

## تمایز مونوسیت‌های خون محیطی رت به سلول‌های سازنده انسولین تحت تاثیر عصاره پانکراسی رت در شرایط آزمایشگاهی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۱/۳۱

### چکیده

**زمینه و هدف:** سلول درمانی یکی از روش‌های درمانی امیدوارکننده برای دیابت نوع ۱ می‌باشد، مونوسیت خون محیطی دارای قابلیت تمایززدایی و دسترسی آسان در مقایسه با سلول‌های بنیادی می‌باشد، هدف از مطالعه حاضر بررسی امکان تمایز مونوسیت‌های خون محیطی رت به سلول‌های سازنده انسولین تحت تاثیر عصاره پانکراسی (دو روز بعد از ۶۰٪ پانکراتومی) می‌باشد. **روش بررسی:** مونوسیت‌ها از خون محیطی رت جدا شده و کشت می‌شوند. مونوسیت‌ها به مدت شش روز در محیط کشت تمایززدایی در حضور M-CSF و IL-3 و بتا مرکاپتوانول کشت داده شدند. سلول‌ها تمایززدایی شده و به سلول‌های قابل برنامه‌ریزی (PCMOs) تبدیل شدند. سلول‌های تمایززدایی شده زیر میکروسکوپ معکوس بررسی شدند. کشت سلول‌های حاصل از تمایززدایی (PCMOs) به مدت ۱۵ روز در محیط کشت RPMI حاوی عصاره پانکراسی، گلوکز و ۱۰٪ FBS ادامه پیدا می‌نمود و هر سه روز محیط کشت تعویض می‌شد. غلظت انسولین و پپتید- C ترشح شده مورد سنجش رادیوایمونواسی قرار گرفت. تولید انسولین این سلول‌ها با رنگ دیتیزون (DTZ) که به‌طور اختصاصی انسولین را رنگ می‌کند مورد بررسی قرار گرفت. **یافته‌ها:** سلول‌هایی که در محیط حاوی عصاره پانکراسی کشت شدند به‌طور معنی‌داری قادر به تولید و ترشح انسولین و پپتید- C بودند ( $P < 0.05$ ). رنگ‌آمیزی اختصاصی با دیتیزون (DTZ) نیز تولید انسولین توسط این سلول‌ها را تایید کرد. **نتیجه‌گیری:** براساس نتایج به‌دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که مونوسیت‌های خون محیطی رت تحت درمان عصاره پانکراسی توانایی تمایز به سلول‌های سازنده انسولین را دارند که می‌تواند گامی در جهت سلول درمانی دیابت باشد.

**کلمات کلیدی:** مونوسیت خون محیطی، عصاره پانکراسی رت، سلول‌های سازنده انسولین.

فاطمه تنهای کلاته سبز\*

فرح فرخی<sup>۲</sup>، نوروز دلیرز<sup>۳</sup>،  
شهرام جوادی<sup>۴</sup>، حوا چاپاری<sup>۱</sup>

۱- گروه بافت شناسی، جنین شناسی، گروه زیست شناسی  
۲- گروه زیست شناسی

دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۳- گروه ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۴- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

\* نویسنده مسئول: دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تلفن: ۰۹۱۵۱۲۰۵۸۴۷  
email: fateme.1694@yahoo.com

### مقدمه

پانکراس ناشی می‌شود.<sup>۱-۳</sup> درمان متداول دیابت نوع ۱ بر تزریق روزانه انسولین تکیه دارد. هم‌چنین جایگزینی سلول‌های بتای پانکراسی از اهداف درمانی چندین دهه برای کاهش میزان مرگ و میر و پیشرفت دیابت نوع ۱ بوده است. پیوند سلول‌های بتای مولد انسولین به شکل پانکراس کامل یا جزایر لانگرهانس جدا شده، گزینه درمانی امیدوارکننده‌ای برای درمان این بیماری است.<sup>۴</sup> این موضوع به سبب کمبود نسبی اهدای پانکراس، محدودیت در تخلیص جزایر از جسد به مقدار کافی و نیز مسایل مربوط به پیوند نظیر خطر انتقال عفونت یا پس زدن پیوند همواره مشکل بوده است.<sup>۵</sup> از این رو منابع جدید برای درمان جایگزینی سلول  $\beta$  نظیر استفاده از سلول‌های بنیادی و ژن یا سلول درمانی، علاوه بر موارد ذکر شده مورد بررسی

دیابت قندی (Diabetes Mellitus (DM یک اختلال متابولیکی شایع است، که ۵-۲ درصد جمعیت بزرگسال در کشورهای توسعه یافته به آن مبتلا هستند. بر اساس ارقام جهانی به‌دست آمده ۱۳۰ میلیون نفر در سال ۲۰۰۰ به این بیماری مبتلا بودند و این رقم تا سال ۲۰۲۵ به ۳۰۰ میلیون نفر می‌رسد. دیابت ملیتوس به‌طور گسترده به دو نوع اصلی تقسیم می‌شود. دیابت نوع ۱ (دیابت وابسته به انسولین) اختلالی است که با تخریب خود ایمن سلول‌های مولد انسولین در پانکراس مشخص می‌شود. دیابت نوع ۲ (دیابت غیر وابسته به انسولین) تحت تاثیر عواملی هم‌چون مقاومت بافت‌های محیطی به اثرات انسولین تا عملکرد ناصحیح سلول‌های بتای

هورمون‌ها و فاکتورهای رشد جهت تمایز است. در این تحقیق نشان دادیم مونوسیت‌های خون محیطی رت تحت تاثیر عصاره پانکراسی توانایی تمایز به سلول‌های سازنده انسولین را دارا هستند.

## روش بررسی

این مطالعه به صورت تجربی- پژوهشی در پژوهشکده زیست فن‌آوری دانشگاه ارومیه به صورت آزمایشگاهی (In vitro) از بهمن سال ۱۳۸۸ تا بهمن ۱۳۸۹ صورت گرفت. از رت‌های نژاد ویستار هشت هفته‌ای با متوسط وزن ۱۵۰ گرم استفاده گردید. این رت‌ها از حیوان خانه دانشکده علوم دانشگاه ارومیه تهیه شدند. در تمامی مراحل از محیط کشت RPMI-1640 (Sigma) که به آن ۲mM، L-گلوتامین (Sigma)، ۱۰۰U/ml پنی‌سیلین (Sigma)، ۱۰۰µg/ml استرپتومایسین (Sigma) و ۱۰٪ FBS (Gibco) اضافه شده بود، استفاده گردید. در این مطالعه از سایتوکین‌ها و فاکتورهای رشد (Rat M-CSF (ProSci Incorporated) Rat IL-3 beta (ProSci) استفاده گردید.

تهیه سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC): به منظور به دست آوردن سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی، ابتدا رت‌های مورد نظر با ماده بیهوشی کلروفورم بیهوش شدند، قلب رت‌ها خون‌گیری شده و هپارینه شد. از هر رت ۵-۶mm خون گرفته شد. مقدار ۵ml خون هپارینه (۲۰۰U/ml) با ۵ml PBS رقیق گردید، محلول خون و PBS به آرامی بر روی هیستوپیک (Sigma) که حجم آن برابر خون رقیق نشده بود قرار گرفت. مجموعه خون رقیق شده و هیستوپیک با سرعت  $400 \times g$  به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی که در حد فاصل هیستوپیک و خون رقیق شده قرار داشت جمع شده در مرحله بعد به منظور حذف هیستوپیک از PBMC با سرعت  $250 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سلول‌های حاصل مجدداً به منظور حذف پلاکت‌های همراه آن با سرعت  $250 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. تعداد و میزان زنده بودن سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی به دست آمده با استفاده از رنگ تریپان بلو (Loba chemie) و هموسایتومتر تعیین گردید. سلول‌های تک هسته‌ای در پلیت شش خانه‌ای در محیط حاوی RPMI (۱۶۴۰) ریخته و به منظور جداسازی مونوسیت‌ها از PBMC به مدت دو ساعت در دمای  $37^\circ C$ ، ۵٪  $CO_2$  و ۹۰٪ رطوبت

قرار گرفته‌اند. استفاده از سلول‌های بنیادی که دارای قدرت تکثیر و تمایز به سلول‌های انسولین ساز هستند، شاید بتواند نقص عملکرد سلول‌های بتا را به طور کامل و همیشگی جبران نماید.<sup>۶</sup> سلول‌های بنیادی، سلول‌های تمایز نیافته هستند که قدرت تکثیر نامحدودی داشته و می‌توانند تحت تاثیر شرایط فیزیولوژیک خاص و یا در حضور فاکتورهای ویژه، القا شده و به انواع سلول‌های تخصص یافته تمایز یابند.<sup>۷</sup> سلول‌های بنیادی بر اساس منشأ به دو گروه اصلی سلول‌های بنیادی جنینی و بالغ طبقه‌بندی می‌شوند. سلول‌های بنیادی جنینی یکی از منابع سلولی برای ایجاد سلول‌های مولد انسولین می‌باشند. اما دارای یک سری موانع مانند تولید پایین انسولین، میزان بالای آپوپتوز و مشکلات اخلاقی که استفاده از این سلول‌ها را محدود کرده است.<sup>۸</sup> سلول‌های بنیادی بالغ یکی از منابعی که برای سلول درمانی مورد مطالعه قرار گرفته است، که در برخی از بافت‌های بالغ از جمله پوست، سلول‌های خونی، اپیتلیوم روده، بافت کبد و غیره یافت می‌شوند.<sup>۹</sup> جمعیت سلول‌های بنیادی بزرگسال پرتوان (Pluripotent) و چند توان (Multipotent) توانایی تمایز به سه لایه جنینی را دارند، از جهتی استفاده از این سلول‌ها به خاطر میزان اندک آن‌ها، کمبود مارکر خاص و تکثیر سخت در محیط کشت، به دوره‌های طولانی جهت تهیه سلول‌های کافی برای کاربرد کلینیکی نیاز دارد. هم‌چنین سلول‌های بنیادی خاص بافت‌ها ظرفیت محدودی برای تمایز دارند.<sup>۱۱</sup> نحوه استخراج این سلول‌ها هم مشکلات فراوانی به همراه دارد، در بسیاری از مطالعات آزمایشگاهی (In vitro) سلول‌های بنیادی تحت تیمار از بیماران دیابتی دریافت نشده و پیوند آن‌ها به طور اجتناب ناپذیری رد می‌شود.<sup>۱۴</sup> مونوسیت‌ها سلول‌های تک هسته‌ای موجود در خون می‌باشند که توانایی تمایز به ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک را دارند.<sup>۱۱</sup> این سلول‌ها اگر در شرایط تمایززدایی قرار گیرند به سلول‌های قابل برنامه‌ریزی تبدیل می‌شوند که در شرایط مناسب در حضور فاکتورهای رشد به سلول‌های تولید کننده انسولین و سلول‌های کبد<sup>۱۰</sup> و کندروسیت<sup>۱۷</sup> تبدیل می‌شوند. در مطالعات پیشین سلول‌های بنیادی (سلول‌های مزانشیم رت) تحت تاثیر عصاره پانکراسی در حال بازسازی به سلول‌های پانکراتیک تبدیل شدند. هدف ما در این تحقیق القاء تولید سلول‌های سازنده انسولین از مونوسیت‌های خون محیطی رت در حضور عصاره پانکراسی حاصل از ترمیم بعد از ۴۸ ساعت است، این عصاره دارای

رنگ‌آمیزی اختصاصی با دیتیزون (DTZ): رنگ‌آمیزی دیتیزون روشی است که به طور اختصاصی سلول‌های تولید کننده انسولین را شناسایی می‌کند.<sup>۱۴-۱۲</sup> رنگ (Merck, Germany) DTZ، روی را شناسایی می‌کند و این عنصر برای بسته‌بندی انسولین ضروری است و می‌تواند سلول‌های  $\beta$  که دارای محتوای انسولین بالایی هستند را به رنگ قرمز در آورد. بدین منظور ابتدا ۱۰ mg از پودر دیتیزون در یک میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) حل گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای  $15^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شد. پس از این مدت به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت موجود در هر خانه از پلیت شش خانه‌ای، ۱۰  $\mu\text{l}$  از این رنگ اضافه شد. در مرحله بعد این سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور قرار داده شدند. پس از طی این مدت محیط کشت خانه‌ها خارج شد و سلول‌ها به آرامی سه مرتبه با PBS شسته شدند، در مرحله آخر نیز به هر خانه ۲ ml محیط کشت اضافه گردید و سلول‌ها در زیر میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفته و از آن‌ها عکس برداری به عمل آمد. دیتیزون گرانول‌های انسولین را به‌طور اختصاصی رنگ می‌کند.<sup>۲۱</sup>

رادویایمونواسی: برای سنجش میزان انسولین و پپتید- c، حدود ۱ ml مایع رویی (Supernatant) سلول‌های تیمار و شاهد در روزهای ۶، ۱۴، ۲۱ بعد از ۶۰ دقیقه در حضور ۲۰ mmol/L گلوکز جمع‌آوری شد و با کیت RIA (MILLIPORE) طبق دستورالعمل کیت مورد سنجش قرار گرفت و توسط دستگاه Gamma counter (PerkinElmer life sciences) میزان انسولین و پپتید- c رادیواکتیو به اندازه‌گیری شد. تمامی مراحل آزمایش سه بار تکرار شد و داده‌ها به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SD}$  بیان شدند. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) One-Way Analysis of Variance، نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۶ و Tukey's test (آزمون اختلاف حقیقی که به‌طور مخفف HSD نامیده می‌شود) استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها مقدار ( $P < 0/05$ ) معنی‌دار در نظر گرفته شد، هم‌چنین ترسیم نمودارها در نرم‌افزار Microsoft Excel (۲۰۰۷) انجام گرفت.

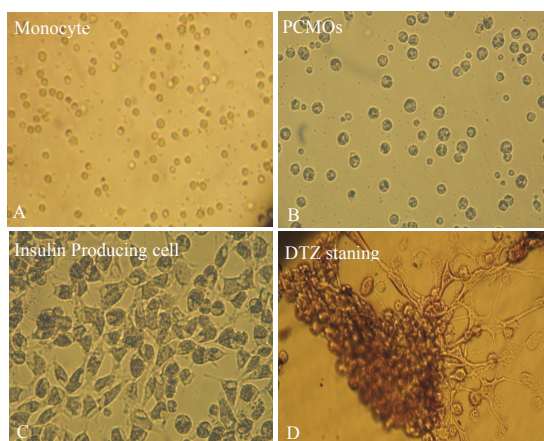
## یافته‌ها

بررسی تغییرات مورفولوژیکی: در این تحقیق به منظور تمایز زدایی مونوسیت‌های خون محیطی رت از سایتوکین‌های MCSF، IL-3 و از  $\beta$  مرکاپتواتانول استفاده گردید. این سلول‌ها در زیر میکروسکوپ

انکوبه شد و مونوسیت‌ها به خاطر چسبندگی به کف پلیت چسبیده و بقیه سلول‌ها از محیط حذف شدند.<sup>۲۰</sup> تهیه عصاره پانکراسی: از رت‌های نژاد ویستار هشت هفته‌ای استفاده شد، رت‌هایی که به مدت یک شبانه روز غذا دریافت نکرده بودند، با تزریق داخل صفاقی (IP) داروهای بیهوشی کتامین HCL- (ketamine-HCL (۵۰ mg/ml Alfasan Holland و سدیم پنتوباریتال Sodium pentobarbital (۵۰ mg/ml Lundbeck USA) بیهوش شده طی عمل جراحی تقریباً تمام بخشطحالی پانکراس برداشته شد (۶۰٪) و بخش مزانتریک سالم نگه داشته شد. بعد از ۴۸ ساعت رت قطع نخاعی شده، فوراً تشریح و پانکراس ترمیمی جمع‌آوری شد، بافت مورد نظر وزن شده و سریعاً در فسفات بافر سالین (PBS) خنک همراه با پروتئاز مهار کننده (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  $4^{\circ}\text{C}$  و مرحله دوم ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه. در پایان مایع رویی شفاف که همان عصاره مورد نظر است جمع‌آوری شد، برای سنجش غلظت پروتئین عصاره از روش برادفورد استفاده شده و غلظت پروتئین عصاره اندازه‌گیری می‌شود. عصاره تهیه شده در یخچال  $8^{\circ}\text{C}$  - برای استفاده‌های بعدی قرار داده می‌شود.<sup>۱۹</sup>

قرار دادن مونوسیت‌ها در معرض مواد القاء کننده تمایز زدایی: به منظور تمایز زدایی مونوسیت‌ها،  $6 \times 10^5$  سلول در هر چاهک از پلیت شش خانه‌ای قرار گرفت مونوسیت‌های چسبیده به کف فلاسک در محیط RPMI حاوی ۱۰٪ FCS، MCSF (۵ ng/ml)، IL-3 (۰/۴ ng/ml) و  $140 \mu\text{mol/L}$   $\beta$ -mercaptoetanol به مدت شش روز قرار گرفت. بعد از این شش روز مونوسیت‌ها تحت تاثیر این مواد به یک سری سلول‌های قابل برنامه‌ریزی با منشأ مونوسیت (PCMOs) تبدیل شدند.<sup>۱۷-۱۰</sup>

قرار دادن سلول‌ها (PCMOs) در معرض مواد القاء کننده تمایز PCMOs: به منظور تمایز به سمت سلول‌های سازنده انسولین به مدت ۱۵ روز در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ FCS در حضور عصاره پانکراسی با غلظت  $200 \mu\text{g/ml}$  و  $5 \text{mmol/L}$  گلوکز قرار گرفتند محیط کشت هر سه روز یک بار با محیط کشت حاوی مواد تمایزی تعویض می‌شد.

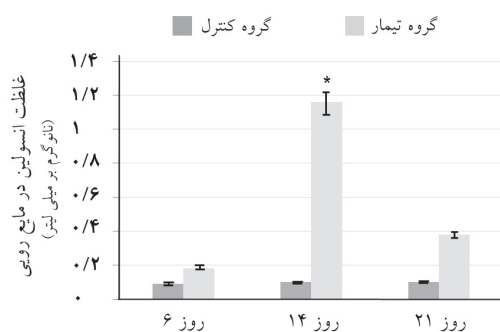


شکل- ۱: تغییرات مورفولوژیک و نتایج حاصل از رنگ آمیزی. A: مونوسیت‌های خون محیطی رت. B: تغییرات مورفولوژیک بعد از شش روز از تمایزدایی. C: سلول‌های تمایز یافته بعد از ۲۱ روز. D: اجتماع سلولی رنگ پذیرفته با DTZ

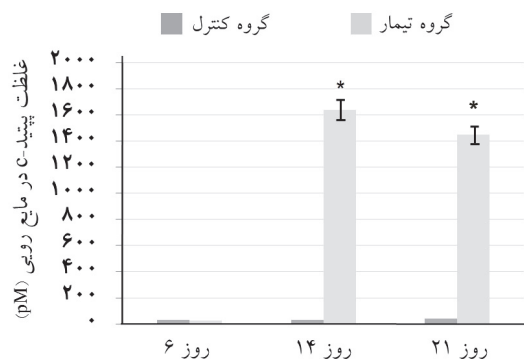
با DTZ رنگ آمیزی شدند و توسط میکروسکوپ معکوس مشاهده شدند، سلول‌های حاوی انسولین به صورت اجتماعات سلولی، قرمز رنگ شدند شکل (۱D).

بررسی میزان ترشح انسولین: مهم‌ترین ویژگی سلول‌های بتا در بدن تولید انسولین در پاسخ به گلوکز خون می‌باشد، مقدار انسولین تولید شده به وسیله سلول‌های تمایز یافته بعد از روزهای ۶، ۱۴، ۲۱ مورد سنجش رادیوایمونواسی قرار گرفت و توسط دستگاه شمارش گر گاما خوانده شد، هم‌چنین این عمل در مورد گروه کنترل نیز انجام شد. بر اساس نتایج به دست آمده، میزان انسولین موجود در محیط کشت، در روز ۱۴ نسبت به روز شش و ۲۱ دوره تمایزی، تفاوت معنی‌داری داشت ( $P < 0.05$ ). میزان ترشح انسولین در روزهای شش، ۱۴ و ۲۱ به ترتیب ۰/۱، ۱/۱۵ و ۰/۴ ng/ml بود و گروه کنترل در همین دوره ذکر شده ۰/۰۸، ۰/۰۸ و ۰/۰۹ ng/ml را نشان داد (نمودار ۱).

بررسی میزان ترشح پپتید- c: به منظور بررسی ظرفیت تولید و ترشح انسولین میزان پپتید- c ترشح شده در دوره تمایز بعد از روزهای شش، ۱۴ و ۲۱ مورد سنجش رادیوایمونواسی قرار گرفت. بر اساس نتایج از ۲۷pM به ۱۶۰۰pM تغییر نشان داد. میزان پپتید- c در روزهای ۱۴ و ۲۱ تفاوت معنی‌داری در سطح ( $P < 0.05$ ) نسبت به روز شش داشت با توجه به میزان ترشح انسولین و پپتید- c بعد از القاء تمایز، حاکی از آن است که دوره هفت روزه نتایج بهتری را نشان می‌دهد (نمودار ۲).



نمودار- ۱: میزان ترشح انسولین حاصل مایع رویی در روزهای مختلف. \* داده‌ها به صورت Mean±SD ( $P < 0.05$ ) ارائه شد.



نمودار- ۲: میزان ترشح پپتید- c در مایع رویی (pM). ارائه شد. \* داده‌ها به صورت Mean±SD ( $P < 0.05$ ) ارائه شد. بر اساس نتایج نمودار میزان پپتید- c در مایع رویی نشان‌دهنده تولید انسولین و آزادسازی پپتید- c می‌باشد.

معکوس بررسی شدند. مونوسیت‌های رت ظاهری کروی و کوچک دارند بعد از شش روز از القاء تمایزدایی، از لحاظ اندازه و تعداد افزایش پیدا کردند، بعد از دو هفته از القاء تمایز در حضور عصاره پانکراسی به سلول‌های تولید کننده انسولین تبدیل شدند. طی دوره تمایز سلول‌های کروی شکل گرفته و از حالت کروی به شکل سه بعدی کروی تبدیل می‌شوند و تجمع سلولی خوشه انگوری پیدا می‌کنند شکل ۱ تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها را نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از رنگ آمیزی: DTZ رنگی است که به یون روی موجود در مولکول انسولین در سلول متصل می‌شود و آن‌ها را به رنگ قرمز در می‌آورد.<sup>۱۲</sup> بر این اساس دیتیزون می‌تواند به طور اختصاصی سلول‌های بتا را که دارای محتوی انسولین بالایی هستند رنگ کرده و آن‌ها را به رنگ قرمز در آورد. در پایان مرحله تمایز نهایی، سلول‌ها



## بحث

خون محیطی به سلول‌های سازنده انسولین بررسی شد و نتایج به دست آمده نشان داد مونوسیت‌های خون محیطی رت می‌تواند به سلول‌های سازنده انسولین تحت درمان با عصاره پانکراسی تمایز یابد. در این پژوهش علاوه بر ارزیابی مورفولوژیک، میزان انسولین و پپتید-*c* تولید شده در مایع رویی نیز اندازه‌گیری شد. در ارتباط با روند تمایز مونوسیت‌های خون محیط رت به سلول‌های سازنده انسولین، ارزیابی مورفولوژیک به عمل آمده نشان داد سلول‌های حاصل از تمایز به صورت تجمعات سلولی و دارای زواید و سلول‌ها چند بعدی می‌باشد. در ارزیابی به عمل آمده از رنگ‌آمیزی اختصاصی دیتیزون (DTZ) حضور انسولین در تجمعات سلولی مذکور تشخیص داده شد که این نیز ماهیت سلول‌های تمایز یافته را تایید می‌کند. از طرفی دیگر ارزیابی‌های رادیوایمونواسی به‌عمل آمده در روزهای شش، ۱۴ و ۲۱ جهت سنجش میزان انسولین و پپتید-*c* که توانایی تولید انسولین را نشان می‌دهد و از ویژگی‌های اساسی سلول‌های جزایر پانکراتیک می‌باشد تایید دیگری بر تمایز این سلول‌ها می‌باشد. مقالاتی که در زمینه تمایز مونوسیت‌های خون محیطی منتشر شده است معدود است در این زمینه می‌توان به Ruhnke اشاره کرد که روش‌های مورد استفاده در آن‌ها با کارایی بالایی مونوسیت‌ها را به سلول‌های شبه پانکراتیک تمایز داد، این محققان سلول‌های پیش‌ساز مونوسیت را در یک دوره ۱۵ روزه در حضور فاکتورهای رشد HGF، EGF به سلول‌های پانکراتیک تمایز دادند،<sup>۱۱</sup> در صورتی که در مطالعه حاضر از عصاره پانکراسی ترمیمی (دو روز بعد از ۶۰٪ پانکراتومی) به منظور القاء تمایز استفاده شد. هم‌چنین این محققان مونوسیت‌های خون محیطی انسان را مورد بررسی قرار داد و در این مطالعه مونوسیت‌های خون محیطی رت مورد بررسی قرار گرفته‌اند. در واقع تاکنون مقاله‌ای در رابطه با تولید سلول‌های انسولین ساز از مونوسیت‌های خون محیطی رت منتشر نشده است. از میان مقالاتی که از عصاره پانکراسی جهت تمایز استفاده کردند می‌توان به Choi اشاره کرد، آن‌ها نیز از عصاره پانکراسی ترمیمی به عنوان عامل تمایزی استفاده کردند و توانستند سلول‌های مزانشیم رت را به سلول‌های سازنده انسولین تبدیل کنند، Choi غلظت‌های متفاوتی از عصاره پانکراسی را بررسی و غلظت ۲۰۰ μg/ml را غلظت موثر تمایز گزارش کرد،<sup>۱۹</sup> در این مطالعه نیز از غلظت ۲۰۰ μg/ml و هم‌چنین از گلوکز با غلظت (۵mmol/L) استفاده شد. براساس نتایج Choi دو

پیوند سلول‌های بتای مولد انسولین به شکل جزایر و یا پانکراس کامل، گزینه درمانی امیدوارکننده‌ای برای درمان دیابت ملیتوس می‌باشد. در حال حاضر به خاطر کمبود شدید بافت‌های دهنده برای پیوند پانکراس نمی‌توان به طور گسترده از این درمان استفاده کرد.<sup>۱۸</sup> از این رو توجه خاصی به توانایی تمایزی انواع سلول‌های بنیادی و سلول‌های قابل برنامه‌ریزی به سلول‌های سازنده انسولین شده است.<sup>۱۱</sup> مونوسیت‌ها سلول‌های تک هسته‌ای موجود در خون می‌باشند، که توانایی تمایز به ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک را دارند، به خاطر ظرفیت تمایززدایی و هم‌چنین توانایی تکثیر و دسترسی آسان این سلول‌ها نسبت به سلول‌های بنیادی، به طور برجسته برای درمان سلولی اتولوگ در بیماران دیابتی و هپاتوسیتی مورد توجه قرار گرفته است. تمایززدایی این سلول‌ها قبلاً توسط Zhao<sup>۱۳</sup> Pufe<sup>۱۲</sup> و Ruhnke<sup>۱۱</sup> تایید شده. تمایززدایی مونوسیت‌ها بستگی به یک تیمار شش روزه دارد، مونوسیت‌ها در پاسخ به تیمار دو سایتوکین IL-3 و M-CSF، تمایززدایی جزئی شده و تقسیم سلولی شان را از سر می‌گیرند، این سلول‌های قابل برنامه‌ریزی با منشا مونوسیت (PCMO) می‌تواند به سلول‌های جزیره‌ای و هپاتوسیت تبدیل شوند.<sup>۱۷-۱۱</sup> در این مطالعه از عصاره پانکراس ترمیمی و گلوکز به مدت دو هفته به منظور القاء تمایز استفاده شد، بر اساس مطالعات گذشته ثابت شده است که عصاره پانکراسی حاصل ترمیم دارای یک سری هورمون‌ها و فاکتورهای رشد مختلف است که دارای توانایی تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های سازنده انسولین است.<sup>۱۹</sup> Katdare نشان داد که قطع قسمتی از پانکراس در موش‌های دیابتی، سبب ترمیم پانکراس و درمان دیابت می‌گردد. بنابراین می‌توان به این نتیجه رسید که پانکراس قادر به بازسازی جزایر لانگرهانس است و این امر توسط سلول‌های بنیادی موجود در اپیتلیوم مجاری پانکراس، صورت می‌گیرد. زیرا این سلول‌ها می‌توانند تحت تاثیر فاکتورهای مختلف و ترکیبات ماتریکس خارج سلولی به سلول‌های جزیره‌ای تمایز یابند.<sup>۲۲</sup> Vaca نیز در سال ۲۰۰۵ به این نتیجه رسید که با تاثیر محیط کشت سلول‌های پانکراسی جنینی، بر سلول‌های بنیادی می‌توان آن‌ها را به سلول‌های سازنده انسولین تمایز داد،<sup>۲۳</sup> در این تحقیق، تاثیر عصاره پانکراسی رت با غلظت ۲۰۰ ug/ml در تمایز مونوسیت‌های

مونوسیت به سلول‌های انسولین ساز بود که این امر با گزارش‌های قبلی مبنی بر تاثیر عصاره پانکراسی بر تمایز انواع دیگری از سلول‌ها، مطابقت داشت. از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که مونوسیت‌های خون محیطی رت قابلیت تمایز به سلول‌های سازنده انسولین را در حضور عصاره پانکراسی تحت شرایط آزمایشگاهی دارد و می‌تواند گامی در راستای سلول درمانی و تولید سلول‌های سازنده انسولین و درمان دیابت قندی باشد. *سپاسگزاری*: نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از حمایت‌های مالی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه، وزارت علوم، تحقیقات و فن‌آوری و پژوهشکده زیست فن‌آوری دانشگاه ارومیه ابراز می‌دارند.

هفته بعد از القاء تمایز میزان انسولین ترشح شده  $0.6 \text{ ng/ml}$  بود. در تحقیق حاضر بعد از یک هفته تمایز میزان انسولین ترشحي  $1.14 \text{ ng/ml}$  بود. بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت سلول‌های پیش‌ساز با منشا مونوسیت تحت القاء عصاره پانکراسی در مقایسه با سلول‌های مزانشیم توانایی تمایزی بهتری دارد و دوره تمایزی کوتاه‌تری را طی می‌کند. در این تحقیق گلوکز با غلظت ( $5 \text{ mmol/L}$ ) استفاده شد، در تحقیقات پیشین از غلظت‌های بالاتری جهت تمایز استفاده شده است، براین اساس نمی‌توان دلیل دوره کوتاه تمایز را به گلوکز نسبت داد. مجموعه مشاهدات، بیانگر تاثیر مثبت حضور عصاره پانکراسی حاصل ترمیم بر روند تمایز سلول‌های پیش‌ساز

## References

- Berná G, León-Quinto T, Enseñat-Waser R, Montanya E, Martín F, Soria B. Stem cells and diabetes. *Biomed Pharmacother* 2001;55(4):206-12.
- Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001;414(6865):782-7.
- Sipione S, Eshpeter A, Lyon JG, Korbutt GS, Bleackley RC. Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cells. *Diabetologia* 2004;47(3):499-508.
- Blyszczuk P, Wobus AM. Stem cells and pancreatic differentiation in vitro. *J Biotechnol* 2004;113(1-3):3-13.
- Soria B, Skoudy A, Martín F. From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia* 2001;44(4):407-15.
- 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.
- Nir T, Dor Y. How to make pancreatic beta cells: prospects for cell therapy in diabetes. *Curr Opin Biotechnol* 2005;16(5):524-9.
- 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.
- Berná G, León-Quinto T, Enseñat-Waser R, Montanya E, Martín F, Soria B. Stem cells and diabetes. *Biomed Pharmacother* 2001;55(4):206-12.
- 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.
- 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.
- Shiroy A, Yoshikawa M, Yokota H, Fukui H, Ishizaka S, Tatsumi K, et al. Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithione. *Stem Cells* 2002;20(4):284-92.
- 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.
- Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarikiewicz K, Song KH, Sharma A, et al. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(14):7999-8004.
- Latif ZA, Noel J, Alejandro R. A simple method of staining fresh and cultured islets. *Transplantation* 1988;45(4):827-30.
- Chausmer AB. Zinc, insulin and diabetes. *J Am Coll Nutr* 1998;17(2):109-15.
- 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.
- Efrat S. Beta-cell replacement for insulin-dependent diabetes mellitus. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60(2):114-23.
- Choi KS, Shin JS, Lee JJ, Kim YS, Kim SB, Kim CW. In vitro trans-differentiation of rat mesenchymal cells into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330(4):1299-305.
- 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.
- 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.
- Katdare MR, Bhonde RR, Parab PB. Analysis of morphological and functional maturation of neo-islets generated in vitro from pancreatic ductal cells and their suitability for islet banking and transplantation. *J Endocrinol* 2004;182(1):105-12.
- 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.

## In-vitro differentiation of rat peripheral blood monocytes into insulin-producing cells by rat pancreatic extract

Received: April 04, 2011 Accepted: April 20, 2011

### Abstract

Fatemeh Tanhaye Kalate Sabz MSc.<sup>1\*</sup>  
Farah Farokhi PhD.<sup>2</sup>  
Nowroz Delirezeh PhD.<sup>3</sup>  
Shahram Javadi PhD.<sup>4</sup>  
Havva Chapari MSc.<sup>1</sup>

1- Department of Histology and Embryology, Urmia University, URMIA, Iran.

2- Department of Biology, Urmia University, URMIA, Iran.

3 - Department of Immunology, Urmia University, URMIA, Iran.

4 - Department of Clinical Sciences, Urmia University, URMIA, Iran.

**Background:** Cell-therapy provides a promising alternative for the treatment of type 1 diabetes. Monocytes which have a reprogramming or differentiation potential and are more available than any other types of stem cells, have been recognized as candidates for such investigations. The aim of the present study was to evaluate the differentiation potential of rat peripheral blood monocytes into insulin-producing cells by the use of rat pancreatic extract (2 days after a 60% pancreatectomy).

**Methods:** Rat peripheral blood monocytes were isolated and cultured. Adherent monocytes were induced to differentiate into programmable cells in RPMI supplemented by 10% FCS,  $\beta$ -mercaptoethanol, M-CSF and IL-3 for six days. The dedifferentiated cells were analyzed by invert microscopy. Cultures of Programmable Cells of Monocytic Origin (PCMOs) were continued in RPMI, containing 10% FBS, pancreatic extract and 5 mmol/L glucose for 15 days. The medium was replaced every three days. At the end of the protocol, insulin and c-peptide excreted by the differentiated cells were tested by radioimmunoassay on days 6, 14, and 21. In order to verify insulin production in the cells, dithizone-staining, which is a method for insulin identification, was employed.

**Results:** The results showed that the cells cultured in rat pancreatic extract secreted insulin and c-peptide relative to the control group. Dithizone-staining was positive in the aforesaid cells ( $P < 0/05$ ).

**Conclusion:** The results of the current study showed that pancreatic extract treatment can differentiate rat peripheral blood monocytes into insulin-producing cells which can be regarded as a potential source for the treatment of diabetes.

**Keywords:** Insulin-producing beta cells, monocyte, peripheral blood stem cells, pancreatic extract, rat.

\*Corresponding author: Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran, Postal Code: 5715915199  
Tel: +98-915-1205847  
email: fateme.1694@yahoo.com