اثر مایع رویی کشت فیبروبلاست‌ها در تمایز سلول‌های قابل برنامه‌ریزی با منشای مونوسیت به سلول‌های تولیدکننده انسولین

حوا چاپاری[1*]، فرح فرخی[1]
نوروز دلیرژ[2]، شهرام جوادی[3]
فاطمه تنهای کلاته سبز[1]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۲- گروه ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۳- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

[*] نویسنده مسئول: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، کد پستی: ۵۷۱۵۹۱۵۱۹۹
تلفن: ۰۹۱۴-۴۰۳۰۲۸۰
E-mail: havva.ch@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۲/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۳/۰۴

چکیده

زمینه و هدف: ویژگی‌های سلول‌های بنیادی در نوسازی و امکان تمایز به انواع سلول‌ها توجه دانشمندان را برای استفاده از این سلول‌ها در تولید سلول‌های ترشح‌کننده انسولین به‌خود جلب کرده است. در این مطالعه توانایی تمایز سلول‌های پیش‌ساز با منشای مونوسیت (PCMOs) به سلول‌های انسولین‌ساز تحت اثر فاکتورهای رشد و مایع رویی کشت فیبروبلاست‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. ***روش بررسی:*** مونوسیت‌های خون محیطی رت، در محیط RPMI با ۱۵٪ FBS، IL-3، MCSF و β-Mercaptoetanol به‌مدت شش روز کشت داده شدند، سپس سلول‌ها به‌مدت ۱۵ روز در محیط تمایزی حاوی HGF، EGF، نیکوتین آمید، ۱۵٪ مایع رویی کشت فیبروبلاست‌ها و گلوکز قرار گرفتند. تغییرات مورفولوژی سلول‌ها به‌وسیله میکروسکوپ معکوس بررسی و در مراحل مختلف غلظت انسولین، توسط کیت رادیوایمیونواسی سنجیده شد. هم‌چنین تولید انسولین با رنگ‌آمیزی اختصاصی DTZ مورد بررسی قرار گرفت. در تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش One-Way ANOVA استفاده شده و $P<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. ***یافته‌ها:*** مونوسیت‌ها در پاسخ به IL-3 و MCSF تمایززدایی شده و به سلول‌های PCMOs تبدیل شدند که این سلول‌ها توانایی تمایز به سلول‌های انسولین‌ساز را در محیط کشت تمایزی داشتند. مورفولوژی سلول‌های تمایز یافته مانند سلول‌های بتا بوده و میزان انسولین در مایع رویی سلول‌های حاصل از تمایز بسیار بیش‌تر از PCMOs بود ($P<0/05$). ***نتیجه‌گیری:*** EGF، HGF، نیکوتین آمید و مایع رویی کشت فیبروبلاست‌های رت عوامل تمایز PCMOs به سلول‌های تولیدکننده انسولین هستند. با توجه به نتایج این تحقیق، سلول‌های حاصل از تمایززدایی مونوسیت‌های خون محیطی رت (PCMOs) می‌توانند به سلول‌های انسولین‌ساز در حضور مایع رویی کشت فیبروبلاست‌ها تمایز یابند.

کلمات کلیدی: سلول‌های پیش‌ساز با منشای مونوسیت، سلول‌های انسولین‌ساز، مایع رویی کشت فیبروبلاست‌ها.

مقدمه

سلول‌های بنیادی (Stem cells)، سلول‌های تخصص‌نیافته با قدرت تکثیر زیاد هستند که دارای دو ویژگی اصلی می‌باشند: توانایی خودنوسازی (Self renewal) و قابلیت تمایز (Differentiation).[1] این سلول‌ها قادر هستند در محیط کشت به‌طور نامحدودی تقسیم شوند و با ایجاد بستر رشد و نمو و تاثیر برخی از فاکتورهای رشد به انواع سلول‌های مورد نظر تمایز یابند. این توانایی سلول‌های بنیادی در ارتباط با ژن‌های تکوینی آن‌ها می‌باشد که قادرند در شرایط فراهم- شده در محیط کشت، مشابه شرایط بدنی خود را بیان کنند و با تولید انواع پروتیین‌ها تمایز سلول را در جهت تبدیل شدن به سلول‌های تخصصی پیش ببرند.[2] مطالعاتی که با هدف مساعد نمودن شرایط کشت سلول‌های بنیادی و یا دست‌کاری‌های ژنتیکی در این سلول‌ها به‌منظور تبدیل آن‌ها به سلول‌های مناسب برای پیوند و جایگزینی سلول‌های صدمه‌دیده در بیماری‌های مختلف انجام‌شده، چشم‌گیر است و پتانسیل انواع مختلف سلول‌های بنیادی در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله دیابت امیدوارکننده است.[3] بیماری دیابت، مشتمل بر مجموعه‌ای از بیماری‌های مزمن است که از اختلال در متابولیسم

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-08]

گلوکز ناشی می‌شود، منشای بروز این اختلال، کاهش سطح انسولین پلاسما به‌علت تخریب سلول‌های بتای پانکراس (دیابت نوع یک یا دیابت وابسته به انسولین) یا مقاومت سلول‌ها در برابر اثرات انسولین (دیابت نوع ۲ یا غیروابسته به انسولین) است.[۴] استفاده از سلول‌های بنیادی در ایجاد سلول‌های تولیدکننده انسولین با مشکلاتی نظیر استحصال دشوار این سلول‌ها از بدن، تولید پایین انسولین، میزان بالای آپوپتوز و عدم توانایی سلول‌های تولیدشده در تعدیل گلوکز خون و غیره روبه‌روست،[۵] لذا ما از سلول درمانی کاربردی خیلی فاصله داشته و به اطلاعات بیش‌تر در زمینه زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی و یافتن منابع جدید سلولی نیاز داریم. مونوسیت‌ها در مغز استخوان توسط پیش‌سازهای سلول‌های بنیادی خون‌ساز که مونوبلاست نامیده می‌شود، ساخته می‌شوند و در حدود ۸-۳٪ لکوسیت‌ها را در خون تشکیل می‌دهند. این سلول‌ها مسئول فاگوسیتوز مواد خارجی در بدن هستند و به‌کمک آنتی‌بادی‌ها و کمپلمان‌ها، پاتوژن‌ها را شناسایی می‌کنند. مونوسیت‌ها از جریان خون به دیگر بافت‌ها مهاجرت می‌کنند، سپس به ماکروفاژها و دندریتیک سل‌های Dendritic Cells (DC) مقیم آن بافت تمایز می‌یابند.[۶] مونوسیت‌ها قابلیت تمایززدایی داشته و سلول‌های حاصل از تمایززدایی در محیط‌های خاص تمایزی می‌توانند به انواع سلول‌های انسولین‌ساز، کبدی و غضروفی تبدیل شوند.[۷و۸] فیبروبلاست فراوان‌ترین سلول بافت هم‌بند است که همه انواع رشته‌های بافت هم‌بند و مواد آلی ماده زمینه‌ای را سنتز می‌کند این سلول‌ها در انواع مختلف بافت‌ها یافت می‌شوند و با ترشح عوامل مختلف در رشد و تمایز سلول‌ها دخالت دارند، این سلول‌ها با ترشح فاکتورهایی نظیر IL-6, M-CSF, GM-CSF, IFN-β در تکامل سلول‌های دندریتیک موثر می‌باشند.[۹] هم‌چنین با ترشح فاکتورهای رشد فیبروبلاستی Fibroblast Growth Factors (FGFs) در عملکرد سلول‌های بتا و تکوین پانکراس نقش دارند.[۳] این مطالعه، گام نوینی در تولید سلول‌های ترشح‌کننده انسولین از تمایز مونوسیت‌های خون محیطی رت در محیط تمایزی و تحت تاثیر مایع رویی کشت فیبروبلاست‌ها، می‌باشد.

روش بررسی

مطالعه حاضر به‌صورت آزمایشگاهی (In vitro) در پژوهشکده زیست فن‌آوری دانشگاه ارومیه از آذر ۱۳۸۸ تا بهمن ۱۳۸۹ انجام گرفت. در این تحقیق از رت‌های نر نژاد Wistar با متوسط وزنی ۲۰۰gr و با سنی در حدود چهار تا پنج هفته، که از خانه حیوانات دانشکده علوم دانشگاه ارومیه تهیه شده بود، استفاده شد.

تهیه مایع رویی کشت فیبروبلاست‌ها Fibroblasts Conditioned Media (FCM): سلول‌های فیبروبلاست مورد استفاده، از رده سلولی C6-rat brain fibroblast می‌باشد که از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و با محیط کشت DMEM (Sigma Co., USA) در حضور ۱۰ درصد FBS یا سرم جنین گاوی (Gibco Co., UK)، ۱۰۰U/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰µg/ml استرپتومایسین در انکوباتور با ۵٪ CO_2 و دمای ۳۷ °C کشت داده شد. پس از این‌که سلول‌ها تکثیر شد و بیش از ۹۰٪ کف فلاسک کشت را پر کرد، مایع رویی سلول‌ها دور ریخته و بعد از دو بار شستشو با RPMI-1640 (Gibco Co., UK)، با محیط کشت RPMI-1640 و ۱۰٪ FBS، انکوبه شد. پس از ۲۴ ساعت مایع رویی سلول‌ها برداشته و بعد از سانتریفوژ به‌مدت پنج دقیقه با سرعت ۳۰۰۰rpm به‌عنوان مایع رویی کشت فیبروبلاست‌ها استفاده شد.

خون‌گیری از رت و جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC): در بیهوشی رت‌ها از کلروفرم استفاده شده و با سرنگ هپارینه از قلب خون گرفته شد. خون هپارینه (۲۰۰U/ml) با PBS رقیق شد و آن‌گاه خون رقیق‌شده با PBS به‌آرامی روی Histopaque-1083 (Sigma Co., USA) که حجم آن برابر با حجم خون رقیق‌نشده بود، ریخته شد. مجموعه خون رقیق‌شده و Histopaque-1083 به‌مدت ۳۰ دقیقه و سرعت ۴۰۰g سانتریفوژ گردید و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC) را که در حد فاصل هیستوپک و پلاسما جمع شده بودند به‌آرامی جمع‌آوری گردید و PBMC به‌دست آمده به‌منظور حذف هیستوپک همراه آن، با PBS مخلوط و با سرعت ۲۵۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سلول‌های حاصل مجدداً با PBS مخلوط و این‌بار به‌منظور حذف پلاکت همراه PBMC با سرعت ۲۵۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سلول‌های زنده با استفاده از تریپان بلو رنگ شده و با میکروسکوپ نوری شمارش شدند.[۱۰] جداسازی مونوسیت‌ها از سایر PBMC: مونوسیت‌ها در حدود ۱۰ درصد سلول‌های PBMC را شامل می‌شود. این سلول‌ها به‌علت تمایل زیاد بعد از دو ساعت انکوباسیون به کف فلاسک می‌چسبند و از سایر

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-08]

سلول‌ها جدا می‌شوند. به این منظور سلول‌های PBMC به‌تعداد $۳/۵–۴/۵\times۱۰^{۶}$ سلول در هر خانه پلیت ۱۲ خانه همراه با محیط RPMI-1640 با ۱۰۰U/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰µg/ml استرپتومایسین ریخته و دو ساعت در ۳۷ °C، ۵٪ CO_2 و ۹۰٪ رطوبت انکوبه گردید.

تمایززدایی از مونوسیت‌ها: بعد از اتمام زمان انکوباسیون، سلول‌هایی که به فلاسک نچسبیده بودند با دو بار شستشوی آرام جدا شدند. به سلول‌های چسبنده که اکثریت آن‌ها را مونوسیت‌ها تشکیل می‌دهند، محیط کشت جدید به اضافه ۵ng/ml Recombinant Rat MCSF (ProSci Co., USA)، ۰/۴ng/ml Recombinant Rat IL-3 beta (ProSci Co., USA) و ۱۴۰µmol/ml از β-Mercaptoethanol (Sigma Co., USA)، جهت تمایززدایی در هر یک از چاهک‌های پلیت حاوی مونوسیت به‌مدت شش روز ریخته شد که بعد از این مدت، مونوسیت‌ها به سلول‌های قابل برنامه‌ریزی با منشا مونوسیت Programmable Cells of Monocytic Origin (PCMOs) تبدیل می‌گردند.[۷و۸]

کشت PCMOs و قرار دادن آن‌ها تحت اثر مواد تمایزی: کشت این سلول‌ها به دو صورت تیمار و کنترل انجام گرفت. در گروه کنترل بعد از برداشت مایع رویی در روز شش، بر روی PCMOs فقط محیط کشت جدید یعنی RPMI-1640 و ۱۵٪ FBS ریخته شد ولی در گروه تیمار محیط جدید به‌اضافه ۱۰ng/ml Recombinant rat EGF (ProSci Co., USA) و ۲۰ng/ml از Recombinant rat HGF (Institute of Immunoligy Co., Ltd-Japan)، ۱۰mmol/ml نیکوتین آمید، ۱۵٪ مایع رویی کشت فیبروبلاست‌ها و ۵mmol/ml گلوکز ریخته شد و به‌مدت ۱۵ روز تحت اثر این مواد قرار گرفتند.

مطالعه میکروسکوپی: مورفولوژی سلول‌های کشت داده‌شده از اولین مرحله کشت مونوسیت‌ها تا مرحله نهایی به‌وسیله میکرو-سکوپ معکوس با بزرگ‌نمایی‌های مختلف بررسی شد. جزییات تغییرات مورفولوژیکی در طی دوره کشت و ویژگی‌های سلول‌ها در مراحل تمایززدایی و تمایز در بخش نتایج ارایه گردیده است.

بررسی تمایز سلول‌ها با رنگ‌آمیزی اختصاصی دیتیزون (DTZ): بعد از ۲۱ روز (پس از مرحله تمایز)، ابتدا ۱۰mg از پودر دیتیزون (Merck Co., Germany) در یک میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) حل گردید و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۵ °C– نگه‌داری شد. سپس به‌ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت موجود در هر خانه از پلیت ۱۲ خانه‌ای، ۱۰µl از این رنگ اضافه گردید. در مرحله بعد این سلول‌ها به‌مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شدند. پس از طی این مدت محیط کشت خانه‌ها خارج شده و سلول‌ها به‌آرامی سه مرتبه با PBS شستشو شدند، در مرحله آخر به هر خانه ۲ml محیط کشت اضافه گردید و سلول‌ها در زیر میکروسکوپ معکوس بررسی شدند. DTZ گرانول‌های انسولین را به‌طور اختصاصی رنگ می‌کند.[۱۱]

سنجش میزان انسولین با روش رادیوایمیونواسی: در روزهای شش و ۲۱ (بعد از مراحل تمایززدایی و تمایز)، در حدود یک میلی‌لیتر از مایع رویی سلول‌های تیمار و کنترل، بعد از این‌که یک ساعت در معرض ۲۰mmol/L گلوکز قرار گرفتند، جمع‌آوری شده و با کیت رادیوایمیونواسی انسولین (Millipore Co., USA) سنجیده شد. در نهایت غلظت انسولین توسط دستگاه Gamma counter، (PerkinElmer lifesciences) معلوم شد و هم‌چنین میزان انسولین درون سلولی نیز به این ترتیب سنجش شد که ابتدا در محیط سلول‌ها اسید استیک ۱mM/L ریخته و پس از چند دقیقه، سلول‌ها به‌روش مکانیکی از سطح پلیت جدا و به‌کمک دستگاه سونیکاتور (Soniprep 150, UK) خرد گردیدند. آن‌گاه نمونه‌ها با سرعت ۱۵۰۰rpm و به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ و غلظت انسولین در مایع رویی با روش رادیوایمیونواسی اندازه‌گیری شد. در تمامی مراحل، آزمایش‌ها با سه مرتبه تکرار به‌ثبت رسیدند و نتایج با برنامه SPSS ویراست ۱۶ تفسیر و بررسی شد. در تجزیه داده‌ها از روش One-Way ANOVA و Tukey's test استفاده شد و مقدار $P<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. ترسیم نمودارها در نرم‌افزار Excel انجام گرفت.

یافته‌ها

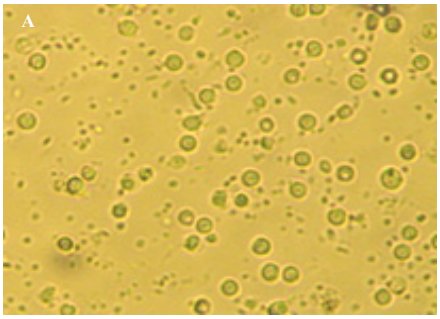
تغییرات مورفولوژیکی: مونوسیت‌های خون محیطی رت، سلول‌هایی کروی‌شکل و کوچک هستند، این سلول‌ها تحت تاثیر MCSF، IL-3 و β-Mercaptoethanol، بعد از شش روز، از لحاظ اندازه بزرگ‌تر شده و برخی از سلول‌ها در زیر میکروسکوپ معکوس به‌صورت دوتایی و در حال تقسیم مشاهده می‌شوند یعنی مونوسیت‌ها تمایززدایی شده و توانایی تقسیم دوباره را پیدا می‌کنند و نیز در طول مرحله تمایز، سلول‌ها به‌تدریج بزرگ‌تر می‌شوند و از حالت کروی خارج شده و حالت مثلثی به خود می‌گیرند و شکلی

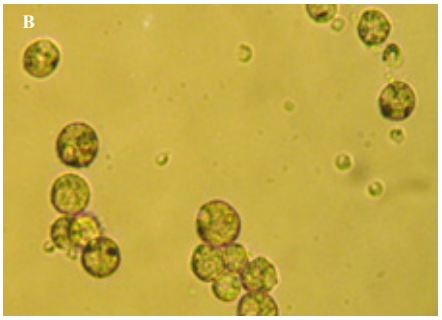
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-08]

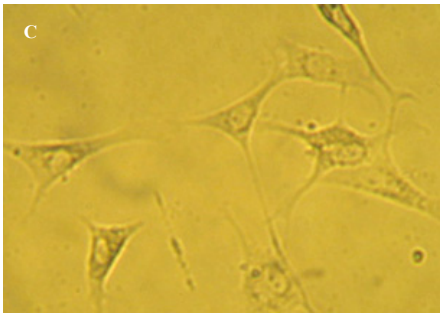
شبیه به سلول‌های بتا دارند (شکل ۱)، سلول‌ها ضمن تکثیر و تغییر مورفولوژیکی، تمایل به تشکیل کلنی (به‌حالت خوشه‌ای) نیز دارند، سلول‌های گروه کنترل تغییر پیدا نکرده و به‌تدریج از تعداد آن‌ها کم شده و سلول‌ها می‌میرند (شکل ۲- B).

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی با DTZ: این رنگ، روی را شناسایی می‌کند و از آنجا که این عنصر برای بسته‌بندی انسولین ضروری است، می‌تواند به‌طور اختصاصی سلول‌های بتا را که دارای محتوای انسولین بالایی هستند، رنگ کرده و آن‌ها را به رنگ قرمز آجری در آورد.[11] با رنگ‌آمیزی سلول‌ها در روز ۲۱ یعنی بعد از مرحله تمایز، می‌توان سلول‌ها را به‌صورت توده‌های آجری‌رنگ در زیر میکروسکوپ معکوس مشاهده کرد. شکل ۲ تغییرات مورفولوژیکی و رنگ‌پذیری سلول‌های گروه تیمار و کنترل را نشان می‌دهد.

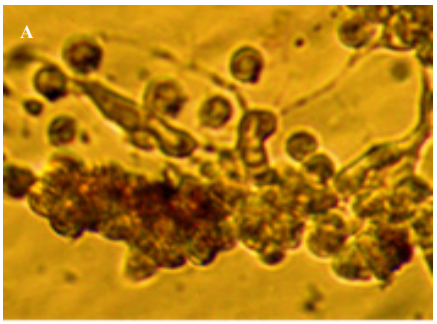
میزان سنتز و ترشح انسولین: غلظت انسولین در مایع رویی سلول‌ها بعد از مراحل تمایززدایی و تمایز یعنی در روز شش و ۲۱ و نیز غلظت انسولین درون سلولی در روز ۲۱ پس از سونیکیت، با کیت RIA (Millipore Co., USA) اندازه‌گیری شد. غلظت انسولین مترشحه در گروه تیمار در روز ۲۱ اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) با روز شش دارد، یعنی در طی ۱۵ روز مرحله تمایزیابی، سلول‌ها انسولین تولید کرده‌اند. حال آن‌که در مورد گروه کنترل این‌گونه نبوده و تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۵) در میزان انسولین مایع رویی در روز شش و ۲۱

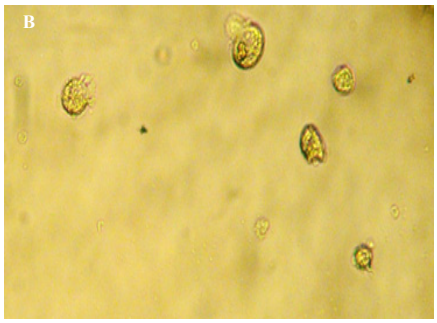






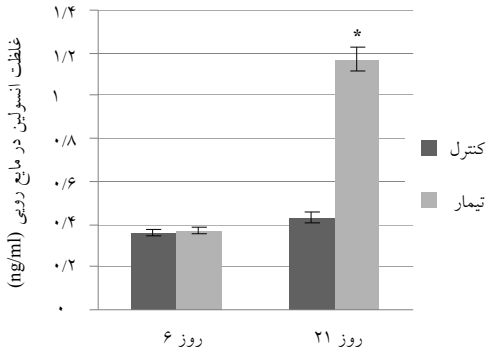
شکل-۱: تغییرات مورفولوژی سلول‌ها با میکروسکوپ معکوس با بزرگ‌نمایی ۲۰۰× (بدون رنگ‌آمیزی)، A: مونوسیت‌های خون محیطی رت، B: سلول‌های حاصل از تمایززدایی در روز شش، C: سلول‌های تمایزیافته بعد از ۲۱ روز





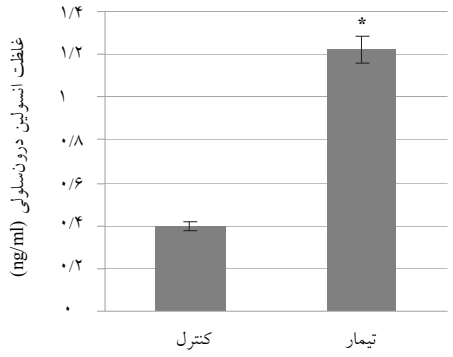
شکل-۲: مورفولوژی و رنگ‌پذیری سلول‌های تیمار و کنترل به‌وسیله میکروسکوپ معکوس با بزرگ‌نمایی ۲۰۰× و با رنگ‌آمیزی DTZ. A: گروه تیمار که گرانول‌های انسولین به رنگ آجری در آمده‌اند، B: سلول‌های گروه کنترل تغییر نکرده‌اند و به‌تدریج از تعداد آن‌ها کم می‌شود.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-08]



نمودار-۱: غلظت انسولین در مایع رویی سلول‌ها بر حسب ng/ml

* اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) می‌باشد.



نمودار-۲: غلظت انسولین درون‌سلولی بر حسب ng/ml

* اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) می‌باشد.

مشاهده نمی‌شود (نمودار ۱) و غلظت انسولین درون سلولی در روز ۲۱ در گروه تیمار اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) با گروه کنترل دارد (نمودار ۲).

بحث

جایگزینی سلول‌های صدمه‌دیده با سلول‌های دارای عملکرد، امکان برگشت عملکرد طبیعی بافت‌ها یا اندام‌ها را به آن‌ها می‌دهد، این اصل بنیادی روش کلی درمان جایگزینی سلول یا طب ترمیمی است. انواع سلول‌های بنیادی یعنی سلول‌های بنیادی بزرگ‌سال و سلول‌های بنیادی جنینی به‌دلیل ظرفیت‌شان در خودنوزایی و پرتوانی، ابزار قدرتمندی برای آینده طب ترمیمی هستند.[۳] مطالعات در مدل‌های حیوانی نشان داده است که پیوند مشتقات سلول‌های بنیادی می‌تواند خیلی از بیماری‌های مزمن از جمله دیابت، پارکینسون، ضایعات نخاعی و غیره را به‌طور موفقیت‌آمیزی درمان کند.[۱۲] اما در رابطه با انسان، برای دست‌یابی به ترمیم ثابت و طولانی‌مدت و موثر بافت‌های صدمه‌دیده با استفاده از سلول‌های بنیادی بزرگ‌سال و جنینی انسانی باید مواردی را در نظر گرفت از جمله: ۱- رده‌های موجود سلول‌های بنیادی جنینی انسانی مناسب برای کاربرد نیستند چون اکثریت این رده‌ها روی لایه‌های مغذی حیوانی به‌دست آمده‌اند. ۲- تعیین یک سری از شاخص‌های مولکولی که بتوان نوع سلول‌های بنیادی بزرگ‌سال و جنینی انسانی را به‌طور مناسب تشخیص داد. ۳- ثبات کاریوتیپی رده‌های هر دو نوع سلول‌های بنیادی طی تکثیر آزمایشگاهی، نیاز به ارزیابی دقیق دارد. ۴- برای پیوند و ترمیم بافتی نیاز به کشت‌های حجیم از سلول‌های بنیادی تمایز نیافته برای تولید سلول‌های اختصاصی برای پیوند ضروری هستند. ۵- مسایل سیاسی، مذهبی، اخلاقی حل‌نشده در زمینه تولید و استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی. این موارد و نیز موانع دیگر منحصر به سلول‌های بنیادی جنینی که تشکیل تراتوم و رد پیوند می‌باشد، مشکلاتی هستند که قبل از درمان دیابت با سلول‌های بنیادی بزرگ‌سال و جنینی باید در نظر گرفته شوند.[۳] بنابراین، یافتن یک منبع جدید با کارآیی بهتر نسبت به سلول‌هایی که در حال حاضر جهت سلول درمانی به‌کار می‌روند، از اهمیت بالایی برخوردار است.

Ruhnke نشان داد که مونوسیت‌های خون محیطی انسان می‌توانند تحت تاثیر سایتوکین‌های MCSF و IL-3 تمایززدایی شوند و در یک دوره ۱۵ روزه در حضور Hepatocyte Growth Factor (HGF), Epidermal Growth Factor (EGF), Nicotinamide به سلول‌های شبه جزایر پانکراتیک تمایز پیدا کنند.[۷] Pufe نیز نشان داد که مونوسیت‌های خون محیطی موش بعد از یک مرحله تمایززدایی توانایی دوباره برنامه‌ریزی شدن و تمایز را دارند و توانستند مونوسیت را به کندروسیت‌های تولیدکننده کلاژن تیپ دو تمایز دهند.[۸] در تحقیق حاضر، ظرفیت تمایزی مونوسیت‌های خون محیطی رت به سلول‌های انسولین‌ساز بررسی گردید. مونوسیت‌های خون محیطی رت پس از جداسازی، تحت تاثیر MCSF، IL-3 و بتا مرکاپتواتانول در

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-08]

شش روز تمایززدایی شده و به سلول‌های قابل برنامه‌ریزی با منشای مونوسیت تبدیل شدند. بررسی با میکروسکوپ معکوس نشان داد که این سلول‌ها از لحاظ اندازه بزرگ‌تر از مونوسیت بوده (شکل ۱) و توانایی تقسیم دارند. پس از این مرحله، سلول‌های حاصل از تمایززدایی مونوسیت تحت اثر فاکتورهای رشد HGF، EGF و نیکوتین آمید و گلوکز در حضور مایع رویی کشت فیبروبلاست‌ها در مدت ۱۵ روز به سلول‌های انسولین‌ساز تمایز یافتند، بدین‌ترتیب که تغییرات مورفولوژی سلول‌ها در این مرحله از حالت کروی به شکلی شبیه به سلول‌های بتا بوده است (شکل ۱) و نیز داده‌های به‌دست آمده و نمودارهای رسم شده که تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۵) در میزان انسولین موجود در مایع رویی سلول‌های حاصل از تمایززدایی و سلول‌های تمایزیافته را در گروه تیمار (نمودار ۱) و تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۵) در میزان انسولین درون سلولی بین گروه تیمار و کنترل نشان می‌دهد (نمودار ۲) و هم‌چنین نتایج رنگ‌آمیزی با DTZ (شکل ۲- A) نشان‌دهنده تمایز PCMO به سلول‌های ترشح‌کننده انسولین می‌باشد. مونوسیت‌ها در پاسخ به درمان ترکیبی MCSF و IL-3، تمایززدایی جزیی پیدا کرده و تقسیم سلولی‌شان را از سر می‌گیرند، این سلول‌های پیش‌ساز با منشای مونوسیت (PCMOs) می‌توانند به سلول‌های جزیره‌ای و هپاتوسیت تبدیل شوند.[۷] مدارک متقاعد کننده‌ای وجود دارد که نشان می‌دهد مونوسیت‌های خون محیطی رت می‌تواند به سلول‌های سازنده انسولین تحت درمان با فاکتورهای رشد خاص تمایز یابند. پیش از این Zhao جمعیت سلولی مشتق از مونوسیت‌های (پرتوان) Pluripotent را گزارش کرده بود، البته با توجه به فعالیت تکثیری و مورفولوژی این سلول‌ها گفته می‌شود با PCMOs فرق دارند.[۱۳] مکانیسم دقیقی که به‌وسیله آن PCMOs ایجاد می‌شود هنوز نامشخص است ولی واضح است که ترکیب M-CSF، IL-3 در این فرآیند نقش دارد.[۷]

ما در مرحله تمایز، از فاکتورهای رشد HGF و EGF، گلوکز، نیکوتین آمید و مایع رویی کشت فیبروبلاست‌ها جهت القای تمایز در PCMOs استفاده کردیم. در بسیاری از تحقیقات انجام شده تاکنون، اثبات شده است که غلظت بالای گلوکز (۲۰-۳۰mmol/ml) یک القاکننده قوی در جهت تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های مولد انسولین بوده و سبب برنامه‌ریزی مجدد سلول‌ها به‌سمت سلول‌های بتا می‌گردد.[۱۴] در این مطالعه استفاده از گلوکز در جهت تغذیه سلول‌ها بوده و علاوه بر این تیمار سلول‌ها با گلوکز، قبل از اندازه‌گیری غلظت انسولین ترشح‌شده از سلول‌ها، باعث افزایش غلظت انسولین در مایع رویی سلول‌ها می‌شود. چرا که ترشح انسولین یک رفتار وابسته به گلوکز است.[۷] نیکوتین آمید نیز شکلی از ویتامین B3 است که فعالیت آنتی‌دیابتوژنیک آن به‌خوبی شناخته شده و در بسیاری از مدل‌های حیوانی در دیابت نوع یک دیده شده است.[۱۵] این ماده علاوه بر تمایز و افزایش توده سلولی در جزایر لانگرهانس، باعث افزایش حساسیت سلول‌ها به گلوکز و جلوگیری از آپوپتوز سلول‌های تمایزیافته می‌شود.[۱۶و۱۷] مایع رویی کشت فیبروبلاست‌ها دارای فاکتورهای رشد فیبروبلاستی (FGFs) است که این فاکتورها و گیرنده‌هایشان در عملکرد سلول‌های بتا و تکوین پانکراس نقش دارند.[۳] Jianjie نشان داد که افزودن اکتیوین A به‌همراه مایع رویی کشت فیبروبلاست‌ها که باعث توسعه اندودرم پانکراسی از مولکول‌های تولیدشده به‌وسیله نوتوکورد در طول تکوین پانکراس پشتی جنینی می‌گردد، به‌همراه EGF، باعث رشد و تمایز سلول‌های اپیتلیالی پانکراس از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی، بدون نیاز به لایه تغذیه‌کننده حیوانی می‌شوند.[۱۸] در مرحله جنینی، نوتوکورد با ترشح اکتیوین B و FGF2 (از خانواده FGFs) باعث فعال شدن ژن Pdx1 می‌شود. Pdx1 یک فاکتور کلیدی در تکوین پانکراس محسوب می‌شود، این فاکتور برای تنظیم بیان ژن‌های تولیدکننده انسولین و تمایز خود پانکراس ضروری است.[۳] پس با توجه به آن‌چه گفته شد، می‌توان به این نتیجه رسید که سلول‌های حاصل از تمایززدایی مونوسیت‌های خون محیطی رت توانایی تمایز به سلول‌های سازنده انسولین، در شرایط آزمایشگاهی و در حضور HGF و EGF، نیکوتین آمید و مایع رویی کشت فیبروبلاست‌ها دارند که این می‌تواند روش جدیدی برای سلول درمانی دیابت باشد، به امید آن‌که روزی بتوانیم از مونوسیت‌های خون خود فرد دیابتی که به سهولت و فراوانی در دسترس است، در جهت درمان کامل وی استفاده کنیم.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل (بخشی از) پایان‌نامه تحت عنوان "اثر مایع رویی کشت فیبروبلاست‌ها بر تمایز مونوسیت‌های خون محیطی رت به سلول‌های تولیدکننده انسولین در شرایط آزمایشگاهی" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۰ و کد ۲۰۰۸-۲ می‌باشد که با حمایت دانشکده علوم و پژوهشکده زیست فن‌آوری دانشگاه ارومیه اجرا شده است.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-08]

References

1. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 2000;287(5457):1427-30.
2. Parivar K. Stem cells biology. In: Parivar K. Embryology. 8th ed. Tehran: Mobtakeran Publications; 2008. p. 306-20.
3. Khodadadi L, Jafari H, Farrokhi A, Pirouz M, Baharvand H. Production insulin producing cell and diabetes treatment. In: Baharvand H. Differentiation and Application of Stem Cells. Tehran: Biology Home Publications; 1387. p. 163-89.
4. Tierney LM, McPhee SJ, Papadacis MA. Current medical diagnosis and treatment international edition. New York: Lange Medical Books, McGraw-Hill; 2002. p. 1203-15.
5. Vaca P, Martín F, Vegara-Meseguer JM, Rovira JM, Berná G, Soria B. Induction of differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells by fetal soluble factors. *Stem Cells* 2006;24(2):258-65
6. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 2009;325(5940):612-6.
7. Ruhnke M, Ungefroren H, Nussler A, Martin F, Brulport M, Schormann W, et al. Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology* 2005;128(7):1774-86.
8. Pufe T, Petersen W, Fändrich F, Varoga D, Wruck CJ, Mentlein R, et al. Programmable cells of monocytic origin (PCMO): a source of peripheral blood stem cells that generate collagen type II-producing chondrocytes. *J Orthop Res* 2008;26(3):304-13.
9. Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol* 1997;151(2):317-22.
10. Mazzucchelli R, Amadio M, Curreli S, Denaro F, Bemis K, Reid W, et al. Establishment of an ex vivo model of monocytes-derived macrophages differentiated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from HIV-1 transgenic rats. *Mol Immunol* 2004;41(10):979-84.
11. Neshati Z, Matin MM, Bahrami AR, Moghimi A. Differentiation of mesenchymal stem cells to insulin-producing cells and their impact on type 1 diabetic rats. *J Physiol Biochem* 2010;66(2):181-7.
12. Stock PG, Bluestone JA. Beta-cell replacement for type I diabetes. *Annu Rev Med* 2004;55:133-56.
13. Zhao Y, Glesne D, Huberman E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(5):2426-31.
14. Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, Xia CQ, Litherland SA, Atkinson MA, et al. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes* 2004;53(7):1721-32.
15. Roche E, Jones J, Arribas MI, Leon-Quinto T, Soria B. Role of small bioorganic molecules in stem cell differentiation to insulin-producing cells. *Bioorg Med Chem* 2006;14(19):6466-74.
16. Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol* 2004;10(20):3016-20.
17. Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;341(4):1135-40.
18. Jiang J, Au M, Lu K, Eshpeter A, Korbutt G, Fisk G, et al. Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2007;25(8):1940-53.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-08]

Tehran University Medical Journal; Vol. 69, No. 11, February 2012: 695-702

Effects of fibroblasts conditioned media on differentiation of programmable cells of monocytic origin to insulin-producing cells

Havva Chapari M.Sc.[1*]
Farah Farokhi Ph.D.[1]
Nowruz Delirezh Ph.D.[2]
Shahram Javadi Ph.D.[3]
Fatemeh Tanhaye Kalate Sabz M.Sc.[1]

1- Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran.
2- Department of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
3- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Received: April 23, 2011 Accepted: May 25, 2011

Abstract

Background: The characteristic of stem cells in self renewal and differentiation to different types of cells has stimulated the interests for using stem cells as a starting material for generating insulin secreting cells. We've evaluated the differentiation potential of Programmable cells of monocytic origin (PCMOs) into insulin producing cells effected from the growth factors and fibroblasts conditioned media (FCM).

Methods: Peripheral blood monocytes of rat were cultured for 6 days in RPMI with 15% FBS, β- mercaptoethanol, MCSF and interleukin-3. Then, these cells were incubated in differentiation media with HGF, EGF, Nicotinamide, 15% fibroblasts conditioned media and glucose for 15days. Morphological differences of cells were studied by invert microscope. In several stages, the amounts of insulin in supernatant of cells were measured by radioimmunoassay kit. Also productions of insulin from differentiated cells were studied with DTZ special staining.

Results: In response to MCSF and IL-3, monocytes dedifferentiated. These programmable cells of monocytic origin (PCMOs) were capable of differentiating into insulin producing cells in differentiation media. The morphology of differentiated cells was similar to Beta cells and the amount of insulin in supernatant of differentiated cells was much higher than PCMOs ($P<0.05$).

Conclusion: HGF, EGF, Nicotinamide and fibroblasts conditioned media are differentiation factors of PCMOs into insulin producing cells. According to the results insulin producing cells can be differentiated from programmable cells of monocytic origin in presence of fibroblasts conditioned media.

Keywords: FCM, Iinsulin-producing cells, PCMOs.

* Corresponding author: Dept. of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran. Postal Code: 5715915199
Tel: +98-914-4030280
E-mail: havva.ch@gmail.com

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-08]