آمده ۳ ± ۳۷ درصد نشان دهنده درصد سلولهای انسولین مثبت بود.

سنجش مقدار انسولین ترشحی در پاسخ به غلظتهای مختلف گلوکز: برای مشخص شدن این موضوع که مقدار ترشح انسولین در خوشه های شبه جزیره نسبت به تغییرات غلظت گلوکز چگونه است، انسولین ترشح شده در معرض غلظتهای مختلف گلوکز توسط کیت الایزای فوق حساس انسولین اندازه گیری شد.

نمودار روند ترشح انسولین در پاسخ به غلظتهای مختلف گلوکز در شکل ۲ آمده است. همان طور که در نمودار مشاهده می شود با افزایش غلظت گلوکز ترشح انسولین افزایش یافت و این افزایش ارتباط معنی داری ($P \leq ۰/۰۵$) را در غلظتهای پایین گلوکزنسبت به غلظتهای بالاتر گلوکز نشان داد. هرچند، افزایش غلظت گلوکز از ۲۰ به ۳۰ میلی مولار کاهش کمی در ترشح انسولین توسط این سلولها را نشان می دهد. این نتایج تأیید کننده پاسخگو بودن IPC ها به نوسانات گلوکز در یک رفتار وابسته به غلظت بود و بنابراین عملکردی بودن این سلولها را نشان می دهد.

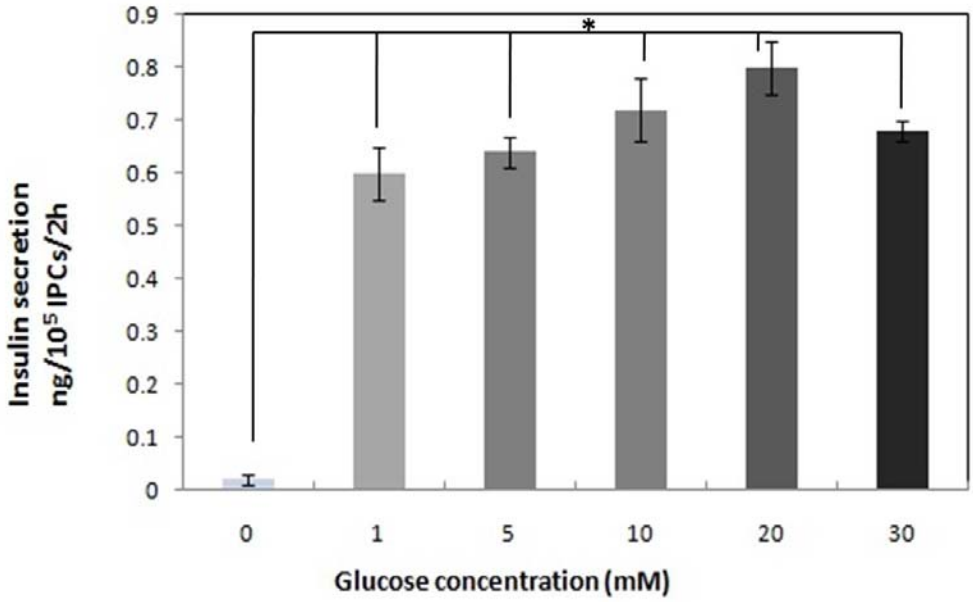


شکل ۱- تغییرات مورفولوژیک و نتایج حاصل از رنگ آمیزی دیتیزون و ایمونو فلورسنس. مجموعه ای از سلولهای کشت داده شده در سومین (A) و هفتمین (B) روز بعد از جداسازی. در روز سوم کرههای کوچک تازه تشکیل شده و در روز هفتم کرههای بزرگ در شکل قابل مشاهده اند. روز هفتم پس از پاساژ پنجم (C) ، کرهها بسیار بزرگتر و سنگین شده اند و تمایل به چسبیدن به کف ظرف دارند. مرحله اول تمایز، سلولها به کف چسبیده اند و به شکل کشیده و دوکی درآمده اند و زوایدی هم در آنها به وجود آمده است (D) روز هفتم تمایز(E)، روز چهاردهم تمایز (G) یک خوشه شبه جزیره بزرگ که از لحاظ مرفولوژی در میان سایر سلولها قابل تشخیص است (H) اجتماع سلولی رنگ پذیرفته با دیتیزون در روز چهاردهم تمایز(F). سلولهای شبه جزیره توسط رنگ دیتیزون به رنگ قرمز خونی در آمده اند. بررسی ایمونوسیتوشیمی خوشه های شبه جزیره از نظر بیان انسولین (I) با روش ایمونو فلورسانس. گروه کنترل (سلولهای SKP که مدت ۱۴ روز در عدم حضور عصاره پانکراسی کشت یافته اند) پس از رنگ آمیزی دیتیزون (J) و ایمونو فلورسانس (K). همان طور که مشاهده می شود این سلولها رنگ نگرفته اند.

بحث و نتیجه گیری

تعدادی از مطالعات منتشر شده در سالهای اخیر، این نگرش قدیمی را که سلولهای بنیادی موجود در بافتهای بدن، محدود به تولید انواع سلولی همان بافت می باشند، به چالش کشیده اند. مطالعات جدید نشان داده‌اند که سلولهای بنیادی بزرگسال، اگر در محیط کشت یا به دنبال پیوند هتروتوپیک در معرض محیطهای خارجی مناسب قرار بگیرند، پتانسیل تمایزی با محدوده وسیع‌تری از سلولها را خواهند داشت. بنابراین به نظرمی رسد که این سلولها بسیار بیشتر از یافته‌های قبلی، دارای قابلیت تمایز

بوده و یا مشابهت بیشتری به پیش‌سازهای جنینی دارند (۱۸).



شکل ۲- بررسی غلظت انسولین ترشح شده در سلولهای تمایز یافته به IPC پس از تأثیر غلظتهای مختلف گلوکز. P≤۰/۰۵ با * نمایش داده شده است. داده ها به صورت Mean±SD نمایش داده شده است.

امروزه علاقه رو به گسترشی در توسعه استراتژیهای جایگزینی بافت جهت درمان بیماریهایی از قبیل دیابت، سکته قلبی و بیماری پارکینسون وجود دارد. در حال حاضر بیشتر توجهات بر روی استراتژی امیدوار کننده سلولهای بنیادی جنینی متمرکز شده است، اما مطالعات جدید پیشنهاد می کنند که SKP ها دارای پتانسیل وسیع تمایزی غیر معمول در این زمینه هستند. به طور مثال، مطالعات نشان داده اند که SKP های جدا شده از انسان و دیگر پستانداران می توانند به سوی دودمان اکتودرمی (نورونها و گلیا)، مزودرم (از قبیل سلولهای چربی و ماهیچه صاف) و سلولهای زایای جنینی تمایز حاصل کنند (۱۱، ۱۳، ۱۷، ۳۱ و ۳۲). در مطالعه ای که توسط Guo و همکارانش انجام شد آنها گزارش کردند که SKP ها پتانسیل وسیع تمایزی مشابه ای داشته به طوری که در شرایط خاص کشت برون تن می توان SKP ها را وادار به تمایز به سوی سلولهای اندودرمی (مثل سلولهای اندوکرین یا IPC) کرد (۱۵).

نتایج به دست آمده از مطالعه فوق ممکن است در نگاه اول، غیر معمول باشد زیرا پانکراس و پوست به طور طبیعی از دو منبع مختلف به ترتیب از آندودرم و اکتودرم مشتق می گردند که دو لایه زایای جنینی مجزا محسوب می شوند. اما یافته های حاصل از مطالعات قبلی محققان، این امر را تأیید می کند. در مطالعه‌ای که توسط Edlund انجام شد، روشن ساخت که جزایر پانکراسی در مجموعه‌ای از تنظیم کننده‌های رشد به همراه نورونها در طی رشد و نمو دارای اشتراک هستند (۱۲). علاوه بر این، یافته های حاصل از مطالعات دیگری حاکی از آن بود که سلولهای پیش ساز پانکراسی می توانند تشکیل سلولهای شبه نورونی دهند (۸ و ۲۷). از سوی دیگر، محققان دیگری نشان دادند که سلولهای بنیادی عصبی نیز

می توانند به سلولهای IPC در شرایط برون‌تن تمایز حاصل کنند (۱۶). همه این مطالعات تأیید کننده ارتباط نزدیک بین سلولهای عصبی و جزایر لانگرهانس پانکراس می‌باشد. به علاوه، SKP ها توانایی خود به خودی به سوی دودمان عصبی پس از برداشت فاکتورهای رشد مثل bFGF و EGF از محیط کشت را دارند. این موضوع دلالت بر آن دارد که SKP ها نیز می توانند نوروژنیک باشند. بر اساس تشابه دودمان عصبی و پانکراس، رابطه بین SKP ها و دودمان عصبی موجب برانگیخته شدن حس کشف ارتباط بین SKP ها و سلولهای پانکراس گردیده است. علاوه بر اینها، مطالعه ای جدید نشان داد که سلولهای بنیادی بالغ مشتق از پوست در بسیاری از ویژگیها با سلولهای بنیادی پانکراسی مشترک هستند (۲۱). بنابراین، بر اساس تشابهات بین نورونها و پانکراس و بین سلولهای بنیادی پوست و پانکراس، این امکان وجود دارد که SKP ها دارای پتانسیل تمایز به سوی سلولهای اندوکرین پانکراس باشند.

مطالعات اخیر اثبات کرده اند که امکان تولید IPC ها از سلولهای پیش ساز از منابع مختلف شامل پانکراس، کبد، اپیتلیوم روده، مغز استخوان و مغز و همین طور سلولهای بنیادی جنینی از منبع انسان و موش وجود دارد (۱، ۲، ۹، ۱۵، ۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۹ و ۳۵). هرچند، برخی موانع از قبیل مقابله سیستم ایمنی بر علیه سلولهای بتای تازه تشکیل شده مشتق از سلولهای بنیادی ناهمگون جنینی و بالغ هنوز لاینحل باقی مانده است و همچنین امکان به دست آوردن تعداد مناسب سلولهای بنیادی بالغ اتولوگ از این منابع با مشکلاتی مواجه است. بنابراین، به نظر می رسد که سلولهای SKP که به آسانی نیز قابل دسترس هستند، به عنوان یک منبع جهت تمایز و تولید سلولهای IPC در شرایط برون تنی گزینه مناسبی باشند.

در این مطالعه از عصاره پانکراس ترمیمی و گلوکز به مدت دو هفته به منظور القای تمایز استفاده شد، بر اساس مطالعات گذشته ثابت شده است که عصاره پانکراسی حاصل ترمیم دارای انواعی از هورمونها و فاکتورهای رشد مختلف است که توانایی تمایز سلولهای بنیادی به سلولها ی سازنده انسولین را دارد (۷). Katdare نشان داد که قطع قسمتی از پانکراس در موشهای دیابتی، سبب ترمیم پانکراس و درمان دیابت می گردد. بنابراین می توان به این نتیجه رسید که پانکراس قادر به بازسازی جزایر لانگرهانس است و این امر توسط سلولهای بنیادی موجود در اپیتلیوم مجاری پانکراس، صورت می گیرد. زیرا این سلولها می توانند تحت تأثیر فاکتورها ی مختلف و ترکیبات ماتریکس خارج سلولی به سلولهای جزیره ای تمایز یابند (۱۹). Vaka در سال ۲۰۰۵ به این نتیجه رسید که با تأثیر محیط کشت سلولهای پانکراسی جنینی، بر سلولهای بنیادی می توان آنها را به سلولهای سازنده انسولین تمایز داد (۳۳). در این تحقیق، تأثیر عصاره پانکراسی رت با غلظت ۲۰۰μg/ml در تمایز SKP ها به سلولهای سازنده انسولین بررسی شد و نتا یج به دست آمده نشان دادSKP ها می توانند تحت تیمار با عصاره پانکراسی به سلولهای سازنده انسولین تمایز یابند. در این پژوهش علاوه بر ارزیابی مورفولوژیک، میزان انسولین تولید شده در مایع رویی نیز اندازه گیری شد. در ارتباط با روند تمایز SKP ها به سلولهای سازنده انسولین، ارزیابی مورفولوژیک به عمل آمده نشان داد سلولها ی حاصل از تمایز به صورت تجمعات سلولی و دارای سلولها چند بعدی می باشد. در ارزیابی به عمل آمده از رنگ آمیزی اختصاصی دیتیزون و همچنین رنگ آمیزی ایمونو فلورسانس با آنتی بادی اختصاصی انسولین، حضور انسولین در تجمعات سلولی مذکور به اثبات رسید که این نیز ماهیت سلولهای تمایز یافته را تأیید می کند. از طرفی دیگر ارزیابیهای ایمونواسی به عمل آمده در روز ۱۴ جهت سنجش میزان انسولین توانایی تولید انسولین را در یک رفتار وابسته به غلظت نشان می دهد که از ویژگیها ی اساسی سلولهای جزایر پانکراتیک می باشد و این نیز تأیید دیگری بر تمایز این سلولها می باشد.

از میان مقالاتی که از عصاره پانکراسی جهت تمایز استفاده کردند می توان به Choi و همکاران اشاره کرد، آنها نیز از عصاره پانکراسی ترمیمی به عنوان عامل تمایزی استفاده کردند و توانستند سلولها ی مزانشیم رت را به سلولهای سازنده انسولین تبدیل کنند. این گروه غلظتهای متفاوتی از عصاره پانکراسی را بررسی و غلظت ۲۰۰ μg/ml را غلظت مؤثر تمایز گزارش کرد (۷). در این مطالعه نیز ازغلظت ۲۰۰μg/ml و همچنین از گلوکز با غلظت۲۰ mmol/L استفاده شد. براساس نتایج حاصله، هفته بعد از القای تمایز میزان انسولین ترشح شده ۰/۶ ng/ml بود. بر این اساس می توان نتیجه گرفت سلولهای پیش ساز پوست تحت القای عصاره پانکراسی در مقایسه با سلولهای مزانشیم توانایی تمایزی بهتری دارد. در این تحقیق گلوکز با غلظت ۲۰ mmol/L استفاده شد، در تحقیقات پیشین از غلظتهای پایین جهت تمایز استفاده شده بود. مجموعه مشاهدات ، بیانگر تأثیر مثبت حضور عصاره پانکراسی حاصل ترمیم بر روند تمایز سلولهای پیش ساز پوست به سلولهای انسولین ساز بود که این امر با گزارشهای قبلی مبنی بر تأثیر عصاره پانکراسی بر تمایز انواع دیگری از سلولها، مطابقت دارد. از این پژوهش می توان نتیجه گرفت که سلولهای پیش ساز پوست قابلیت تمایز به سلولهای سازنده انسولین را در حضور عصاره پانکراسی تحت شرایط آزمایشگاهی دارد و تمایز آنها می تواند گامی درراستای سلول درمانی و تولید سلولهای سازنده انسولین و درمان دیابت قندی در صورت تکمیل مطالعات مربوطه باشد.

منابع

1.Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. (2001) Insulin production by human embryonic stem cells. Diabetes 50, 1691–1697.

2.Bai L, Meredith G, Tuch BE. (2005) Glucagon-like peptide-1 enhances production of insulin in insulin-producing cells derived from mouse embryonic stem cells. J. Endocrinol. 186, 343–352.

3.Bakhtiari M, Mansouri K, Mostafaie A, Sadeghi Y, Mozafari H, Ghorbani R, et al. (2010) Isolation of skin-derived precursors from human foreskin and their differentiation into neurons and glial cells. TUMJ 68, 508-515.

4. Bakhtiari M, Mansouri K, Sadeghi Y, Mostafaie A (2012) Proliferation and differentiation potential of cryopreserved human skin-derived precursors. Cell Prolif. 45, 148-157.

5.Bonner-Weir S, Weir GC (2005) New sources of pancreatic β cells. Nat. Biotechnol. 23, 857–861.

6.Brennand K, Huangfu D, Melton D (2007) All β-cells contribute equally to islet growth and maintenance. PLoS Biol. 5: e163.

7.Choi KS, Shin JS, Lee JJ, Kim YS, Kim SB, Kim CW (2005) In vitro transdifferentiation of rat mesenchymal cells into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. Biochem Biophys Res Commun 330, 1299-305.

8.Choi Y, Ta M, Atouf F, Lumelsky N. (2004) Adult pancreas generates multipotent stem cells and pancreatic and nonpancreatic progeny. Stem Cells 2, 1070–1084.

9.D'Amour AK, Bang AG, Eliazer S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, et al. (2006) Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. Nat. Biotechnol. 24, 1392–1401.

10.Dyce PW, Zhu H, Craig J, Li J (2004) Stem cells with multilineage potential derived from porcine skin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 316, 651–658.

11.Dyce PW, Wen L, Li J. (2006) In vitro germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. Nat. Cell Biol. 8, 384–390.

12.Edlund H. (2002) Pancreatic organogenesis: developmental mechanisms and implications for therapy. Nat. Rev. Genet. 3, 524–532.

13.Fernandes Karl J.L, Jean G.T, Freda D. (2007) Miller Multipotent skin-derived precursors: adult neural crest-related precursors with therapeutic potential Phil. Trans. R. Soc. B 363, 185–198.

14.Fujikawa T, Oh SH, Pi L, Hatch HM, Shupe T, Petersen BE (2005) Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells. Am. J. Pathol. 166, 1781–1791.

15.Guo W, Miao C, Liu S, Qiu Z, Li J, Duan. (2009) Efficient differentiation of insulin-producing cells from skin-derived stem cells. Cell Prolif. 42, 49–62

16.Hori Y, Gu X, Xie X, Kim SK. (2005) Differentiation of insulin producing cells from

human neural progenitor cells. PLoS Med. 2, e103.

17.Joannides A, Gaughwin P, Schwiening C, Majed H, Sterling J, Compston A, Chandran S (2004) Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin-derived stem cells. Lancet 364, 172–178.

18.Joshi CV, Enver T (2002) Plasticity revisited. Curr Opin Cell Biol 14, 749-755

19.Katdare MR, Bhonde RR, Parab PB. (2004) Analysis of morphological and functional maturation of neoislets generated in vitro from pancreatic ductal cells and their suitability for islet banking and transplantation. J Endocrinol 182, 105-12.

20.Kodama S, Kühtreiber W, Fujimura S, Dale EA, Faustman DL (2003) Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice. Science 302, 1223–1227.

21.Kajahn J, Gorjup E, von Tiede SBH, Paus R, Kruse C, Danner S (2007) Skin-derived human adult stem cells surprisingly share many features with human pancreatic stem cells. Eur. J. Cell Biol. 87, 39–46.

22.Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazer S, et al. (2008) Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. Nat. Biotechnol. 26, 443–452.

23.Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD.(2000) Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. Nat. Biotechnol. 18, 675–679.

24.Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. (2001) Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. Science 292, 1389–1394.

25.Nathan DM (1993) Long-term complications of diabetes mellitus. N. Engl. J. Med. 328, 1676–1685.

26.Pelengaris S, Khan M, Evan GI (2002) Suppression of Myc-induced apoptosis in β cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. Cell 109, 321–334.

27.Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, Enikolopov G, Asghar Z, Wheeler MB, et al. (2004) Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. Nat. Biotechnol. 22, 1115–1124.

28.Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV (2000) Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. N. Engl. J. Med. 343, 230–238.

29.Soria B, Roche E, Berná G, León-Quinto T, Reig JA, Martín F. (2000) Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. Diabetes 49, 157–162.

30.Teta M, Rankin MM, Long SY, Stein GM, Kushner JA (2007) Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors. Dev. Cell 12, 817–826.

31.Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabé-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD (2001) Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. Nat. Cell Biol. 3, 778–784.

32.Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD (2005) Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. Stem Cells 23, 727–737.

33.Vaca P, Martín F, Vegara-Meseguer JM, Rovira JM, Berná G, Soria B. (2006) Induction of differentiation of embryonic stem cells into insulinsecreting cells by fetal soluble factors. Stem Cells 24, 258-65.

34.Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, and King H (2004) “Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030,” Diabetes Care 27, 1047–1053.

35.Zalzman M, Anker-Kitai L, Efrat S. (2005) Differentiation of human liver-derived, insulin-producing cells toward the β-cell phenotype. Diabetes 54, 2568–2575.

In vitro differentiation of human skin-derived precursors cells into insulin producing cells by glucose and rat pancreatic extract

Mehrabi M.[1,2], Hosseinkhani S.[1], Jalili S.[3] and Mostafaie A.[2,4]

[1] **Biochemistry Dept., Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran**

[2]**Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, I.R. of Iran.**

[3] **Anatomy Dept., School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, I.R. of Iran**

[4] **Immunology Dept., School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, I.R. of Iran**

Abstract

Cell-therapy provides a promising alternative for the treatment of type 1 diabetes. One of the most proper candidates is multipotent skin-derived precursors cells (SKPs), which can be differentiated into insulin producing cells (IPCs). In this study, human skin-derived precursors (hSKPs) were isolated, expanded and differentiated into IPCs in vitro, through exposure to rat pancreatic extract (2 days after a 60% pancreatectomy). In order to differentiation, SKPs were Cultured in DMEM, containing FBS, pancreatic extract and glucose for 14 days. In order to verify insulin production in the cells, dithizone-staining, which is a method for insulin identification, was employed. In addition, insulin expression was examined immunocytochemically, and insulin secretion was examined using enzyme-linked immunosorbent assay. Cellular clusters appeared after approximately 14 days. The clusters were found to be immunoreactive to insulin. Cellular clusters were also able to secrete detectable amounts of insulin in glucose concentration dependent manner. The results of the current study showed that pancreatic extract treatment can differentiate human SKPs into functional IPCs. This may offer a safer cell source for future stem cell-based therapies.

Key words: Diabetes, Differentiation, Skin-derived precursors, Insulin producing cells.