

تولید انسولین به وسیله سلول‌های بنیادی انسان

دکتر باقر لاریجانی، دکتر سید محمد اکرمی، دکتر مهسا محمدآملی

چکیده

بیماری دیابت شایع‌ترین بیماری غدد درون‌ریز است. نیاز مادام‌العمر به پایش مکرر قند خون، تزریق انسولین و محدودیت در رژیم غذایی اعمال شده برای بیمار دیابتی بسیار نامطلوب و آزاردهنده است. از سوی دیگر، درمان عوارض دیابت، بار مالی بسیاری را بر جامعه تحمیل می‌نماید. در دهه اخیر، پیوند جزایر پانکراس به عنوان یک درمان بالقوه دیابت مورد بررسی گسترده‌ای قرار گرفته است. این موضوع همواره به سبب محدودیت در تخلیص جزایر از جسد دشوار بوده است. سلول‌های بنیادی منابع قابل تجدید سلولی هستند که به عنوان جایگزین پیوند عضو یا بافت مطرح می‌شوند. امکان استفاده از سلول‌های بنیادی در درمان دیابت و تولید جزایر انسولین‌ساز، سال‌هاست که مورد توجه ویژه دانشمندان در مراکز مختلف علمی و تقریباً یکی از امیدهای آینده کنترل بیماری دیابت است. مطالعات حیوانی، سلول‌های بنیادی انسانی مشتق از ارگان‌های خون‌ساز، کبد، پانکراس و سلول‌های بنیادی انسانی جنینی برخی از این موارد هستند. در این مقاله سیر مطالعات انجام شده در این خصوص مرور می‌شود.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی انسان، تولید انسولین، سلول بتا پانکراس

دریافت مقاله: ۸۴/۱/۳۰ - دریافت اصلاحیه: ۸۴/۴/۹ - پذیرش مقاله: ۸۴/۴/۲۱

مقدمه

دیابت شایع‌ترین بیماری غدد درون‌ریز است که در تمامی کشورهای جهان از جمله ایران شیوع قابل توجهی دارد و برطبق برآورد سازمان بهداشت جهانی، این شیوع رو به افزایش است. دیابت یکی از شایع‌ترین علل نابینایی و نارسایی کلیوی در جامعه بوده، عامل بسیاری از موارد قطع اندام تحتانی، مرگ و میر ناشی از بیماری‌های قلبی و سکته‌های مغزی است. بیش از ۱۵۰ میلیون نفر در سراسر دنیا از دیابت رنج می‌برند. دیابت نوع یک (وابسته به انسولین) معمولاً در اثر تخریب سلول‌های جزایر پانکراس ایجاد می‌شود. کمبود مطلق انسولین و نیاز کامل به درمان

انسولین از ویژگی‌های دیابت تیپ یک است. ۵-۱۰٪ دیابتیک‌ها، از نوع یک هستند و سایر بیماران دیابتی (۸۵٪) از نوع تیپ II می‌باشند که البته بسیاری از آنها هم به تدریج نیازمند به تزریق انسولین می‌شوند. مطالعات اخیر جلوگیری از عوارض دیابت را نیازمند کنترل دقیق قند خون بیان می‌کنند^۱ اما کنترل جدی قند خون با انسولین و داروها در موارد زیادی دشوار خواهد بود.

نیاز مادام‌العمر به پایش روزانه مکرر قند خون، تزریق انسولین توسط بیمار و محدودیت‌های غذایی اعمال شده بسیار نامطلوب و آزاردهنده بوده، بار مالی بسیاری را بر جامعه تحمیل می‌نماید. لازم به ذکر است که با روش‌های رایج در همه نقاط دنیا کمتر از نیمی از بیماران از کنترل

مطلوب قند خون برخوردارند. واضح است که دستیابی به راهحل دیگری برای رسیدن به قند خون طبیعی، بدون خطر کاهش قند خون و بدون نیاز به تزریقات روزانه و مکرر انسولین، نیازی محسوس و واقعی است.

در کشور ما شیوع بالای دیابت (۳-۵٪ کل افراد جامعه)^{۲-۴} و هزینه‌های سنگین مراقبت از مبتلایان به دیابت نیاز به استفاده از روش‌های درمانی جدید در جهت ارتقای کیفیت زندگی بیماران را گوشزد می‌کند.

در دو دهه گذشته دو رویکرد اصلی به عنوان درمان بالقوه دیابت به ویژه نوع ۱، پیوند کل پانکراس یا سلول‌های جزیره‌ای بوده است که در جهان مورد بررسی گسترده‌ای قرار گرفته است. 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.^۵ از این رو منابع جدید برای درمان جایگزینی سلول^۶ و تولید انسولین نظیر پیوند جزایر از حیوان، استفاده از سلول‌های بنیادی و ژن یا سلول درمانی، به موازات موارد فوق مورد بررسی قرار گرفته‌اند. در این راستا استفاده از منابع قابل تجدید سلولی به عنوان جایگزین پیوند عضو یا بافت مطرح می‌گردد. سلول‌های بنیادی^۱ قابلیت تجدید نامحدود خود و تمایز به دیگر انواع سلول‌ها را دارند. در این مطالعه استفاده از سلول‌های بنیادی انسان به عنوان یک سیستم مدل برای تمایز دودمانی خاص (انسولین‌ساز) جهت درمان دیابت مرور می‌شود.

روش انتخاب

با استفاده از واژگان کلیدی سلول‌های بنیادی انسان، انسولین و پانکراس، تمامی مقالات ثبت شده در مدلاین جستجو و در جمع ۱۱۵ عنوان مقاله (در پایان آگوست ۲۰۰۴) به دست آمد. محدوده مقالات استخراج شده بین سال‌های ۱۹۹۰ تا ۲۰۰۴ بود. تمامی مقالات نامرتب با امر تمایز سلول‌های بنیادی از مطالعه حذف شد.

کلیات

بیش از بیست سال است که دانش سلول‌های بنیادی مورد توجه دانشمندان علوم زیستی قرار گرفته است. در سال ۱۹۹۸ نحوه جداسازی و رشد سلول‌های بنیادی انسان

i- Stem cell

منتشر شد. سلول‌های بنیادی در درمان بسیاری از بیماری‌ها نظیر بیماری‌های قلبی - عروقی، اعصاب، خون و نازایی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. اطلاعات بیشتر در زمینه تاریخچه و مرور کاربردی این علم جدید در نشانی الکترونیک <http://stemcells.nih.gov> قابل دستیابی است. دیابت به عنوان یکی از کاربردهای اولیه درمان با این سلول‌ها مطرح شده است.

پانکراس بالغ دارای سه ساختار مجزا از نظر شکل و فیزیولوژی است: اگزوکراین، اندوکراین و مجاری. بخش اندوکراین (حدود ۱٪ کل توده پانکراس) شامل چهار نوع سلول جزیره‌ای است که مهمترین نوع آنها سلول‌های بتای (۶۰-۸۰٪) مولد انسولین می‌باشند. تکامل جنینی پانکراس از دو بخش اندودرم (فورگات و دورسال) صورت می‌گیرد. این امر نتیجه چندین مکانیسم جدا از هم است که در کنار یکدیگر عمل می‌کنند و فاکتورهای رشد، واکنش‌های اپیتلیال - مزانشیمال و ماتریکس خارج سلولی در آن نقش دارند.^۶

سلول‌های بنیادی را به دو نوع جنینی (مشتق از توده سلولی داخلی (ICM)ⁱⁱ یک بلاستوسیست) و بالغ (یافته شده در یک ارگانیسیم پس از زایمان) می‌توان تقسیم نمود. به طور کلی برای تولید سلول بتا از سلول‌های بنیادی یک فرایند سه مرحله‌ای باید رخ دهد: تمایز هدایت شده،ⁱⁱⁱ انتخاب دودمان سلولی^{iv} و رشد و بلوغ.^v

در مرحله نخست، یک نوع سلول چند قابلیت^{vi} تمایز نیافته مثل سلول بنیادی جنینی (ES)^{vii} یا سلول زایای جنینی (EG)^{viii} انتخاب می‌شود. یافتن شرایط مناسب در جهت افزایش پیش‌سازهای جزیره‌ای از نکات مهم در این بخش است. سپس سیستمی جهت افتراق و انتخاب سلول بتا از سایر سلول‌ها، براساس بیان^{ix} انسولین طراحی می‌گردد. در مرحله نهایی، استراتژی‌های مختلف برای بررسی تأثیر بر پرولیفراسیون و تمایز سلولی مطالعه می‌شود.

به منظور بررسی نتیجه مطالعه، علاوه بر فنوتیپ سلول نهایی، رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی (IHC)، بیان mRNA انسولین و گلوکاگون و تولید انسولین به طور خودبخودی و

ii- Inner cell mass

iii- Directed differentiation

iv- Cell-lineage selection

v- Maturation

vi- Multipotent

vii- Embryonic stem cell

viii- Embryonic germ cell

ix- Express

فراهم نمودن شرایط مناسب برای تمایز^{iv} رده‌های مختلف سلولی، با هدایت به سمت مسیرهای از پیش انتخاب شده به رده‌های سلولی خاص مورد نظر تمایز و تکامل می‌یابند.

از آنجایی که بین مسیر تکاملی پانکراس (با منشأ اندودرم) و سیر تکاملی دستگاه اعصاب مرکزی (با منشأ اکتودرم) شباهتهایی به چشم می‌خورد، در تحقیقات متعدد سعی شده تا سلول‌های بنیادی جنینی ابتدا به سمت سلول‌های عصبی هدایت شده سپس با انجام دستکاری‌های ژنتیکی و مداخلاتی نظیر تغییر شرایط محیط کشت یا افزودن فاکتورهای رشد سرانجام بتوان به سلول‌های بتای جزایر پانکراس دست یافت.

در این زمینه و از میان مطالعات مختلف انجام شده بر روی سلول‌های بنیادی جنینی موش و تبدیل آنها به سلول‌های تولید کننده انسولین، مطالعه لاملسکی و همکاران^v یکی از مطالعاتی است که مورد استناد گروه‌های مختلف بوده است. در این مطالعه براساس شباهت‌های بین مکانیسم کنترل تکاملی دستگاه عصبی مرکزی و پانکراس، از روش‌های تولید «نورون» برای تبدیل سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های پانکراس استفاده شده است.

یکی از مراحل اولیه تمایز سلول‌های عصبی از سلول‌های بنیادی جنینی، حضور سلول‌های نستین مثبت^v در بین سلول‌های در حال تمایز است.^{vi} حضور این سلول‌ها در میان سلول‌های نابالغ پانکراس نیز گزارش شده است^{vii} که پس از تمایز قادر به تولید انسولین و نیز گلوکاگون بوده‌اند؛^{viii} بنابراین در مطالعه لاملسکی و همکاران سعی بر این بوده که از جمعیت سلول‌های نستین مثبت مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی برای تولید سلول‌های انسولین‌ساز استفاده شود.^{ix} ابتدا سلول‌های جنینی موش در محیط کشت بدون سرم که باعث افزایش درصد سلول‌های نستین مثبت می‌شود، تکثیر شده است. سپس فاکتور رشد BFGF^{vi} به محیط کشت افزوده شده و نهایتاً با اضافه کردن فاکتورهای دیگر و دستکاری‌های محیط کشت، توده سلولی با ساختار شبیه به جزایر پانکراس حاصل شده است به نحوی که سلول‌های حاوی انسولین در وسط توده و سلول‌های حاوی گلوکاگون^{vii} در حاشیه این توده مشاهده شدند.

در پاسخ به آزمون‌های تحریکی با تزریق گلوکز مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرند. این سلول‌های تمایز یافته باید به طور فعال انسولین تولید و ترشح نمایند و تولید مقداری انسولین در محیط کشت کافی نخواهد بود.

سلول‌های بنیادی جنینی

سلول‌های بنیادی جنینی قابلیت منحصر به فردی در تبدیل به رده‌های مختلف سلول‌های بالغ دارند. این توانایی ویژه سلول‌های بنیادی جنینی سبب شده تا طی سالیان اخیر امکان استفاده از این سلول‌ها برای جایگزینی سلول‌های آسیب‌دیده یا از بین رفته در روند بیماری‌ها مورد تأمل و بررسی قرار گیرد.

سلول‌های بنیادی جنینی از لایه داخلی توده سلولی (ICM) موجود در بلاستوسیست‌ها (پیش از کاشته شدن در جدار رحم) به دست آمده^v و تاکنون استحصال این سلول‌ها از گونه‌های مختلف پستانداران همچون جوندگان، پریمات‌ها و انسان ممکن شده است.^{vi}

روش دیگری که برای به دست آوردن سلول‌های بنیادی جنینی به کار می‌رود، انتقال هسته سلول‌های سوماتیک به تخمک‌های بدون هستهⁱ یا روش کلونینگⁱⁱ است، اگرچه در مورد ملاحظات اخلاقی استفاده از این روش در سلول‌های انسانی هنوز بحث‌ها و اختلاف نظرات زیادی وجود دارد.ⁱⁱⁱ تعداد مطالعاتی که با هدف مساعد نمودن شرایط کشت سلول‌های بنیادی جنینی و یا دستکاری‌های ژنتیکی بر روی این سلول‌ها به منظور تبدیل آنها به سلول‌های مناسب برای پیوند و جایگزینی سلول‌های صدمه دیده در بیماری‌های مختلف انجام شده بسیار چشمگیر است. در این زمینه مطالعات متعددی نیز بر روی تولید سلول‌های جزیره‌ای پانکراس با منشأ سلول‌های بنیادی جنینی صورت گرفته است.

مطالعات انجام شده بر روی سلول‌های جنینی با منشأ حیوانی

سلول‌های بنیادی جنینی موش وقتی در معرض LIFⁱⁱⁱ قرار می‌گیرند به صورت تمایز نیافته رشد می‌یابند و پس از

iv- Differentiation

v- Nestin positive

vi- Basic Fibroblasts growth factor

vii- Islet like cluster

i- Enucleated oocytes

ii- Cloning

iii- Leukemia inhibitory factor

مطالعه گروه لاملسکی^{۱۰} با اندک تغییراتی توسط گروه‌های دیگر تکرار شد؛^{۱۴-۱۶} اما در مطالعه راجاگوپال^{۱۴} اگرچه نتایج مشابه حاصل شد، ولی یک نکته مهم مورد توجه قرار گرفت که جذب انسولین از محیط کشت می‌تواند باعث رنگ‌آمیزی مثبت سلول‌ها با آنتی‌بادی علیه انسولین شده در نتیجه باعث اختلال در تعیین درصد صحیح سلول‌های حاوی انسولین و حصول نتیجه مثبت کاذب گردد. این نکته در مطالعات پیش از مطالعه راجاگوپال مدنظر قرار نگرفته بود. بنابراین سنجش مقدار پپتیدیسی^۱ و همچنین بررسی بیان ژن انسولین به روش RT-PCR^{۱۱} برای تأیید تولید انسولین توسط سلول‌های تمایز یافته، در کنار دیگر آزمایش‌های ایمونوهیستوشیمی (IHC) برای اندازه‌گیری مقدار انسولین داخل سلولی ضروری شناخته شد.

این نکته در تحقیقات پس از این مطالعه که به تولید سلول‌های انسولین‌ساز با منشأ سلول‌های بنیادی پرداخته‌اند مورد ملاحظه قرار گرفت. همچنین در برخی از مطالعات انجام شده سلول‌های انسولین‌ساز حاصل شده به موش دیابتی پیوند زده شد.^{۱۵} پیوند این سلول‌ها در زیر کپسول کلیه موش دیابتی تا حدی قادر بود هاپیرگلیسمی خفیف را کنترل نماید که پس از نفرکتومی و برداشت سلول‌های پیوند شده، هاپیرگلیسمی دوباره برگشت‌پذیر بود.

مطالعه پانکراس جنین انسان نشان داده که ماده‌ای به نام PI3K که مهارکننده فسفواپتید کیناز^{۱۱} است، قادر به تقویت تکامل سلول‌های پانکراس جنین بوده باعث افزایش تولید انسولین می‌شود.^{۱۷} تأثیر PI3K بر افزایش میزان تولید انسولین در سلول‌های تکثیر یافته از سلول‌های نستین مثبت قابل توجه بوده است.^{۱۵} تنها مشکل بازدارنده، اثر بسیار سمی PI3K بر سلول‌های موش و تأثیرات شدیدتر آن بر سلول‌های انسان است.

سیپیون و همکاران^{۱۸} سعی بر تکرار مطالعات انجام شده توسط لاملسکی^{۱۰} و راجاگوپال^{۱۴} داشتند اما آنها به این نتیجه رسیدند که اگرچه در این مطالعه سلول‌های تولید کننده انسولین شاخص‌های ویژه‌ای همچون تولید فاکتورهای نسخه‌برداری لازم در فرآیند تکامل پانکراس و نیز بیان ژن pdx1 (که نقش مهمی در انترورژن پانکراس و عملکرد فیزیولوژیک سلول‌های بتای تکامل یافته دارد) را نشان

دادند، احتمال آنکه فاکتورهای نسخه‌برداری و بیان ژن pdx1 در زمینه تکامل دستگاه عصبی تولید شده باشند قابل نفی نیست. در این زمینه توجه به این نکته که بیان ژن انسولین در نتیجه کشت سلول‌های عصبی و نیز در بعضی بافت‌های عصبی مشاهده شده، حائز اهمیت است.^{۱۹،۲۰} و در این ارتباط نقش‌هایی نیز برای انسولین در تکامل سیستم عصبی قائل شده‌اند.

یکی دیگر از قابلیت‌های سلول‌های بنیادی جنینی توانایی تمایز خود به خودی این سلول‌ها به رده‌های مختلف سلولی است. در این زمینه گروه‌های متعددی تحقیق نموده‌اند^{۲۱،۲۲} که در نتیجه تمایز خود به خود سلول‌های بنیادی جنینی موش در محیط کشت، سلول‌های انسولین‌ساز با ظرفیت بالای تولید انسولین حاصل شد که تزریق توده‌هایی از این سلول‌ها به طحال موش دیابتی باعث تنظیم سطح گلوکز خون در ۲۱ موش دیابتی گردید. با گذشت ۱۶ هفته این وضعیت در ۱۵ موش همچنان ادامه داشته است.^{۲۲} البته چنین یافته‌های امیدوارکننده‌ای، در مطالعات پس از آن گزارش نشد.^{۲۳}

سلول‌های بنیادی جنینی میمون^{۱۷} نیز با روش تمایز خود به خودی سلول‌ها به سلول‌های تولید کننده انسولین تبدیل شده‌اند^{۲۴} که در این روش برای تمایز و تکامل سلول‌ها از فاکتور رشد بتاکستندین-۴^{۲۴} استفاده شد. همچنین برای تأیید تولید انسولین توسط سلول‌های تولید شده از سلول‌های بنیادی جنینی، سنجش مقدار پپتید سی مورد ارزیابی شد.

مطالعات انجام شده بروی سلول‌های بنیادی جنینی با منشأ

انسانی

از زمانی که نخستین گزارش تولید و تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسان منتشر شد^{۲۵} تاکنون مطالعات زیادی در این زمینه انجام شده و تولید رده‌های مختلف سلول‌های بنیادی جنینی و روش‌های متعدد برای تکثیر سلول‌های بنیادی جنینی تمایز یافته گزارش شده است. بیشتر این یافته‌ها بر مبنای یافته‌های حاصل از مطالعه بر سلول‌های بنیادی جنینی موش و سایر حیوانات طی ۲۰ سال گذشته است.^{۲۶}

iv- Rhesus monkey

v- Extending-4

i- C-peptide

ii- Reverse transcriptase polymerase chain reaction

iii- Phosphoinositide kinase

محیط کشت افزوده شد. تکثیر سلول‌های حاصل به صورت سوسپانسیون سلولی باعث تشکیل توده سلولی شبیه به جزایر پانکراس گردید که قادر به تولید انسولین بیشتری نسبت به مطالعات قبلی بودند. از آنجا که بیان ژنهایی که به طور نسبتاً اختصاصی تنها در بافت پانکراس بیان می‌شوند، در توده سلولی به دست آمده نیز وجود دارد و با روش-RT PCR تأیید شده است، می‌توان گفت اعتبار این ادعا که سلول‌های به دست آمده از نظر انتروژنیک ماهیتی بسیار مشابه (اگر نه کاملاً مشابه) با سلول‌های بافت پانکراس دارند، بیشتر می‌شود. همچنین توسط آزمایش‌های اختصاصی درصد بالایی از سلول‌های حاوی انسولین در این توده سلولی مشاهده شد و سلول‌های حاوی گلوکاگون و سوماتواستاتین نیز قابل رؤیت بوده‌اند.

مطالعات انسانی انجام شده بر روی سلول‌های بنیادی تکامل یافته

بیشتر مطالعات انسانی با استفاده از سلول‌های بنیادی مجرا و کبد بزرگسالان و نیز سلول‌های بنیادی جنینی بوده است. در یک مقاله مروری اخیراً مطالعات تولید سلول‌های انسولین‌ساز از سلول‌های بنیادی در ۵ سال اخیر مورد نقد و بررسی قرار گرفته است.^{۲۹} این مطالعه مواردی را که منجر به نتایج مثبت کاذب یا اشتباه در تفسیر نتایج می‌گردد را پررنگ نموده است. توجه به این نکته ضروری است که کاهش در هیپرگلیسمی در اثر ترشح انسولین از سلول‌های پیوند شده یا در اثر برگشت عملکرد جزایر موجود از قبل است.

براساس جستجوی ما، مطالعه اسدی و همکاران در سال ۲۰۰۱ اولین مطالعه چاپ شده است که به تولید انسولین از سلول‌های بنیادی جنینی انسان می‌پردازد.^{۲۷} مطالعه مشابهی در انسان توسط راجاگوپال و همکاران در سال ۲۰۰۳ انجام شد که در مجله ساینس به چاپ رسید.^{۱۴} مقاله سال ۲۰۰۴ در مجله لانست مروری بر تمامی کارهای انجام شده در این موضوع بود. این مطالعه ضمن اشاره به مطالعات گذشته بر انجام موفق تمایز سلول‌های بنیادی به سلول بتا تأکید داشت.^{۳۰}

مطالعه گروه کانادایی در سال ۲۰۰۴ اذعان می‌نماید که سلول‌های بنیادی متمایز شده در برخی مطالعات که انسولین را بیان می‌نمایند در حقیقت نوروئید هستند.^{۱۸} در سال ۲۰۰۴

سلول‌های بنیادی جنینی انسان قادرند تحت شرایط مناسب در محیط کشت به سلول‌های انسولین‌ساز تبدیل شوند. یکی از تفاوت‌های سلول‌های بنیادی جنینی انسان با موش در این است که LIF باعث تکثیر تمایز نیافته سلول‌های بنیادی جنینی موش می‌گردد ولی بر روی سلول‌های بنیادی جنینی انسان مؤثر نیست. برای تکثیر تمایز نیافته، سلول‌های بنیادی جنینی انسان باید بر روی یک لایه سلولی تغذیه کننده قرار گیرند. پس از اینکه سلول‌های بنیادی جنینی انسان روی فیبروبلاست‌های جنینی موش (MEF)ⁱⁱ به عنوان لایه تغذیه کننده قرار می‌گیرند، به صورت کولونی‌های تمایز نیافته رشد نموده در صورت جدا شدن از MEF و قرار گرفتن در محیط‌های دیگر کشت، به سمت رده‌های مختلف سلولی تمایز می‌یابند.

برای تولید رده‌های مختلف سلول‌های بنیادی جنینی، کولونی‌های در حال رشد بر روی لایه تغذیه کننده سلولی با استفاده از روش‌های مکانیکی جدا شده و برای تولید کولونی‌های دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرند که این مرحله با انجام فرآیندهای تکثیر، انجماد و سرانجام تولید رده‌های جدید سلول‌های بنیادی انسان همراه است. این فرآیند بسیار زمانبر بوده و موفقیت در تولید رده‌های جدید سلول‌های بنیادی جنینی انسان نیاز به تجربه فراوان در این زمینه دارد. در مطالعه اسدی و همکاران،^{۲۷} سلول‌های بنیادی جنینی انسان (رده سلولی H9) بر مبنای خاصیت تمایز خود به خودی سلول‌های بنیادی جنینی، طی روش‌های متعدد و محیط‌های مناسب کشت سلولی به سلول‌های شبیه به سلول‌های بتای پانکراس، به ویژه با توانایی تولید و ترشح انسولین تبدیل شده‌اند. در مطالعه دیگری که اخیراً توسط همین گروه انجام شده، شیوه جدیدی برای تشکیل توده سلولی شبیه به جزایر پانکراسⁱⁱⁱ و تولید سلول‌های انسولین‌ساز از سلول‌های بنیادی جنینی انسان به کار گرفته شده است.^{۲۸} در این روش جسم جنینی^{iv} حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی در محیط حاوی انسولین - ترانسفرین - سلنیوم و فیبرونکتین کشت داده شد و سپس موارد دیگری از قبیل N2 و B27 و BFGF به محیط اضافه گردید. سرانجام غلظت گلوکز در محیط کشت کاهش داده شد و نیکوتینامید به

i- Feeder layer

ii- Mouse embryonic fibroblasts

iii- Islet like cluster

iv- Embryoid bodies

در مجله سلول‌های بنیادی گروه دیگری تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسان به خوشه‌های مولد انسولین را اعلام نمودند.^{۲۸} مقاله سال ۲۰۰۴ مجله NEJMⁱ استفاده از رده‌های جدید سلول‌های بنیادی انسان را پیشنهاد می‌نماید.^{۳۱} گروهی از محققان کره‌ای در همایش سالانه سلول‌های بنیادیⁱⁱ جولای ۲۰۰۴ بوستون، تولید توده سلولی که برخی از سلول‌های این توده حاوی انسولین بوده‌اند از سلول‌های بنیادی جنینی انسان را اعلام نمودند. در این گزارش اذعان شده که تولید انسولین خود به خودی بوده و در پاسخ به گلوکز (تست تحریکی) نبوده است.

سلول‌های بنیادی جنینی انسان

سلول‌های بنیادی جنینیⁱⁱⁱ سلول‌های کلونوژنیک هستند که قابلیت به تجدید و تمایز چند نسلی دارند. سلول‌های بنیادی جنینی انسان (hES) قابلیت پرولیفراسیون در کشت و تمایز به هر سه لایه زایای جنینی را در محیط آزمایشگاهی و محیط زنده دارند.

بیولوژی سلول‌های بنیادی زمینه جدیدی است که توانایی تولید انبوه سلول‌های بتای پانکراس را در آزمایشگاه دارد. مطالعه اسدی نشان داد مدل تمایز پیچیده سلول‌های hES شامل گروهی از سلول‌هاست که بسیاری از ویژگی‌های عملکردی سلول بتا (تولید پیش انسولین و انسولین و آزاد کردن انسولین، بیان سایر مارکرهای سلول بتا) را دارد.^{۳۷}

ابزار سلول درمانی جدید شامل شناسایی سلول‌های پیش‌ساز جزایر و تکامل مارکرهای آنتی ژن جدید برای این سسلول‌هاست. از ژن‌های کلیدی Pdx1 است که یک عامل رونویسی هومئودومین^{iv} است و برای تنظیم بیان ژن انسولین و تمایز پانکراس بالغ ضروری است. این ژن در تمام سلول‌های پیش‌ساز اولیه پانکراس بیان می‌شود ولی در پانکراس بالغ فقط در سلول بتا رونویسی می‌شود. در مطالعه‌ای، در موش با کمبود Pdx1، پانکراس تکامل نیافت.^{۳۲}

دو مکانیسم اصلی افزایش توده سلول بتا در اواخر دوره جنینی (کپی برداری از سلول‌های بتای موجود و تمایز از اپی‌تلیوم مجرای پانکراس)، در دوران بلوغ نیز وجود دارند.^۵

این مکانیسم ممکن است در تنظیم میزان توده جزایر در بزرگسالان نقش داشته باشد.^{۳۳}

گروه بزرگی از پروتئین‌ها به عنوان نشانگرهای (مارکرهای) بالقوه برای پیش‌سازهای جزایر پیشنهاد شده‌اند. فاکتورهای خارج پانکراسی مؤثر بر پرولیفراسیون و تمایز سلول β نیز فهرست بلندی دارند.^۶

سلول‌های بنیادی مشتق شده از اندام‌های خون‌ساز

سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک مغز استخوان^v سلول‌های کلونوژنیک هستند که قادر به تجدید و تمایز چند نسلی‌اند. سلول‌های بنیادی انسان قابلیت پرولیفراسیون در کشت و تمایز به هر سه لایه ژرم جنینی در محیط آزمایشگاهی و محیط زنده را دارند. این سلول‌ها پس از ورود به کبد، روده، پوست، ریه، عضله اسکلتی، عضله قلب و دستگاه اعصاب مرکزی به سلول‌های پارانشیمی تبدیل شده‌اند^{۳۴} که هم در مدل‌های حیوانی و هم در گیرنده‌های انسانی مغز استخوان یا پیوند عضو^{۳۵،۳۶} دیده شدند. در مطالعه تیز و همکاران از سلول مغز استخوان انسان، سلول کبدی تمایز یافت.^{۳۵}

در یک مطالعه تمایز مستقیم یک تا دو ماه پس از پیوند مغز استخوان، سلول‌های مشتق از دهنده در جزایر پانکراس موش‌های گیرنده یافت شد.^{۳۷} البته فقط ۱-۳٪ سلول‌های جزایر، از مغز استخوان پیوند شده منشأ گرفته بودند. در مطالعه جیانگ و همکاران^{۳۸} سلول‌های بنیادی مزانشیم مشتق شده از مغز استخوان بالغ خاصیت تمایز چندگانه^{vi} را نشان دادند. با پیوند مغز استخوان، تمایز سلول‌های مشتق شده در جزایر به سلول‌های اندوتلیال دیده شد. این سلول‌های اندوتلیال به سلول‌های اجدادی پانکراس میزبان سیگنال می‌فرستند و تمایز آنها را تحریک می‌کنند. بدین ترتیب سطح قند خون و انسولین موش‌های دیابتی طبیعی گزارش گردید و موش‌ها بقای بهتری نشان دادند.^{۳۹}

تخریب ایمونولوژیک سلول‌های بتای تازه تولید شده در بیماران دیابت نوع یک همچنان یک مشکل جدی است. موش دیابتی غیر چاق (NOD) یک مدل حیوانی دیابت نوع یک اتوایمیون است. پیوند مغز استخوان میکروکیمیرسم را القا می‌نماید. چنانچه مغز استخوان قبل از ایجاد دیابت اتوایمیون تزریق شود، کیمیرسم از دیابت جلوگیری می‌کند که احتمالاً

i- New England Journal of Medicine

ii- International Society for Stem Cell Research

iii- Embryonic stem cells

iv- Homeodomain transcription factor

v- Hematopoietic stem cells

vi- Pluripotency

ITSⁱⁱ برای ۷-۱۴ روز و سپس پوشش سلول‌ها با یک ماتریکس خارج سلولی برای ۷-۱ هفته موفق بوده است؛^{۴۷} اما محدودیت اصلی این روش، تعداد محدود سلول‌های قابل کشت از پانکراس انسان است. لذا hES جایگزین مناسب‌تری به نظر می‌رسد.

محدود بودن ظرفیت توسعه جزایر موجب دشواری استفاده بالینی آنها می‌گردد زیرا میزان توده جزایر پیوند شده، عامل مهم تعیین کننده رسیدن به مرحله عدم نیاز به تزریق انسولین است.^{۵۰} تقریباً ۲۵٪ مواد پیوند شده در پروتکل پیوند جزایر ادمونتون،^{۵۰} سلول‌های مجرا هستند. در این مطالعه تخلیص سلول‌های جزایر بتا از جسد و پیوند آن به بیماران دیابتی منجر به بهبود دیابت شد. احتمال تمایز و بلوغ این سلول‌ها در زمان پیوند به گیرنده دیابتی، نیاز به بررسی بیشتر دارد.

القای تمایز خارج سلولی مشتقات اندودرم و به ویژه سلول‌های ترشح کننده انسولین (برخلاف رده‌های اریترئوئید یا لنفوئید) دشوارتر به نظر می‌رسد.^{۵۱} سلول‌های بنیادی کبد جوندگان و سلول کبدی جنینی انسان در محیط آزمایشگاه با روش‌های مختلف کشت یا معرفی ژنهای خاص سلول بتا به سلول‌های تولید کننده انسولین تمایز یافته‌اند.^{۵۲} در مطالعه زالمن^{۵۳} هیپرگلیسمی موش با استفاده از تمایز سلول‌های اجدادی کبد جنینی انسان به سلول‌های قابل توسعه مولد انسولین بهبود یافت. با استفاده از روش معرفی ژن‌های خاص سلول بتا (تکنیک تحویل ژنی اندوویروس) در محیط زنده، در مطالعه میور- لوی^{۵۴} و کوچیما^{۵۵} در جوندگان، سلول‌های داخل کبدی به سلول‌های ترشح کننده انسولین تمایز یافتند. این مطالعات موفقیت آمیز بود و به بهبود مدل‌های حیوانی برای زمان طولانی منجر شد.

با توجه به تکامل کبد و پانکراس از نواحی کنار هم اندودرم در دوره جنینی، در مطالعه اخیر هورب و همکاران با استفاده از بیان مقادیر زیاد ژن Pdx1ⁱⁱⁱ در سلول‌های کبد قورباغه، بافت پانکراس ترشح کننده انسولین تولید شد.^{۵۶} مطالعه اخیر دُر با استفاده از تکنیک علامت گذاری ژنتیک در موش در وجود سلول‌های اجدادی بتا و تمایز آنها تردید ایجاد کرد و پیشنهاد کرد که سلول‌های بتای بالغ پانکراس

با مکانیسم‌هایی تداخل سلول‌های تنظیم ایمنی دهنده را به همراه دارد و منجر به پیشگیری سلول میزبان از پاسخ ایمنی به سلول‌های بتا می‌شود.^{۲۰} در مقابل، در موش‌های NOD که قبلاً دیابتی شده‌اند، پیوند مغز استخوان و القای کیمیرسم منجر به بهبود دیابت نگردید.^{۴۰} جالب است که موش‌های دیابتی پیوند مغز استخوان شده وقتی تحت درمان با انسولین قرار گرفتند، سطح قند خون طبیعی پیدا کردند و سرانجام از دیابت بهبود یافتند که به نظر می‌رسد در اثر افزایش فعالیت پرولیفراتیو بافت پانکراس و تولید دوباره سلول بتا باشد.

در مطالعه کوداما، پیوند سلول‌های مزانشیمال طحال منجر به تمایز به سلول‌های بتا گردید. در شرایط خاص سلول‌های پیوندی مزانشیمال طحال احتمالاً تخریب ایمنی جزایر را در کنترل دارند.^{۴۱} در مطالعه جیانگ و همکاران^{۳۸} و جار^{۴۲} سلول‌های مغز استخوان در محیط آزمایشگاه به سلول‌های بیان کننده انسولین در شرایط کنترل شده تبدیل شدند. این سلول‌ها در زیر کپسول کلیه جوندگان دیابتی تزریق شد و قند خون کنترل شد. خارج کردن کلیه پیوندی منجر به دیابتی شدن حیوان شد.^{۴۳} پیوستگی سلولی^۱ به عنوان مکانیسم احتمالی تطابق سلول مشتق شده از مغز استخوان به یک شکل خارج مغز استخوانی پیشنهاد شده است.^{۴۴،۴۵} که توسط سایر مطالعات رد شده است.

سلول‌های بنیادی در پانکراس و کبد

در بافت پانکراس جدا شده، سلول‌های اجدادی پانکراس می‌توانند تبدیل به سلول جزایر اندوکرین شوند. سلول‌های مجاری پانکراس جوندگان و انسان در مطالعه رامیا^{۴۶} و بونر- ویر^{۴۷} و نیز سلول‌های مشتق شده از جزایر در مطالعه تیتلمن^{۴۸} و زولوسکی^{۴۹} و بافت اگزوکراین در مطالعه لیپست^{۴۹} دارای سلول‌هایی بودند که توانایی تمایز به اندوکرین پانکراس را داشتند.

اخیراً سلول‌های جزیره‌ای از سلول‌های بنیادی مجرای پانکراس انسان در محیط آزمایشگاه تولید شده‌اند.^{۴۷} سلول‌های مجرای پانکراس بالغ به چهار نوع سلول جزیره‌ای متمایز شده‌اند. در مطالعه‌ای کمک به تمایز سلول‌های مجرای پانکراس به جزایر در آزمایشگاه، با استفاده از روش اضافه کردن عامل رشد گراتینوسیت، نیکوتینامید و محیط کشت

ii- Insulin + transferrin + selenium

iii- Gene overexpression

i- Cell fusion

فقط از پرولیفراسیون سلول‌های بتای موجودⁱ دوباره تولید می‌شوند.^{۵۷}

جمع‌بندی و نتیجه‌گیری

تولید سلول‌های انسولین‌ساز با منشأ سلول‌های بنیادی یکی از راه‌هایی است که در سالهای اخیر برای درمان دیابت تیپ ۱ و ۲ مورد توجه دانشمندان واقع شده است. در این زمینه، هر دو نوع سلول بنیادی جنینی و تکامل یافته توسط گروه‌های مختلف تحت مطالعه و بررسی قرار گرفته و نتایج به دست آمده در مجلات معتبر علمی دنیا منتشر شده است. تولید سلول‌های بالغ با عملکرد مطلوب فیزیولوژیک و همچنین دستیابی به جمعیتی خالص از این سلول‌ها که برای پیوند مورد نیاز است، چالشی است که هم‌اکنون پیش روی دانشمندان است. برای چیره شدن بر این نقص، درک کاملی از بیولوژی سلول‌های تمایز نیافته به همراه بررسی نقش ژن‌ها در عملکرد سلول‌های بنیادی جنینی لازم است. مطالعه سیر تکاملی جزایر پانکراس در انسان به دلیل اینکه پدیده‌های سلولی و مولکولی که در تکامل پانکراس روی می‌دهند نامعلوم است، تاکنون موفقیت‌آمیز نبوده است. در اکثر مطالعات انجام شده سعی بر آن بوده تا با استفاده از شیوه‌های نوین، سلول‌های بنیادی در مسیر تکاملی خود به غیر از آنچه در بدن انسان روی می‌دهد تکامل یافته یا تمایز پیدا کنند و به سلول‌های انسولین‌ساز تبدیل شوند. از آنجا که این مطالعات در محیط آزمایشگاه *vitro* انجام می‌گیرد، یافته‌های مربوط کاملاً قابل تعمیم به شرایط محیط زنده نیست نمی‌باشند. همچنین در این مطالعات این احتمال وجود دارد که نتایج کاذب بوده و تنها نوعی محصول ساختگی باشند که به دلیل شرایط خاص مثلاً محیط‌های کشت سلولی ایجاد شده‌اند.

بنابر یافته‌های موجود توانایی سلول‌های بتای جزایر پانکراس در کنترل و تنظیم قند خون به صورت مستقل و بدون حضور و کمک سایر سلول‌های جزایر پانکراس مورد تردید است. مطالعات و فعالیت‌های صورت گرفته بر سلول‌های با منشأ غیر از پانکراس از جمله سلول‌های بنیادی به منظور القای هدفمند آنها عملاً در بیشتر مطالعات منجر به تشکیل یک توده سلولیⁱⁱⁱ متشکل از سلول‌های مختلف

می‌گردد. تمایز این توده سلولی با جزایر پانکراس از نظر کارکرد تنها با استفاده از آزمایش‌های مربوط به رفتار و عملکرد این سلول‌هاⁱⁱⁱ قابل تشخیص است.^{۲۹}

در حال حاضر آزمایش دقیقی که قادر به مقایسه معناداری بین سلول‌های انسولین‌ساز حاصل از روش‌های توصیف شده و سلول‌های پانکراس طبیعی (جزایر) باشد وجود ندارد و این یکی از مواردی است که باید مورد بحث و مطالعه بیشتر قرار گیرد.^{۵۸}

در مجموع مروری بر مقالات نشان می‌دهد با وجود اینکه تولید سلول‌های انسولین‌ساز هم با منشأ سلول‌های بنیادی جنینی انسان و هم با منشأ سلول‌های بنیادی تکامل یافته، توسط مراکز مختلف علمی دنیا گزارش شده است، از نقطه نظر درمانی هنوز راه زیادی برای تولید سلول‌های انسولین‌ساز که به تحریک گلوکز حساس باشند و عملکرد فیزیولوژیک مشابه سلول‌های بتای پانکراس نشان دهند در پیش روی محققان این علم قرار دارد.

در یک جمع‌بندی کلی به نظر می‌رسد هرچند درمان دیابت به روش جایگزینی سلولی نیاز به کسب مهارت‌های جدیدی برای غلبه بر سیستم‌های تنظیم سلولی در انسان دارد، از نظر دانشمندان، این هدف دور از دسترس نیست و چه بسا که در سال‌های نه چندان دور شاهد تحقق این مهم باشیم.

در پایان ذکر این نکته ضروری به نظر می‌رسد که با توجه به اینکه فعالیت‌های صورت گرفته در حوزه تولید سلول‌های انسولین‌ساز نسبتاً نوین است، هنوز زمان کافی از شروع این دسته از تحقیقات نگذشته تا محققان بتوانند جزئیات بیشتری را کنکاش کنند. تاکنون بیشتر مقالات منتشر شده در این قلمرو حاصل تلاش‌های موازی و مشابهی بوده که مجال آن را نیافته‌اند تا با تقسیم موضوع مورد تحقیق به نظرات جزئی‌تر و تخصصی‌تر، بررسی همه‌جانبه‌ای را در این زمینه به عمل آورند.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از سرکار خانم دکتر فاطمه بندریان به جهت ویراستاری مقاله تقدیر و تشکر می‌نمایند. این مقاله بخشی از پروژه مصوب مرکز تحقیقات غدد درون ریز و

iii- Functional tests

i- Self duplication
ii- Islet like cluster

متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران با حمایت مالی شبکه پزشکی مولکولی کشور است.

References

1. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med*. 1993 30;329(14):977-86.
2. Azizi F. Diabetes in the Islamic Republic of Iran. *IDF Bulletin* 1996; 41:38-9.
3. Larijani B, et al. The prevalence of non-insulin dependent diabetes mellitus in Tehran. 19th Joint Meeting of British Endocrine Societies, Birmingham, UK, March 13-16, 2000.
4. لاریجانی باقر، زاهدی فرزانه. همگیرشناسی دیابت. دیابت و لپید ایران، دوره ۸، شماره ۱، ۱۳۸۰، صفحات ۱ تا ۸.
5. Soria B, Skoudy A, Martin F. From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2001;44(4):407-15
6. Soria B. In-vitro differentiation of pancreatic beta-cells. *Differentiation*. 2001;68(4-5):205-19.
7. Sharkey S, Callan RJ, Mortimer R, Kimberling C. Reproductive techniques in sheep. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2001;17(2):435-55, viii.
8. Bishop AE, Buttery LD, Polak JM. Embryonic stem cells. *J Pathol*. 2002;197(4):424-9.
9. Stix G. Stem cells. What clones? Widespread scientific doubts greet word of the first human embryo clones. *Sci Am*. 2002 ;286(2):18-9.
10. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science*. 2001 18;292(5520):1389-94
11. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990 23;60(4):585-95.
12. Hunziker E, Stein M. Nestin-expressing cells in the pancreatic islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 29;271(1):116-9.
13. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, et al. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes*. 2001;50(3):521-33.
14. Rajagopal J, Anderson WJ, Kume S, Martinez OI, Melton DA. Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. *Science*. 2003 17;299(5605):363.
15. Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, Heit JJ, Cahoy JD, Kim SK. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 10;99(25):16105-10.
16. Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L, Wobus AM. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 4;100(3):998-1003.
17. Ptaszniak A, Beattie GM, Mally MI, Cirulli V, Lopez A, Hayek A. Phosphatidylinositol 3-kinase is a negative regulator of cellular differentiation. *J Cell Biol*. 1997 ;137(5):1127-36.
18. Sipione S, Eshpeter A, Lyon JG, Korbitt GS, Bleackley RC. Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cells. *Diabetologia*. 2004 Mar;47(3):499-508. Epub 2004 14.
19. Park CR. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev*. 2001;25(4):311-23
20. Edenfeld G, Pielage J, Klambt C. Cell lineage specification in the nervous system. *Curr Opin Genet Dev*. 2002;12(4):473-7.
21. Kahan BW, Jacobson LM, Hullett DA, Ochoada JM, Oberley TD, Lang KM, Odorico JS. Pancreatic precursors and differentiated islet cell types from murine embryonic stem cells: an in vitro model to study islet differentiation. *Diabetes*. 2003;52(8):2016-24.
22. Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quinto T, Reig JA, Martin F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes*. 2000;49(2):157-62.
23. Moritoh Y, Yamato E, Yasui Y, Miyazaki S, Miyazaki J. Analysis of insulin-producing cells during in vitro differentiation from feeder-free embryonic stem cells. *Diabetes*. 2003;52(5):1163-8.
24. Lester LB, Kuo HC, Andrews L, Nauert B, Wolf DP. Directed differentiation of rhesus monkey ES cells into pancreatic cell phenotypes. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004 16;2:42
25. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7. Erratum in: *Science* 1998 4;282(5395):1827
26. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*. 2000 Apr;18(4):399-404. Erratum in: *Nat Biotechnol* 2000;18(5):559.
27. Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes*. 2001;50(8):1691-7.
28. Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz-Eldor J. Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem Cells*. 2004;22(3):265-74.
29. Colman A. Making new beta cells from stem cells. *Semin Cell Dev Biol*. 2004;15(3):337-45.
30. Hussain MA, Theise ND. Stem-cell therapy for diabetes mellitus. *Lancet*. 2004 10-16;364(9429):203-5
31. Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med*. 2004 25;350(13):1353-6.
32. Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*. 1994 13;371(6498):606-9.
33. Montanya E, Nacher V, Biarnes M, Soler J. Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes*. 2000;49(8):1341-6.
34. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*. 2003 15;102(10):3483-93
35. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*. 2000;32(1):11-6

36. Korbiling M, Katz RL, Khanna A, Ruifrok AC, Rondon G, Albitar M, Champlin RE, Estrov Z. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med*. 2002 7;346(10):738-46.
37. Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest*. 2003;111(6):843-50.
38. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002 4;418(6893):41-9.
39. Hess D, Li L, Martin M, Sakano S, Hill D, Strutt B, Thyssen S, Gray DA, Bhatia M. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol*. 2003 ;21(7):763-70.
40. Zorina TD, Subbotin VM, Bertera S, Alexander AM, Haluszczak C, Gambrell B, et al. Recovery of the endogenous beta cell function in the NOD model of autoimmune diabetes. *Stem Cells*. 2003;21(4):377-88
41. Kodama S, Kuhlreiber W, Fujimura S, Dale EA, Faustman DL. Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice. *Science*. 2003 14;302(5648):1223-7
42. Jahr H, Bretzel RG. Insulin-positive cells in vitro generated from rat bone marrow stromal cells. *Transplant Proc*. 2003;35(6):2140-
43. Oh SH, Muzzonigro TM, Bae SH, LaPlante JM, Hatch HM, Petersen BE. Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Lab Invest*. 2004;84(5):607-17.
44. Theise ND, Wilmut I. Cell plasticity: Flexible arrangement. *Nature*. 2003 4;425(6953):21
45. Kofman AV, Theise ND, Hussain MA. Paradigms of adult stem cell therapy for type 1 diabetes in mice. *Eur J Endocrinol*. 2004;150(4):415-
46. Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med*. 2000;6(3):278-82.
47. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 5;97(14):7999-8004
48. Teitelman G. Induction of beta-cell neogenesis by islet injury. *Diabetes Metab Rev*. 1996;12(2):91-102.
49. Lipsett M, Finegood DT. beta-cell neogenesis during prolonged hyperglycemia in rats. *Diabetes*. 2002;51(6):1834-41.
50. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*. 2000 27;343(4):230-8.
51. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 10;97(21):11307-12.
52. Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, Peck AB. In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 11;99(12):8078-83.
53. Zalzman M, Gupta S, Giri RK, Berkovich I, Sappal BS, Karnieli O, et al. Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 10;100(12):7253-8
54. Meivar-Levy I, Ferber S. New organs from our own tissues: liver-to-pancreas transdifferentiation. *Trends Endocrinol Metab*. 2003;14(10):460-6.
55. Horb ME, Shen CN, Tosh D, Slack JM. Experimental conversion of liver to pancreas. *Curr Biol*. 2003 21;13(2):105-15.
56. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*. 2004 6;429(6987):41-6.
57. Halban PA, Kahn SE, Lernmark A, Rhodes CJ. Gene and cell-replacement therapy in the treatment of type 1 diabetes: how high must the standards be set? *Diabetes*. 2001;50(10):2181-91.