جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تخلیص و جداسازی سلول‌های جزایر لانگرهانس موش صحرایی

دکتر عظیم اکبرزاده [۱] - ***شیرین جمشیدی*** [۲] - ***علی فرهنگی*** [۳] - ***دکتر بهزاد لامع راد*** [۴] - ***سلمان بهره مند*** [۵]

[۱] دکترای تخصصی بیوشیمی، دانشیار و مدیر گروه پایلوت بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران

[۲] کارشناس ارشد بیوشیمی، بخش پایلوت بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران

[۳] کارشناس ارشد بیوتکنولوژی گروه پایلوت بیوتکنولوژی انستیتوپاستور ایران

[۴] دکترای تخصصی بیوشیمی، دانشیار گروه بیو شیمی دانشگاه الزهراء

[۵] کارشناس ارشد بیولوژی سلولی و مولکولی

نویسنده مسؤول: دکترعظیم اکبرزاده - تهران – خیابان ۱۲ فروردین – بخش پایلوت بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران
E-mail: azimakbarzadeh@pastuer.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۳/۱۱/۸ – تاریخ پذیرش: ۸۴/۵/۶

چکیده

زمینه و اهداف: انتظار می‌رود که پیوند سلول‌های جزایر لانگرهانس باعث نجات افراد مبتلا به دیابت در جهان گردد. عمل پیوند سلول‌های جزایر لانگرهانس(TPIC) در افراد مبتلا به دیابت مستلزم شناخت تکنیک‌ها و روش‌های خاصی است. در این مطالعه، جهت انجام پیوند سلول‌های جزایر لانگرهانس موش صحرایی، روش استاندارد شده‌ای برای تخلیص سلول‌های جزایر لانگرهانس ترتیب داده شد.

روش بررسی: در این روش در اثر عمل کلاژناز بر روی قطعات بافت پانکراس، دستجات سلولی یا جزایر لانگرهانس جدا شدند و با عمل آنزیماتیک به کمک DNase و Trypsin سلول‌های جزایر به فرم تک‌تک درآمدند و در نهایت بوسیله فلوسایتومتری سنجش شدند.

یافته‌ها: فلوسایتومتری این سلول‌ها نشان داد که در سوسپانسیون سلولی بدست آمده، ۹۱ درصد سلول بتا وجود دارد. طی این عمل هضم، اکثر ذرات اگزوکرین کوچک حذف گردید.

نتیجه‌گیری: پیوند سلول‌های اندوکرین خالص شده با مجموعه‌ای از سلول‌های بتای خالص همراه یا بدون سلول‌های غیر اندوکرین انجام می‌شود. این انبوه خالص شده عاری از سلول‌های صدمه دیده و سلول‌های غیر اندوکرینی می‌باشد.

کلمات کلیدی: *فلوسایتومتری؛ تخلیص؛ جداسازی؛ سلول‌های جزایر لانگرهانس.*

مقدمه

دیابت شیرین وابسته به انسولین (IDDM) تقریباً در کلیه موارد از کاهش میزان ترشح انسولین بوسیله سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس ناشی می‌شود. دیابت معمولاً به دو نوع تقسیم می‌شود: دیابت جوانان که معمولاً امّا نه همیشه در سال‌های اول زندگی شروع شده و بطور عمده در افراد فربه بوجود می‌آید. توارث نقش مهمی در بروز هر دو نوع دیابت بازی می‌کند. دیابت نوع جوانان از نظر شروع، سریع بوده و به‌نظر می‌رسد که از یک استعداد ارثی به (۱) ایجاد آنتی‌کورهایی بر ضد سلول‌های بتا و

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بدینوسیله اندام خود ایمنی این سلول‌ها و (۲) انهدام احتمالی سلول‌های بتا بوسیله بیماری‌های ویروسی یا (۳) دژنراسیون ساده احتمالی این سلول‌ها ناشی می‌شود. به‌نظر می‌رسد که دیابت از نوع شروع بعد از بلوغ، از دژنراسیون سلول‌های بتا در نتیجه پیر شدن سریع‌تر در افراد مستعد ناشی می‌شود. فربهی ابتلای به این نوع دیابت را مساعد می‌سازد زیرا مقادیر زیادی انسولین برای کنترل متابولیسم در افراد فربه نسبت به افراد طبیعی مورد نیاز است (۱).

در این بیماری، سلول‌های بتای تولید کننده انسولین جزایر لانگرهانس پانکراس آتروفی شده، تولید انسولین کاهش یافته و سطح انسولین خون پایین می‌آید. تزریق انسولین طول عمر بیماران مبتلا به دیابت شیرین وابسته به انسولین را افزایش می‌دهد و از عوارض سیستمیک جلوگیری می‌کند. عوارض بلند مدت IDDM مشکل بزرگی برای حفظ سلامتی بیماران شده است و امروزه مشخص شده که کنترل عوارض ناشی از هومئوستازی نامناسب قند خون با تزریق انسولین به‌طور نسبی امکان‌پذیر است. پیوند سلول‌های جزایر لانگرهانس راهی جدید و نوپا برای علاج دیابت می‌باشد، این روش درمانی ارزان، ساده، بی‌خطر و قابل اجرا برای همه بیماران دیابتی است. استاندارد و بهینه نمودن شرایط جداسازی و تخلیص سلول‌های جزایر لانگرهانس یکی از مهم‌ترین مراحل پیوند است. پس از دستیابی و تثبیت چنین روشی است که محققین خواهند توانست مطالعاتی برای رفع مشکلات پیوند انجام دهند (۲).

روش بررسی

مواد: کلاژناز (Collagenase)، تریپسین کریستالی (Crystalline Trypsin)، DNase پانکراس گاوی (Bovine Pancreatic DNase)، ۲-[٤-(۲-هیدروکسی اتیل)-۱-پیرازینیل] اتان سولفونیک اسید)، (HEPES) و سیلیکون (Silicon Dicholorodimethylsilan) از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

پرکول Percol: colloidal pvp (coated silica for cell separation aseptically filled)، یک محلول تجاری از ذرات سیلیکون است که با پلی‌وینیل پیرولیدون پوشانیده شده است. این ماده برای جداسازی سلول به صورت استریل می‌باشد که از شرکت فارماسیای آبسلاء سوئد تهیه شد. اتیلن گلیکول - بیس (بتا- آمینواتیل‌اتر)- N', N', N, N - تترااستیک اسید(Ethylene glycol-bis (Beta-amino ethyl ether)-N, N, N', N'-tetra acetic acid) از شرکت سیگما تهیه شد.

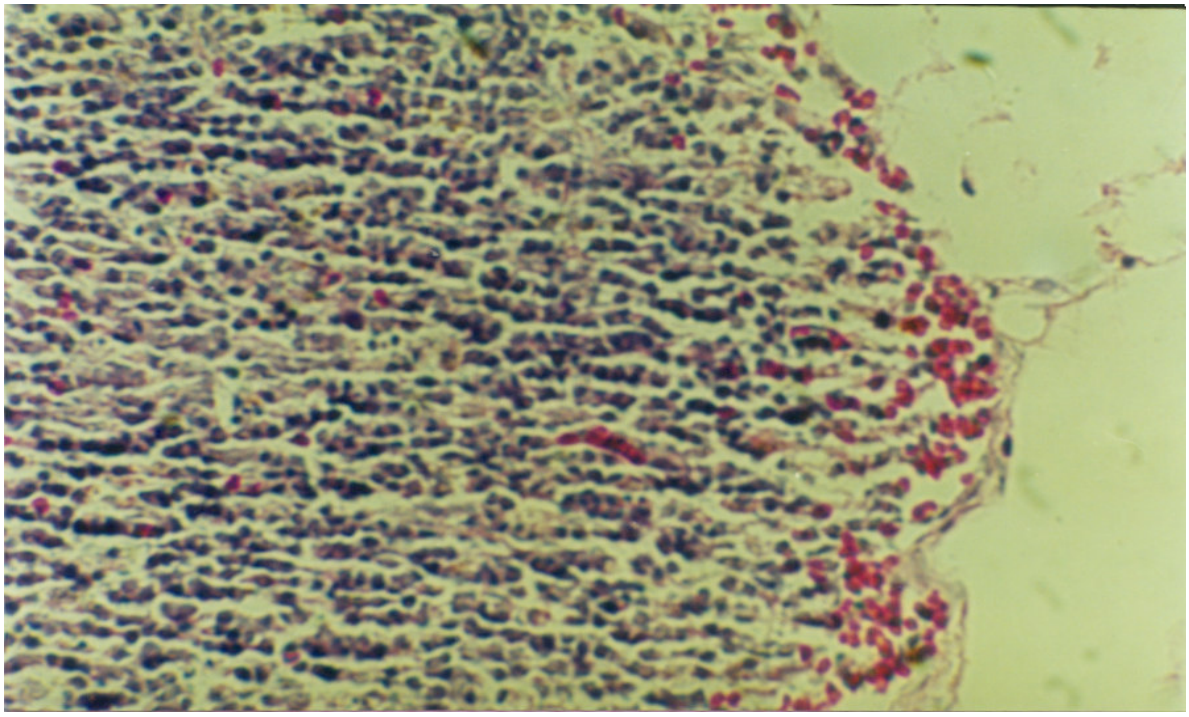
محیط‌ها: تمامی محیط‌ها توسط فیلترهای ۰/۲۲ میکرومتر استریل گشته و مواد اتوکلاو می‌شدند یا به صورت مواد استریل یکبار مصرف خریداری می‌گردیدند. ظروف شیشه‌ای مورد استفاده جهت جمع کردن سلول‌های جزایر لانگرهانس با سیلیکون، سیلیکونیزه شدند. پوشش سیلیکونی دادن شامل ۳۰ دقیقه انکوباسیون با محلول استریل 10µg/ml سیلیکون بعد از شستشو با آب مقطر می‌باشد. عمل جداسازی جزایر لانگرهانس و تخلیص سلول در محیط بافری HEPES-buffered Earle's medium (EH) صورت گرفت که شامل اجزای زیر می‌باشد:

123 mM NaCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 0.8 mM $MgSO_4$,
5.4 mM KCL, 1.0 mM NaH_2PO_4, 4.2 mM $NaHCO_3$
2.8 mM Glucose, 10 mM HEPES

محیط با محلول‌های ۲/۵ درصد و ۵ درصد از BSA (Bovine Serum Albumin) فراکشن V تکمیل شد و با CO_2 ۵ درصد در دمای اتاق pH آن به ۷/۳ کنترل شده و حجم نهایی به یک لیتر رسانده شد.

حیوانات مورد استفاده: بافت از موش‌های صحرایی نر (Wistar rat) بالغ با وزن ۲۵۰gr-۲۰۰ تأمین شد (تصویر ۱).

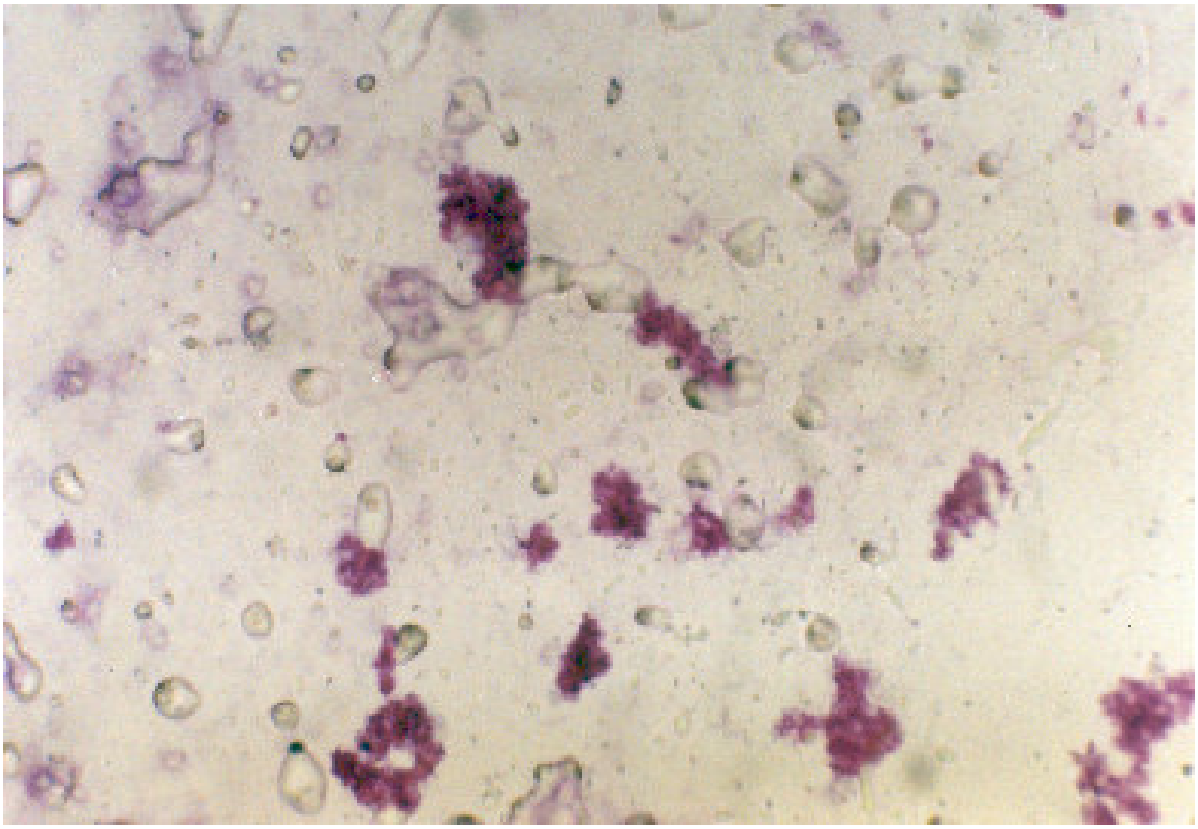
جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



تصویر۱: بافت پانکراس موش صحرایی که بوسیله Hemtoxylin & Eosin رنگ‌آمیزی شده و با بزرگنمایی ۲۵۰۰ برابر بوسیله میکروسکوپ Leitz عکسبرداری شده است.

جداسازی جزایر لانگرهانس

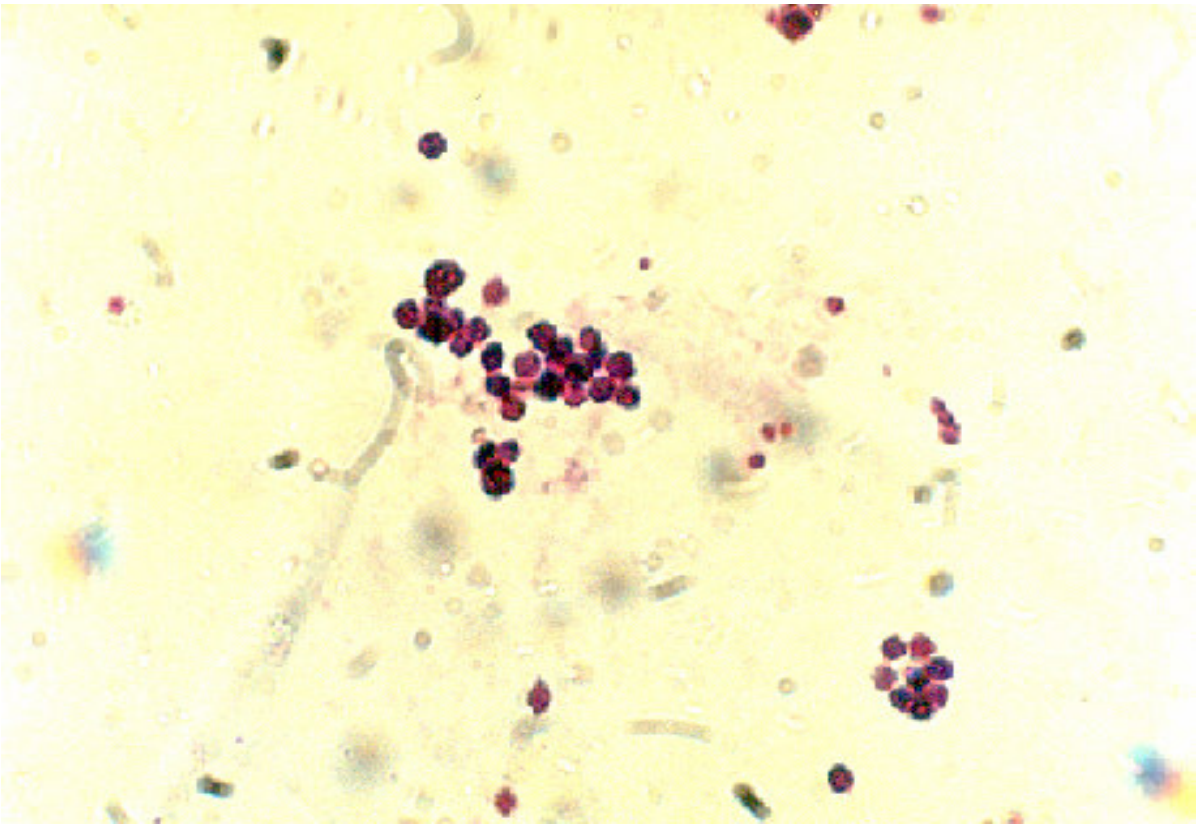
جزایر لانگرهانس پانکراس با روش اصلاح شده هضم کلاژنازی از موش‌های صحرایی جدا شدند (۳). ۲ ساعت قبل از تشریح جهت تشخیص پانکراس، پیلوکارپین(Pilocarpine) (۰/۲ ml از محلول ۰/۲درصد) بصورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد (٤). برای انجام عمل تشریح ابتدا در داخل دسیکاتور مناسب حیوانات با اِتر بیهوش شدند. سپس با باز کردن شکم موش‌های صحرایی و بستن مجرای پانکراس ۱۰ میلی‌لیتر محلول EH حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کلاژناز به داخل پانکراس تزریق گردید (۵) تا منبسط شود و گره‌های لنفاوی و بافت‌های چربی پانکراس قابل جداسازی باشد، سپس آن را خُرد و تکه تکه کرده، بعد از ۱۵ ثانیه سدیمانتاسیون محلول رویی را دور ریخته، سوسپانسیون بافتی با یک حجم مساوی از محلول EH شامل ٤ mg/ml کلاژناز رقیق گردید (٦). بافت را در 37°C به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰ دور در دقیقه شیک کرده تا هضم شود، سپس در حرارت اطاق به مدت ۳ دقیقه با پیپت کردن ملایم، جزایر لانگرهانس جدا شدند (۷). آنچه که از هضم به‌دست می‌آید، از بین یک صفحه نایلونی با قطر ۵۰۰µm عبور داده می‌شود. بخش صاف شده ۳ بار سانتریفیوژ شد و هر بار با بافر EH شسته و مجدداً در محلول EH به‌حالت سوسپانسیون درآورده شد (۸). آنچه که روی صافی مانده بود، مجدداً در محلول EH بدون کلاژناز به صورت سوسپانسیون درآورده شد و بعد در 37°C به مدت ٤ دقیقه در انکوباتور شیکردار با دور ۳۰۰ در دقیقه شیک گردید و به ترتیب فوق صاف شد. محصول دومین هضم نهایتاً در محلول EH شسته شد. جزایر لانگرهانس صاف و شسته شده و قسمت‌های باقیمانده با میکروسکوپ دقیقاً مورد بررسی قرار گرفتند و جزایر تمیز شده جمع‌آوری گردیدند (تصویر۲). این روش باید با دقت و سرعت مناسب انجام شود تا جزایر کمتر آسیب ببینند (۹).



تصویر ۲: جزایر لانگرهانس موجود در سوسپانسیون سلولی بافت آندوکرینی پانکراس موش صحرایی است. که بوسیله محلول Gimsa رنگ آمیزی شده و با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر بوسیله میکروسکوپ Leitz عکسبرداری شده است.

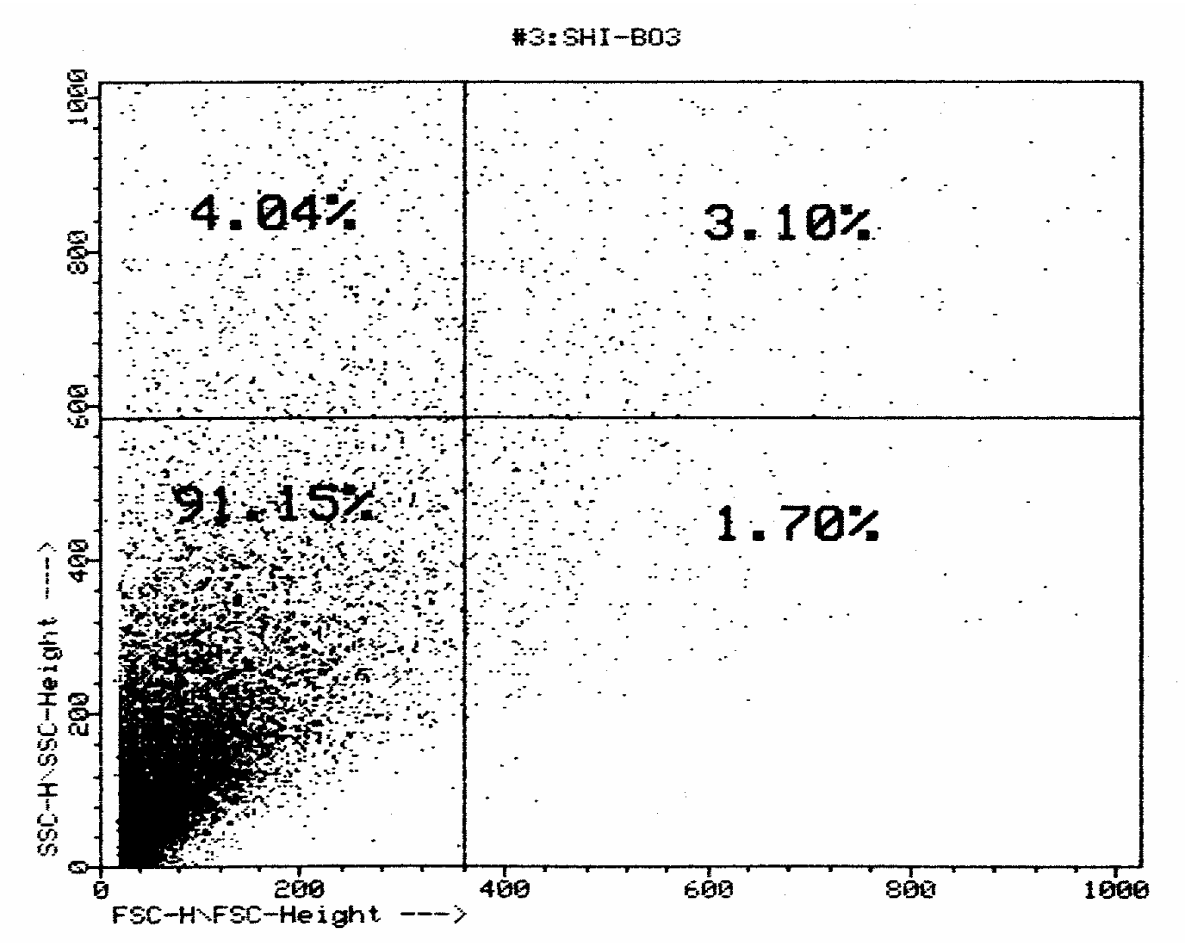
آماده‌سازی و تهیه سلول‌های جزایر لانگرهانس

سوسپانسیون جزایر لانگرهانس ابتدا به مدت ۸ دقیقه در حرارت اتاق نگهداری شد و سپس با یک پیپت پاستور سیلیکون شده با طول ۹ اینچ آسپیره شد، سپس تریپسین با غلظت نهایی ۲۵ µg/ml و DNase با غلظت نهایی برابر با ۱/۵ µg/ml به آن اضافه گردید. درجه تفکیک و افتراق آنزیماتیک بطور مرتب با میکروسکوپ فازکنتراست بررسی می‌شد و وقتی ۵۰ تا ٦۰ درصد سلول‌ها به واحدهای تک تبدیل شدند، کار متوقف گردید. این حالت اغلب بعد از ۱۰ دقیقه رخ می‌دهد. سوسپانسیون سلول‌های جزایر لانگرهانس سپس بلافاصله با ٤۰ ml از بافر EH رقیق شد و مجموعه در یخ گذاشته شد. سپس با عبور از یک صفحه نایلونی به قطر ٦۳ µm صاف شد و به این ترتیب مواد هضم نشده و توده‌های سلولی بزرگ حذف شدند. محلول حاصل که حاوی سلول‌های تک می‌باشد به مدت ٦ دقیقه در ۳۰۰ g سانتریفیوژ شد، رسوب مجدداً در EH سوسپانسیون شد و سانتریفیوژ گردید. رسوب سلولی را در محلول ایزوتونیک پرکول با دانسیته ۱/۰٤۰ g/ml سوسپانسیون کرده، ده دقیقه در داخل یخ قرار دادیم تا سوسپانسیون سلولی لایه لایه گردد و بدین وسیله سلول‌های مرده و از بین رفته و قطعات سلولی که طی سانتریفوژ متوالی حاصل شده بودند، حذف شوند. در نهایت لایه سوسپانسیون سلولی، سلول‌های سالم در سرم فیزیولوژیک محلول گردید (۱۰)(تصویر۳).



تصویر ۳: سلول‌های جزایر لانگرهانس موجود در سوسپانسیون سلولی که بوسیله محلول Gimsa رنگ آمیزی شده وبا بزرگنمایی ۱۰۰۰۰ برابر با میکروسکوپ Leitz عکسبرداری شده است.

فلوسایتومتری: این سیستم تکنیک جدیدی است که از طریق آن مشخصات فیزیکی و شیمیایی سلول‌ها یا هر جزء بیولوژیکی مادامی که از مقابل نور لیزر به صورت تک‌تک عبور کند، درج می‌شود. مسأله تک‌تک بودن و محلول بودن سلول‌ها در فلوسایتومتری اهمیت دارد. نمونه بایستی از ابتدا محلول باشد یا با روش‌های آنزیماتیک به صورت محلول درآید که هر بافت را با روش‌های مخصوص به خود برای این روش آماده می‌کنند. اندازه‌گیری پارامترهایی مثل اندازه، شکل، محتوای DNA ، رسپتورهای سطحی سلول، فعالیت آنزیم، نفوذپذیری غشاء و پمپ کلسیم با این سیستم میسر است. هدف ما از انجام فلوسایتومتری دستیابی به اطلاعاتی در مورد هموژنیسیته سلول‌های بتا و درصد هموژنیسیته این سلول‌ها در سوسپانسیون سلولی به دست آمده در پایان عمل تخلیص سلول‌های جزایر لانگرهانس می‌باشد. تا به این ترتیب درصد سلول‌های بتا در سوسپانسیون پیوندی معین گردد. با توجه به تفاوت قابل ملاحظه در اندازه انواع سلول‌های جزایر لانگرهانس می‌توان نمونه محلول سوسپانسیون سلولی را به سیستم فلوسایتومتر تزریق نمود و گراف مربوطه را که مشخص کننده انواع سلول‌ها و درصد آنها در سوسپانسیون می‌باشد، تهیه کرد. سلول‌های جزایر لانگرهانس تخلیص شده به روش کلاژناز با ۹۱ درصد سلول بتا در سوسپانسیون سلولی تهیه شد. (۱۱) (نمودار ۱).



نمودار ۱: منحنی توزیع سطحی حاصل از Flow Cytometery سوسپانسیون سلول‌های جزایر لانگرهانس، در فلوسایتوگرام به دست آمده یک توده سلولی هموژن با درجه خلوص ۹۱ درصد متعلق به سلول‌هایی با گرانولاریتی کمتر در بین سلول‌های جزایر لانگرهانس یعنی سلول‌های بتا موجود بود.

یافته‌ها

از آنجایی که برای درمان دیابت القا شده در موش‌های صحرایی بوسیله پیوند (Transplantation)، سوسپانسیون سلول‌های بتای ترشح کننده انسولین مورد نیاز است، این سلول‌ها از پانکراس موش‌های صحرایی سالم با روش اصلاح شده هضم کلاژنازی تهیه شدند. تهیه سلول‌های خالص جزیره لانگرهانس پانکراس موش‌های صحرایی نیازمند ترکیب عمل مکانیکی (قطعه قطعه کردن بافت‌های پانکراس) و استفاده همزمان از آنزیم‌های (تریپسین و DNase) می‌باشد، که این روش متناسب با شرایط تفکیک سلول‌های پانکراس از بافت‌های دیگر می‌باشد. افزودن DNase توده شدن سلول‌های پانکراس تفکیک و لیز شده را کاهش می‌دهد و تریپسین مانع بی‌شکل شدن سلول‌های تفکیک شده می‌گردد. ظرف به ظرف کردن باعث حذف ذرات کوچکتر و تغلیظ بخش درشت ذرات جزایر می‌شود. فیلتراسیون و انکوباسیون‌ها باعث جدا شدن سلول‌های خالص شده از سلول‌های لیز شده می‌گردد. با انجام فلوسایتومتری در واقع اثبات شد که لوب (Quadrant) سوم در منحنی توزیع سطحی به دست آمده که ۹۱ درصد از سوسپانسیون سلولی را به خود اختصاص می‌داد، منطبق با جمعیت سلولی دارای گرانولوسیته کمتر در جزایر یعنی سلول‌های بتا می‌باشد.

همچنین تشخیص دو جمعیت سلولی متفاوت جزایر از نظر اندازه مطابق با سلول‌های کوچک اندازه alpha-cells, delta-cells, pp-cells و سلول‌های بزرگ اندازه beta-cells جهت تشخیص درصد سلول‌های ترشح کننده انسولین در سوسپانسیون سلولی بودند (۱۲).

بحث

در دیابت شیرین وابسته به انسولین به طور مداوم تولید انسولین در جزایر لانگرهانس پانکراس کاهش یافته و سطح انسولین خون پایین می‌آید. تزریق انسولین طول عمر بیماران مبتلا به دیابت شیرین وابسته به انسولین را افزایش می‌دهد. اما عوارض تزریق بلند مدت انسولین به بیماران IDDM مشکل بزرگی را برای زندگی آنها ایجاد می‌کند. این بیماران ناگزیر به تزریق روزانه هستند و درد تزریق را بطور مداوم تحمل می‌کنند (۱). بیماران دیابتی که حدود ۲۰۰ میلیون نفر در دنیا هستند، با مشکلات عدیده و زیادی روبرو هستند. اگر به نحوی از این بیماری جلوگیری نشود، با افزایش سن بیماران مشکلات آنها بیشتر خواهد شد (۲،۷). بشر تا امروز به جز تزریق انسولین نتوانسته قدمی دیگر در درمان این بیماران بردارد. تزریق انسولین در واقع با تحمل درد تزریق روزانه و یا چند بار در روز نتوانسته صد در صد به درمان واقعی این بیماران کمک کند. پس علاج و نجات بشریت از این بیماری چیست؟

نتیجه‌گیری

تنها راه جدید در این عصر، پیوند سلول‌های جزایر لانگرهانس برای علاج واقعی دیابت شیرین وابسته به انسولین می‌باشد چرا که ارزان، ساده، قابل دسترس و نتیجه بخش می‌باشد. استاندارد سازی شرایط جداسازی و تخلیص سلول‌های جزایر لانگرهانس یکی از مهم‌ترین مراحل پیوند است که کاری ساده و عملی است و پس از دستیابی و تثبیت چنین روشی است که محققین خواهند توانست با پیوند جزایر لانگرهانس، بیماران دیابتی را نجات دهند و مشکل بیش از ۱/۵ میلیون نفر بیماران دیابتی ایران و ۲۰۰ میلیون نفر بیماران دیابتی جهان را برطرف سازند.

Isolation and purification of rat islet cells

Dr. Azim Akbarzadeh [1] ***, Shirin Jamshidi*** [2] ***, Ali Farhangi*** [3] ***,Dr. Behzad Lame Rad*** [4]***, Salman Bahremand*** [5]

[1] *Associate Professor of Biochemistry and head of the Pilot Biotechnology Department of Pasture Institute of Iran.*
[2] *Msc. in Biochemistry, the Pilot Biotechnology Department of Pasteur Institute of Iran.*
[3] *Msc. in Biotechnology, the Pilot Biotechnology Department of Pasteure Institute of Iran.*
[4] *Associate professor of Biochemistry, Al-Zahra University.*
[5] *Msc. in Molecule and Cell Biology*

Correspondence: Azim Akbarzadeh, Farvardin 12th st., Pilot Biotechnology Dept, Pasture Institute of Iran, Tehran, Iran
E-mail: azimakbarzadeh@pastuer.ac.ir

Received:28/01/2005 **- Accepted:**28/07/2005

Abstract

Background and Purpose: It is thought that transplantation of islet cells would cure diabetic patients in world. Islet cells transplantation in people suffering from diabetes is of technical interest. A standardized procedure was developed for the preparation of rat islet cell grafts for purification of islet cells.
***Materials and methods*:** In this process, after collagens digestion of pancreases, islets were isolated and dissociated, then with enzymatic procedure by DNase and trypsin, the islet cells changed in to single cells and these cells were assayed by flow cytometery.
Results: Flow cytometery of these cells indicated that there were 91% of beta cells in cell suspension. Most of the exocrine particles were lost during digestion.
***Conclusion*:** Purified endocrine islet cell grafts were prepared by pure beta-cells, with or without endocrine non-beta cells. The purified aggregates were devoid of non-endocrine cells and damaged cells.

***Key words*:** *Flow cytometry; Purification; Isolation; Islet cells.*

References

1. Guyton C, John E. Hall: Texbook of medical physiology. 10th ed, W B Saunders CO. Philadelphia, 2000; p. 1000.
2. Pipeleers DG, Pipeleers-Marichal MA. A method for the purification of Single A, B and D Cells and for the isolation of coupled cells from isolated Rat Islets. Diabetologia. 1981; 20: 654-663.
3. Gray DWR, Morris PJ. Developments in isolated pancreatic Islet transplantation, Transplantation 1987; 43(3): 321-331.
4. Pipeleers DG, Pipeleers-Marichal M, Hannaert JC, Berghmans M, et al. Transplantation of purified Islet Cells in diabetic Rats, Diabetes 1991; 40: 908-919.
5. Nielsen DA, Lernmark A, Berelowits M, Bloom GD, et al. Sorting of pancreatic islet cell subpopulations by light scattering using a fluorescence-activated cell sorter. 1982; 31:229-306.

6. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The New England Journal of Medicine. 1993; 329 (14): 977-985.

7. Pipeleers DG, Veld PA, Winkel MVD, Maes E, et al. A new in vitro model for the study of pancreatic A and B cells. The Endocrine Society. 1985; 117(3): 806-816.

8. Lacy PE, Kostianovsky M, Louis S. Method for the isolation of intact islets of langerhans from the rat pancreas. Diabetes 1967; 16(1): 35-39.

9. Olack BJ, Swanson CJ, Howard TK, Mohanakumar T. Improved method for the isolation and purification of human islets of langerhans using liberase TM enzyme blend. Human Immunology 1999; 60: 1303-9.

10. Winkel MVD, Maes E, Pipeleers D. Islet cell analysis and purification by light scatter and autofluorescence, Biochemical and biophysical research communications 1982; 107(2): 525-32.

11. Rabinovitch A, Russell T, Shienvold F, Noel J, et al. Preparation of rat islet B-cell-enriched fractions by light-scatter flow cytometry. Diabetes 1982; 31: 939-43.

12. Van de Winkel M, Pipeleers D. Autofluorescence activated cell sorting of pancreatic islet cells: purification of insulin-containing β-cells according to glucose-induced changes in cellular redox state, Biochemical and biophysical research communications 1983; 114(2): 835-42.