مجله دیابت و لیپید ایران. پاییز ۱۳۸۵؛ دوره ۶ (شماره ۱)۳۶-۲۷

جداسازی و کشت جزایر لانگرهانس موش صحرایی و ارزیابی میزان حیات آنها

باقر لاریجانی[۱]، سید سجاد محسنی صالحی*[۲،۱]، شیرین ایرانی[۲،۱]، مرجان اکبری کامرانی[۲،۱]، نسیم شیخ بهایی[۲،۱]، احمد سجادی[۲،۱]، سید ناصر استاد[۳]

چکیده

مقدمه: مطالعات متعددی جهت بررسی پیوند پانکراس به عنوان روشی نسبتاً قطعی در درمان دیابت نوع۱ انجام می‌شوند .از آنجاکه میزان حیات جزایر برای پروگنوز پیوند مهم می‌باشد، در مطالعه حاضر مراحل لازم برای تهیه جزایر سلولی جهت پیوند در رت، انجام شده است. هدف از انجام این مطالعه ارزیابی میزان حیات مجموعه جزایر بدست آمده در روزهای مختلف و در نهایت پیشنهاد زمان مناسب جهت پیوند می‌باشد.

روش‌ها: پانکراس رت جدا شده، بعد از Chopping، توسط کلاژنازV برای مدت۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ ^{o}C $37^{\circ}C$ هضم شده و ۳ بار سانتریفوژ شد.

سپس جزایر زیر میکروسکوپ جدا شده و در محیط کشت RPMI1640 در دمای ۳۷$\mathring{C}$ ، برای ۶ روز انکوبه شدند. هر Well حاوی ۴۵-۳۵ جزیره بود. میزان حیات جزایر پانکراس با ارزیابی میزان رنگ پذیری آنها با Acridine Orange / Propiodine Iodide و بررسی زیر میکروسکوپ فلورسنت تعیین گردید که در ساعت‌های ۰ ، ۲۴ ، ۴۸ و روزهای ۳ و ۵ و ۶ انجام پذیرفت.

یافته‌ها: میزان حیات پس از انکوباسیون به تدریج افزایش می‌یابد تا به حداکثر میزان خود در روز دوم می‌رسد. پس از آن میزان حیات سلول‌ها هستیم سیر نزولی را طی می‌کند به‌طوری که در روزهای ۵ و ۶ به شدت کاهش یافته و به حدود صفر می‌رسد.

نتیجه‌گیری: وضعیت حیاتی سلول های جزیره ای پانکراس پس از جداسازی و تخلیص بدنبال کشت در محیط مناسب بهبود می یابند، به‌طوری که این سلول‌ها بهترین آمادگی جهت پیوند را پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون بعد از جداسازی از محیط بدن دارند.

واژگان کلیدی: دیابت ، جزایر لانگرهانس کشت داده شده ، میزان حیات

۱- مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- مرکز پژوهشهای علمی دانشجویان (SSRC)، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- آزمایشگاه کشت سلول، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* ***نشانی***: تهران، خیابان قدس، خیابان پورسینا، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ساختمان اصلی، طبقه سوم، مرکز پژوهش‌های علمی دانشجویان (SSRC)، تلفن:۶۶۴۹۵۹۴۸، دورنگار: ۶۶۴۱۸۵۸۸، پست الکترونیک: sysjsa@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۵/۳/۱۸

تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۱/۱۶

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-23]

مقدمه

دیابت یکی از بیماری‌های شایع غددی است که موجب اختلال در ارگان‌های متعددی از بدن از قبیل چشم، کلیه و اعصاب می گردد. در حال حاضر تعداد مبتلایان به دیابت در جهان برابر ۱۴۳ میلیون نفر است که بنا به آمار موجود، این تعداد در سال ۲۰۲۵ به ۳۵۰ میلیون نفر خواهد رسید [۱]. در ایران این بیماری شیوعی معادل ۵٪ دارد و عوارض ناشی از دیابت نظیر نارسایی کلیوی، نابینایی و قطع اندام تحتانی منجر به ناتوانی‌های جدی در ۱۰ – ۵٪ از بیماران دیابتی می‌شود[۲].

بر اساس گزارش‌های سازمان جهانی بهداشت (WHO)، دیابت در هر کشوری درصد قابل توجهی از هزینه‌های بهداشتی(۳-۲٪)را به خود اختصاص می‌دهد[۳]. هزینه مراقبت از افراد دیابتی در ایالات متحده - با سرانه‌ای معادل ۱۱۰۰۰ دلار در سال - ۱۱/۹٪ از کل بودجه بهداشتی را شامل می‌شود که نیمی از آن جهت کنترل متابولیک و نیمی دیگر جهت درمان عوارض دیابت مصرف می‌شود [۶-۱].

در حال حاضر بهترین راه نیل به کنترل دقیق قند خون، درمان با انسولین است. درمان با انسولین و در این زمینه، پایش مکرر سطح قند خون توسط خود بیمار، و تطبیق مقدار انسولین تزریقی با مقدار و نوع غذا و فعالیت بدنی می‌تواند در بسیاری از بیماران به کنترل خوب قند خون منجر شود ولی طبیعی شدن قند خون از این طریق بسیار دشوار است. بعلاوه هر چه سطح قند خون به حد طبیعی نزدیکتر شود خطر کاهش قند خون (هیپوگلیسمی) نیز افزایش می‌یابد(تا سه برابر)[۷ ، ۸].

بهترین راه برای نیل به قند خون طبیعی بدون در برداشتن خطر کاهش قند خون پیوند سلول‌های بتای پانکراس است. در گذشته پیوند پانکراس کامل انجام می‌شد که در میزان موفقیت یک ساله آن در ایجاد عدم وابستگی به انسولین ٦٠٪ بود[۹، ۱۰].

با این وجود نیاز به انجام جراحی بزرگ، ناتوانی مرگ‌ومیر قابل ملاحظه ناشی از آن، نیاز به درمان مادام‌العمر با داروهای سرکوبگر ایمنی، و مسأله حل نشده کمبود اعضای موجود برای پیوند(محدودیت منابع تامین بافت لازم) از اهدا کنندگان دچار مرگ مغزی، سبب جلب توجه به راه حل‌های دیگر برای معضل دیابت و در راس آنها پیوند جزایر سلولی پانکراس شده است[۱۱]. پیوند جزایر سلولی مزایای چشمگیر بالقوه‌ای نسبت به پیوند پانکراس کامل دارد که شامل موارد ذیل است:

۱-امکان تغییر ایمونوژنیسیته سلول‌ها با ایجاد تغییراتی در محیط کشت و مراحل فراوری سلولی

۲-امکان ایجاد تحمل ایمنی

۳-امکان ایزولاسیون ایمنی سلول‌ها با استفاده از پوشش‌های سلولی یا ابزارهای مرئی یا ذره بینی نیمه تراوا

٤-امکان استفاده از سلول‌های دو یا چند نفر اهداکننده برا ی یک فرد گیرنده در یک زمان یا به توالی

٥-امکان استفاده از سلول‌های بتای حیوانی

٦-امکان استفاده از سلول‌های بنیادین برای بسط منابع موجود[۱۲].

بدین ترتیب امکان غلبه بر مشکلاتی همچون نیاز به درمان مادام‌العمر با داروهای سرکوبگر ایمنی، کمبود منابع تامین سلول‌های جزیره‌ای و بازگشت خود ایمنی دیابت نوع ۱ در سلول‌های پیوند شده، در آینده قابل دسترسی خواهد بود. از سویی با کسب موفقیت‌های اخیر در ارتقای روش‌های استحصال، جدا سازی، تخلیص، پیوند جزایر سلولی و درمان سرکوب ایمنی بعد از پیوند، این روش به عنوان افق روشن درمان قطعی دیابت و جلوگیری از بروز عوارض حاد و مزمن و کاهش هزینه‌های ناشی از این بیماری مطرح شده و در بسیاری از مراکز علمی دنیا به طور فعال تحت بررسی و تحقیق و کاربرد بعنوان درمان دیابت قرار دارد[۱۳].

در سال ۱۹۷۶ Lacy وKostanousky برای اولین بار روشی را برای جداسازی و تخلیص جزایر لانگرهانس از بافت پانکراس ارائه نمودند[۱۴] و در سال ۱۹۷۹ همین گروه جزایر جداسازی شده را به موش صحرایی دیگری

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-23]

آلوگرافت زدند و حاصل این تحقیق مهم خود را در شماره ۲۲۰۴ مجله Science به چاپ رساندند[۱۵].

با معرفی پیوند پانکراس به عنوان روشی نسبتاً قطعی در درمان بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱، تحقیقات پیرامون پیوند جزایر لانگرهانس، از روش‌های جداسازی گرفته تا راهکارهای جلوگیری از رد پیوند بصورت فزاینده‌ای افزایش یافته است.

تحقیقات ابتدایی درباره ساختن محیط کشت مناسب برای کشت سلول‌های جداسازی شده به روش Lacy بود، برای مثال Anderson در سال ۱۹۷۸ چند محیط کشت را برای کشت جزایر پانکراس مورد تحقیق قرار داد و میزان انسولین ترشحی را در هر یک از آنها بررسی کرد[۱۶]. برای تعیین سریع زنده و یا غیر زنده بودن جزایر، Bank.H در سال ۱۹۸۸ از دو رنگ Acridine orange و propiodine iodide استفاده کرد[۱۷]. به تدریج پس از بدست آمدن روش مناسبی برای جداسازی و کشت سلول‌های جزیره‌ای، تحقیقات به سمت بهبود عملکرد این فرایند پیش رفت. از آنجا که مقدار توده سلول‌های بتای بدست آمده و وضعیت حیاتی و عملکرد آنها یکی از عوامل مهم در تعیین نتیجه پیوند، است مطالعات زیادی برای ارزیابی میزان حیات جزایر سلولی قبل از انجام عمل پیوند صورت گرفته است. در مطالعات انجام شده برای بررسی عوامل موثر بر میزان حیات جزایر، دو دسته عوامل معرفی شده اند. یک دسته عوامل مرتبط با شیوه و فرآیند جداسازی و دیگری عوامل مرتبط با وضعیت فرد دهنده پانکراس.

در مطالعه ای در سال ۲۰۰۷ که وضعیت جزایر بدست آمده از خوک های با سنین مختلف را مقایسه کرده ، نتایج بدست آمده نشان داده است که امکان تخلیص جزایر سلولی از حیوان های جوان بدلیل کوچکتر بودن اندازه آنها، کمتر است. همچنین جزایر بدست آمده از خوک‌های جوان شکننده تر بوده و راحت تر قطعه قطعه می شوند. در حالی‌که جزایر بدست آمده از خوک‌های با وزن بیشتر درجه خلوص بیشتری دارند و در محیط کشت نیز بهتر باقی می مانند. این مطالعه نشان داده که اندازه جزایر طی زمان تغییر می کند و بنابراین فرآیند جداسازی را علت اصلی قطعه قطعه شدن آنها نمی داند اگرچه در هر صورت از عوامل دخیل می باشد[۱۸].

آسیب‌های ضمن انجام فرآیند جداسازی دو نتیجه کلی دارند، یا منجر به قطعه قطعه شدن[1] جزایر سلولی و یا آسیب به هر یک از سلول‌ها می شوند. در یک مطالعه نشان داده شده که قطعه قطعه شدن جزایر سلولی مانع عملکرد مناسب این سلول‌ها بعد از پیوند نشده است[۱۸]. در حالی که در مطالعه‌ای دیگر یکپارچگی[2] جزایر از عوامل حیاتی موثر بر عملکرد مناسب بعد از پیوند ذکر شده که هضم توسط کلاژناز مهمترین عامل قطعه قطعه شدن معرفی شده است[۱۹]. جداسازی سلول‌ها ازمحیط بدن موجود زنده، طی مراحل مختلف وضعیت حیاتی سلول‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. دو علت اصلی آسیب سلولی را هیپوکسی و تروماهای آنزیمی- مکانیکی دانسته اند[۱۹]. Kinasiewicz و همکاران در مطالعه خود در سال ۲۰۰۴ از جمله عوامل بسیار مهم بر میزان حیات جزایر را، فاصله زمانی بین جداسازی پانکراس از دهنده تا انجام فرایندهای آزمایشگاهی و مدت زمان ایسکمی سرد[3] معرفی کرده است[۲۰] و این در حالیست که جزایر سلولی از بافت اگزوکرین مقاومت بیشتری نسبت به هیپوکسی ، تروما و کمبود تغذیه ای دارند[۲۲،۲۱].

همچنین مشخص شده که سلول‌های α ، δ و PP (پلی پپتید) که در محیط جزایر قرار دارند، طی فرایند جداسازی آسیب بیشتری می بینند[۱۹]. با توجه به این‌که ، میزان حیات جزایر برای پروگنوز پیوند مساله بسیار مهمی است و با توجه به این‌که بر اساس مطالعات انجام شده این شاخص به شدت تحت تاثیر روند انجام جداسازی و نگهداری سلول‌ها می باشد، در تحقیق حاضر مراحل لازم برای تهیه جزایر سلولی جهت پیوند در مدل حیوانی موش صحرایی، انجام شده است. هدف از انجام این مطالعه ارزیابی میزان حیات مجموعه جزایر بدست آمده در شرایط ، تکنیک و امکانات موجود در روزهای مختلف و در نهایت پیشنهاد بازه زمانی مناسب جهت انجام عمل پیوند با توجه به میزان حیات آنها می باشد.

[1] Fragmentation
[2] Integrity
[3] Cold ischemia

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-23]

روش‌ها

این پژوهش، یک مطالعه توصیفی جهت بررسی میزان حیات جزایر سلولی در محیط کشت می باشد. مراحل جداسازی و تخلیص جزایر لانگرهانس بر اساس تکنیک ارائه شده توسط Lacy و Kostianovsky در سال ۱۹۶۷ که روش پذیرفته شده و متداول در سایر مطالعات انجام شده تا کنون بوده ، انجام شده است [۱۴].

ابتدا موش‌ها در محیط حاوی غلظت بالای اتر بیهوش شده، پس از آن موها در موضع عمل تراشیده و با الکل ضد عفونی شد. سپس با یک برش قدام شکم در خط وسط وارد حفره شکم شده و مجرای اصلی پانکراس در محل اتصال به دئودنوم لیگاتور شد و پس از کانوله کردن مجرا حدود ۱۰ سی سی(Hank's Balanced Salt Solution(Gibco) HBSS) سرد(نگهداری شده در یخچال معمولی ، در حدود دمای ٤ درجه سانتی گراد) بداخل مجرا تزریق شد. پانکراس متسع شده با دقت از دئودنوم جدا و داخل پتری حاوی ۲۰ سی سی HBSS سرد قرار داده شد. غدد لنفاوی و چربی های واضح را از پانکراس جدا کرده، پانکراس با قیچی به مدت ۲-۱ دقیقه تکه تکه شد. در طی این عمل، به‌طور مداوم HBSS سرد اضافه شد .این عمل سه بار تکرار شد تا قسمت اعظم چربی از محیط خارج گردد (مرحله chopping). بافت حاصله را در یک فالکن حاوی HBSS قرار داده و با ۱۵۰۰ rpm (دور در دقیقه) به مدت ۶۰ ثانیه سانتریفوژ شد. این عمل دو بار تکرار شده و هر بار مایع جمع شده در روی لوله دور ریخته شد. به محصول بدست آمده cc ۱۰ محلول کلاژناز V (Sigma) (با غلظت ۲mg/ml-۱/۵) اضافه شده، لوله در یک حمام آبی با دمای ۳۷ درجه قرار داده و با سرعت حدود ۱۵۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. این عمل حدود ۲۰ دقیقه طول کشید و طی این مدت نمونه ٤-۳ بار vortex شد، هر بار حدود ۲۰-۱۰ ثانیه به فواصل ۶-۵ دقیقه، تا به حداکثر هموژنیسیته رسید. یک نمونه از محلول را پس از رنگ آمیزی با Dithizone (متعلق به شرکت merck فرانسه) در زیر میکروسکوپ بررسی شده و در صورت مشاهده مناسب بودن وضعیت هضم ، با افزودن HBSS سرد به لوله، عمل هضم متوقف شد. محلول حاصله مجدداً به مدت ٦۰ ثانیه با ۱۵۰۰ rpm سانتریفوژ و قسمت فوقانی آن دور ریخته شد . پس از آن، بافت باقیمانده در گرادیان غلظتی محلول ficoll (Amersham Biosciences) به مدت ۱۲ دقیقه در g ۸۰۰ سانتریفوژ شد.

پس از آن محتویات سانتریفوژ شده در بین غلظت‌های ۲۰-۱۱ و ۲۳-۲۰ که جزایر عمدتاً در این دو فاصله قرار می‌گیرند، با میکروپیپت بر روی پلیت ریخته و جزایر لانگرهانس زیر میکروسکوپ زمینه سیاه جدا شد[1].

محیط کشت روتین برای جزایر لانگرهانس RPMI 1640 (Sigma) است که حاوی ۱٪ pen/strep و ۱۰٪ (Fetal

[1] hand pick

جدول ۱ – میانگین نمره (Score) و درصد میزان حیات (Vability) جزایر در زمان‌های مختلف سپری‌شده از انکوباسیون

زمان سپری شده از انکوباسیون(روز)	میانگین نمره (صفر تا ۲)	درصد میزان حیات
۰	۰/۷	٪۳۵
۱	۱/۳۱	٪۶۶
۲	۲	٪۱۰۰
۳	۱/۶۴	٪۸۲
۵	۰/۳۳	٪۱۷
۶	۰/۱۰	٪۵

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-23]

(Calf Serum) FCS (Gibco) بـــوده در pH = ۷/۴ و گلوکز ۵/۶ mM تنظیم می‌گردد. در هر well که حاوی cc ۲ RPMI است، حدود ۴۵-۳۵ جزیره پانکراس قـرار داده و در ۳۷°C و ۵٪ CO2 انکوبه شد. تعویض محیط کـشت یک روز در میان صورت گرفت.

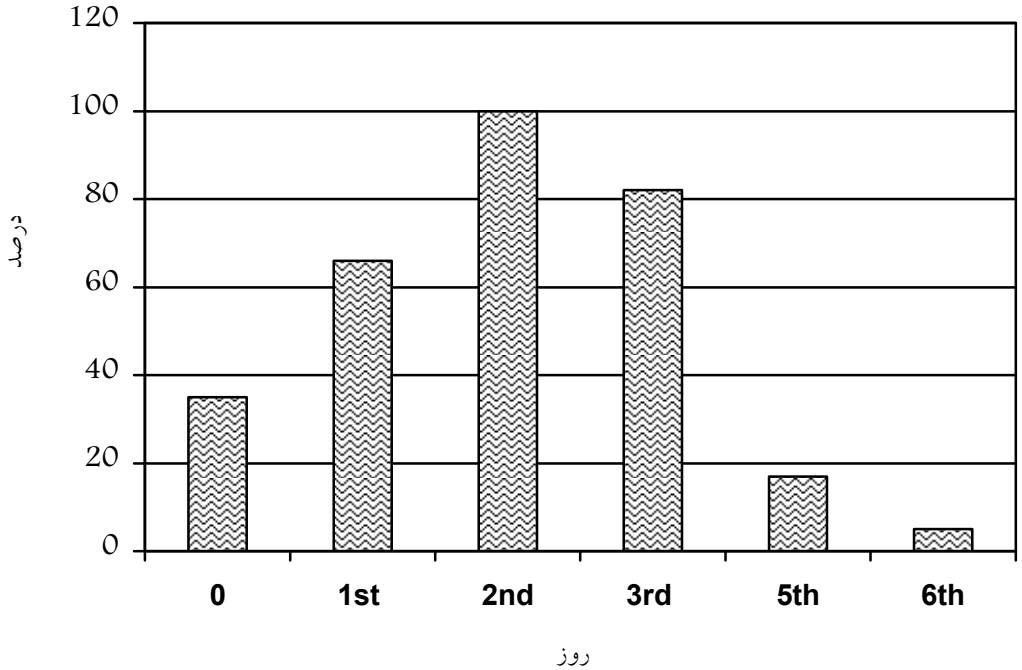
در ایــن مطالعــه جزایــر لانگرهــانس پــانکراس ۲ مــوش صحرایی نر بالغ (با وزن تقریبی ۳۵۰ گرم) بطور جداگانـه استخراج شد، از هر یک حدود ۱۶۰-۱۲۰ جزیره بدسـت آمد و در نهایـت ۶ well بـرای ارزیـابی وضـعیت حیـات جزایر انکوبه شد.

میزان حیات جزایر سلولی در ساعت‌هـای ۰ ، ۲۴ ، ۴۸ و روزهای ۳ و ۵ و ۶ پس از انکوباسیون، بـا نمونـه گیـری ۸-۴ جزیره سلولی در هر بار و رنگ آمیـزی آنهـا توسـط Acridine Orange / Propiodine Iodide (Sigma) زیـر میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد.

رنگی که مجموعه های سلولی می گیرنـد در طیفـی بـین سبز و نارنجی است. هر چه میزان سبزی آن بیـشتر باشـد نمایانگر میزان حیات بیـشتر سـلول‌هاسـت. رنـگ جزایـر سلولی توسط دو نفر به صورت مجزا بررسـی و بـصورت نمره های صفر، ۱ یا ۲ ثبـت شـد، بـه ایـن ترتیـب کـه ۲ نماینده رنگ پذیری یک دست سبز ، صفر نماینـده رنـگ پـذیری یـک دسـت نـارنجی و ۱ نماینـده رنـگ پـذیری مخلوطی از سبز و نارنجی بود.

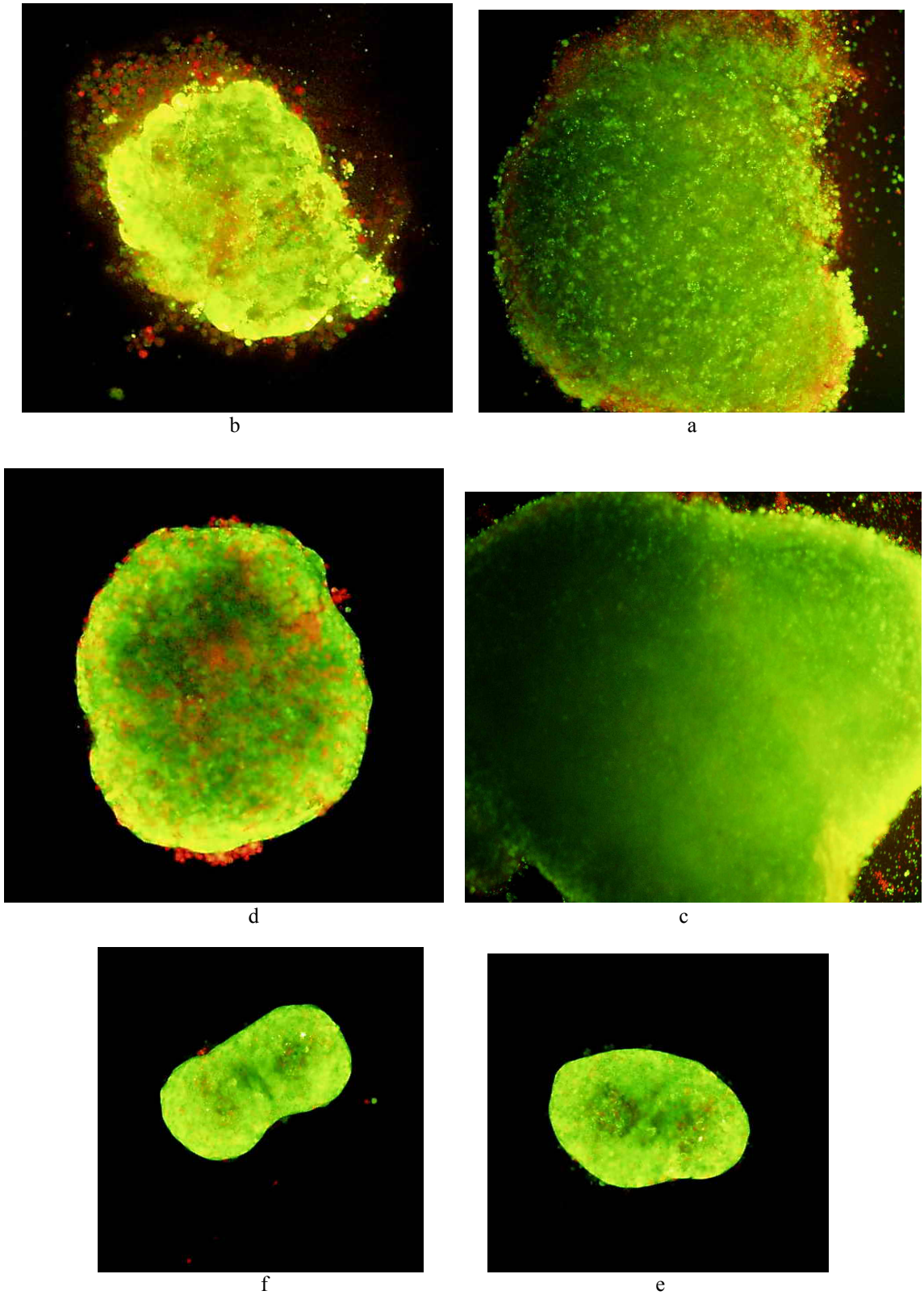
یافته‌ها

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شـود، نتـایج بدسـت آمده نشان می دهد که میزان حیات جزایر بلافاصله پس از انکوباسیون تنها ۳۵٪ است، که با قـرار گـرفتن در محـیط کـشت در انکوبـاتور بـا دمـای ۳۷°C و ۵٪ CO2 ، در روز اول و دوم ، به تـدریج افـزایش یافتـه و بـه ۱۰۰٪ در ۴۸ ساعت بعد از انکوباسیون مـی‌رسـد. در روز سـوم، میـزان حیات سلول‌ها به ۸۲٪ کاهش یافته و با ادامه انکوباسـیون، میزان حیات در روزهای ۵ و ۶ به شدت کم شد (تـا ۵٪)، به حدی که از مقدار اولیه در لحظه صفر خیلی کمتر بود. میانگین نمره و درصد میزان حیات مجموعه جزایر سلولی به تفکیک زمان ارزیابی در جدول ۱ خلاصه شـده اسـت.



شکل ۱ – میزان حیات (viability) جزایر در زمان‌های مختلف از انکوباسیون به در صد

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-23]

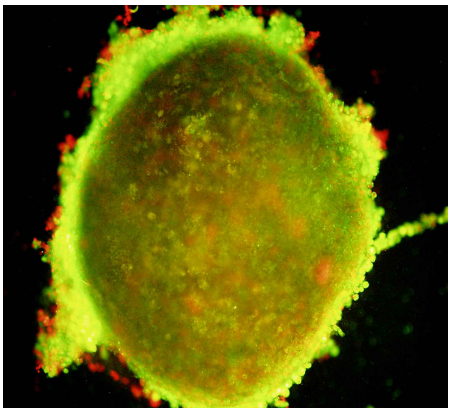


شکل ۲- رنگ پذیری جزایر پانکراس با رنگ آمیزی Acridine Orange / Propiodine Iodide مشاهده شده با میکروسکوپ فلورسانس

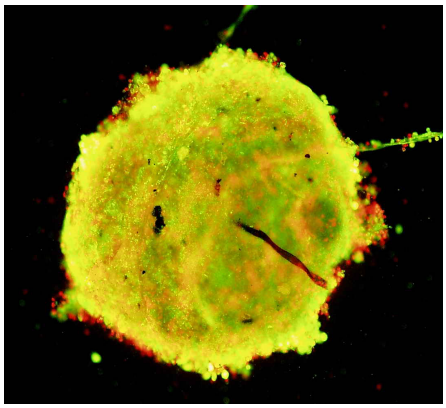
a) پس از جدا سازی b و c) ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون d) ۴۸ ساعت پس از انکوباسیون
e و f) ۳ روز پس از انکوباسیون g و h) ۵ روز پس از انکوباسیون i) ۶ روز پس از انکوباسیون

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-23]

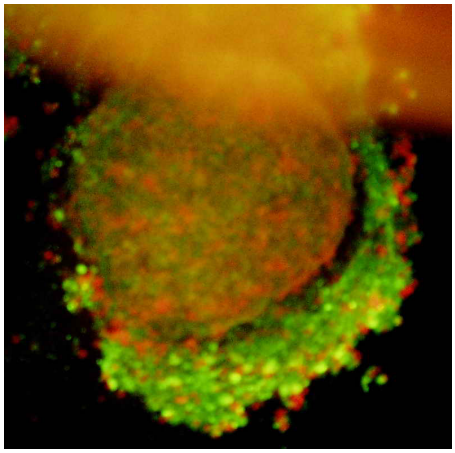
ادامه شکل ۲



h



g



i

همچنین میزان رنگ‌پذیری جزایر در روزهای مختلف در شکل ۲ نشان داده شده است.

بحث

جداسازی جزایر پانکراس توسط محلول کلاژناز در ابتدا توسط Moskalovski در سال ۱۹۶۵ شروع شد[۲۳] و سپس Lacy & Kostianovsky در سال ۱۹۶۷ تکنیک جداسازی جزایر را توسط اتساع از طریق مجرای پانکراس و استفاده از کلاژناز در رت معرفی کردند. بسیاری از مقالات از جمله مطالعه حاضر از همین روش استفاده کرده اند[۲۵،۲۴،۱۴]. در بعضی مطالعات نیز از روش دیگری استفاده شده است [۲۷،۲۶]. تا کنون مطالعه ای در رابطه با مقایسه این دو روش انجام نشده است، اما به نظر می رسد از آنجا که اکثر مطالعات و به ویژه مطالعات جدیدتر بر اساس روش استاندارد می باشند، این روش بیشتر مورد قبول باشد.

از طرف دیگر اکثر مقالات از نمونه حیوانی رت استفاده کرده اند [۲۸،۲۴-۲۶،۲۰،۱۹]، در حالی که مقالاتی نیز مدل های دیگر مانند موش سوری[۲۹]، سگ[۳۰] و خوک را [۳۱] مورد استفاده قرار داده اند. در این مطالعه نیز با توجه به مطالعات جدیدتر و در دسترس بودن رت، از این مدل استفاده شده است.

محیط کشت مورد استفاده RPMI می باشد که اکثریت قاطع مطالعات از آن استفاده کرده اند[۲۸-۳۰،۲۶،۲۴]. در حالی که مطالعاتی نیز از محیط CMRL برای انکوباسیون و از محیط RPMI ۲ ساعت پیش از سنجش استفاده کرده اند[۲۵]. نحوه سنجش میزان حیات جزایر در مطالعات، مختلف می باشد به طوریکه Tian و همکارانش از میزان

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-23]

قطعات DNA/histone (مونو و الیگو نوکلئوزوم) در محلول فوقانی[1] محیط کشت استفاده کرده اند[۲۴]. Morini و همکارانش از Trypan blue dye [۱۹]، exclusion وRosenberg و Wang از مورفولوژی برای این منظور استفاده کرده اند[30]. Bosco و همکارانش نیز از همین روش سود برده اند[26]. در بسیاری از مطالعات نیز تنها میزان ترشح انسولین به عنوان معیار غیرمستقیم از میزان حیات جزایر سنجیده شده است[۲۹،۲۵]. در این مطالعه از روش استاندارد Bank با کمک دو رنگ Acridine orange و propiodine iodide برای تعیین میزان حیات جزایر استفاده شد [۱۷].

نتایج بدست آمده نشان می دهد که میزان حیات سلول ها بلافاصله پس از انکوباسیون ۳۵٪ است و پس از آن با قرارگیری در محیط انکوباسیون در ۴۸ ساعت اول افزایش می یابد بطوری که در روز اول ۶۶٪، روز دوم ۱۰۰٪ و روز سوم ۸۲٪ شده است.

Morini و همکاران در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۶ برای جداسازی جزایر سلولی پانکراس رت انجام دادند، میزان حیات را ۲۴ تا ۴۸ ساعت بعد از انکوباسیون ۸۸-۹۶٪ بدست آوردند[۱۹]، که این نتایج با نتیجه بدست آمده از این مطالعه(۶۶-۱۰۰٪ در ۲۴-۴۸ ساعت اول) همخوانی دارد.

عامل پایین بودن نسبی میزان حیات در ابتدای انکوباسیون را می توان مراحل طی شده پس از جداسازی سلول‌ها از محیط مناسب بدن موش تا زمان قرارگیری در شرایط مساعد محیط آزمایشگاه دانست[۲۰،۱۹].

سلول های پانکراس، تمامی مراحل جداسازی و خالص‌سازی را در محیط آزمایشگاه طی می کنند و مدت زیادی از زمان مرگ رت تا آماده سازی سلول‌ها برای کشت سپری می شود (حدود ۳ ساعت) که این زمان خود می تواند از درصد میزان حیات سلول های جزیره ای بکاهد.

هم چنین صدمات و استرس هایی که طی فرایند آماده‌سازی سلول ها به جزایر وارد می شود (مانند مرحله chopping، vortex ، سانتریفوژ و شستشوهای مکرر) مشخصا از عوامل اصلی است که منجر به آسیب سلولی می شود و از میزان حیات سلول ها می کاهد(هر چند پروتکل مورد استفاده در این طرح جدیدترین پروتکل در این زمینه می باشد و سعی شده در آن کمترین صدمه به سلول ها وارد شود).

شاخص دیگر که اهمیت قابل توجهی دارد، سایز جزایر سلولی می باشد که در این مطالعه بدلیل عدم دسترسی به ابزار سنجش سایز (لام های مدرج) اندازه گیری نشد و بهتر است در مطالعات بعدی مورد توجه قرار گیرد.

از دیگر شاخص های مرتبط با مورفولوژی کلی که در مطالعات مشابه ارزیابی شده اند می توان به border(irregular/well-rounded)و integrity (solid-compact / fragmented) و shape (flat/spherical) اشاره کرد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این طرح، می‌توان دریافت که سلول‌های جزیره‌ای پانکراس پس از جداسازی و تخلیص بدنبال کشت در محیط مناسب از نظر وضعیت حیاتی بهبود می‌یابند، به طوری که بهترین آمادگی جهت پیوند شدن را پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون بعد از جداسازی از محیط بدن دارند. اگر چه این وضعیت مناسب سلولی طی روزهای بعدی به سرعت افت می کند.

نتایج به‌دست آمده از مطالعات کارآزمایی بالینی انجام شده نشان می دهد که اصلی ترین عوامل محدود کننده در رسیدن به حداکثر کارایی پیوند، ناتوانی در پیوند تعداد سلول های با حیات کافی برای جبران کمبود انسولین موجود، فرایند رد پیوند و بازگشت حالت خود ایمنی می‌باشد[۳۲]. اهمیت کلیدی حفظ میزان حیات سلول‌های جزیره ای برای استفاده عملی از آنها در پیوند سلول‌های بتا، ضرورت انجام مطالعات گسترده تر برای بررسی اثر مواد مختلف(انواع مداخلات) بر ای بهبود میزان حیات این سلول ها را نشان می دهد.

سپاسگزاری

ازخانم ندا فتاحی، خانم دکتر نور محمدی و جناب آقای حسن اکبری هنجنی که ما را در انجام مراحل این طرح تحقیقاتی یاری نمودند، تشکر و قدردانی می شود.

1 -supernatant

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-23]

مآخذ

1. Lee MK, Bac.Y. Cell transplantation for endocrine disorders. *Advanced deug delivery reviews* 2000; 42: 103-120.
2. Serop P,Madsen OD,Mandrop T. Islet and stem cell transplantation for treating diabetes. *BMT* 2001; 322: 29-32.
3. Rubin RJ, Altman WM, Mendelson DN. Health care expenditures for people with diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 809A-809F
4. Robertson P. The diabetes control and complication trial research. *N Eng J Med* 1993; 329: 976-986.
5. امینی و همکاران : بررسی میزان هزینه های اقتصادی بیماری دیابت در بیماران دیابتی نوع ۲ تحت پوشش مرکز تحقیقات غدد ومتابولیسم اصفهان. (در دست چاپ)
6. Bretzel RG, Hering BJ, Federlin KF. Islet cell transplantation in diabetes mellitus--from bench to bedside. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1995; 103 (Suppl) 2: 143-59.
7. Federlin KF. Islet transplantation. The connection of experiment and clinic exemplified by the transplantation of islets of Langerhans. *Exp Clin Endocrinol* 1993; 101: 334-45.
8. Federlin K, Hering B, Bretzel RG. Islet transplantation: clinical and experimental. *Horm Metab Res Suppl* 1992; 26: 148-51.
9. Stratta R. Mortality after vascularised pancreas transplantation. *Surgery* 1998; 124: 823-830.
10. athieu C. Current limitations of islet transplantation. *Transplant Proc* 2001; 33: 1707-8.
11. Humar A, Kandaswamy R, Granger D, Gruessner RW, Gruessner AC, Sutherland DER. Decreased surgical risks of pancreas transplants in the modern era. *Ann Surg* 2000; 231: 269-275.
12. Weimar B, Rauber K, Brendel M, Bretzel RG, Rau WS. Percutaneous transhepatic catheterisation of the portal vein: a combined CT and fluoroscopy-guided technique. *Cardiovasc Intervent Rdiol* 1999; 22: 342-344.
13. Zaltzman J, McAlister V, Russell Tacrolimus, MMF, steroid, and ALG immunotherapy for high immunological risk renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2001; 33: 1044-5.
14. Lacy P, Kostianovsky M,Halloran P,Landsberg D,Busque S, Shoker A, et al. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1976; 16: 35–39.
15. Lacy P.E., Davine J.M. and Finke E.H. Prolongation of islet allograft survival following in vitro culture (24 _C) and single injection of ALS. *Science* 1994; 2204: 312–313.
16. Anderson A. Isolated mouse pancreatic islets in culture:Effects of serum and different culture media on the insulin production of the islets. *Diabetologia* 1978; 14: 397–404.
17. Bank H. Rapid assessment of islet viability with acridine orange and propidium iodide. *In Vitro Cell Develop Biol* 1988; 24: 266–273.
18. Bottino R, Balamurugan AN, Smetanka C, Bertera S, He J, Rood PPM, et al.Isolation outcome and functional characteristics of young and adult pig pancreatic islets for transplantation studies. *Xenotransplantation* 2007; 14: 74–82.
19. Morini S, Braun M, Onori P, Cicalese L, Elias G, Gaudio E, et al. Blackwell Publishing Ltd Morphological changes of isolated rat pancreatic islets: a structural, ultrastructural and morphometric study. *J Anat* 2006; 209: 381–92.
20. Kinasiewicz A, Juszczak M, Pachecka J, Fiedor P. Pancreatic Islets Isolation Using Different Protocols with in Situ Flushing and Intraductal Collagenase Injection. *Physiol Res* .2004; 53: 327-333.
21. Baumgartner D, Sutherland DE, Heil JE. (1980) Cold storage of segmental canine pancreatic grafts for 24 hours. *J Surg Res* 1980; 29: 248–257.
22. Schwartz BD, Traverso LW (1984) Morphological changes in pancreatic fragments prepared for transplantation by collagenase treatment. *Transplantation* 1980; 38: 273–280.
23. Moskalevski S.Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen Comp Endocrinol* 1965; 5: 342-353.
24. Tian XH, Xue WJ, Ding XM, Pang XL, Teng Y, Tian PX, et al. Small intestinal submucosa improves islet survival and function during in vitro culture. *World Jl of Gastroenterol* 2005; 11: 7378-7383.
25. Lu WT, Lakey JRT, Juang JH, Hsu BR, Rajotte RV. Effect of Trypsin Inhibitor on Islet Isolation From Fresh and Cold Preserved Rat Pancreas. *Transplantation Proceedings* 2003; 35: 488–489.
26. Bosco D, Meda P, Halban PA, Rouiller DG. Importance of Cell-Matrix Interactions in Rat Islet β-Cell Secretion in Vitro Role of 6 1 Integrin. *Diabetes* 2000; 49: 233-43.
27. Sutton R, Peters M, McShane P, Gray DW, Morris PJ: Isolation of rat pancreatic islets by ductal injection of collagenase. *Transplantation* 1986; 42: 689–691.
28. Hiraoka K, Trexler A, Fujioka B, Guo Z, Zhang HJ, Overland A, et al. Optimal Temperature in Pancreas Preservation by the Two-Layer Cold Storage Method Before Islet Isolation. *Transplantation Proceedings* 2001; 33: 891–892.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-23]

29. Chen J, Jeppesen PB, Abudula R, Dyrskog SEU, Colombo M, Hermansen K. Stevioside does not cause increased basal insulin secretion or h-cell desensitization as does the sulphonylurea, glibenclamide: Studies in vitro. *Life Sciences* 2006; 78: 1748 – 1753.
30. Wang RN, Rosenberg L. Maintenance of beta-cell function and survival following islet isolation requires re-establishment of the islet-matrix relationship. *J of Endocrinol* 1999; 163: 181-90.
31. Peck AB, Yin L, Ramiya V. Animal Models to Study Adult Stem Cell-derived, In Vitro-generated Islet Implantation. *ILAR J* 2004; 45: 259-67.
32. Boker A.,et al. Human islet transplantation: update. *World J Surg* 2001; 25: 481-486.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-11-23]