مجـلـه‌ی علمی، پژوهشی دانشگاه علـوم پزشکی زنجـان
دوره‌ی ۱۹, شمـاره‌ی ۷٤, بهـار ۱۳۹۰, صفحات ۹ تا ۱٦

اثر متفورمین بر روی حجم جزایر لانگرهانس درپانکراس موش سوری

دکتر لعیا سادات خرسندی[۱]، سمیه بهرام زاده[۲]، دکتر محمود هاشمی‌تبار[۳]، سید رشیدالدین کلانتر مهدوی[۴]

نویسنده‌ی مسئول: اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی Layasadat@yahoo.com

دریافت: ۸۸/۱۰/۱۵ پذیرش: ۸۹/۳/۹

چکیده

زمینه و هدف: *متفورمین دارویی است که به صورت گسترده برای درمان دیابت نوع II مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مطالعـه اثـرات مقـادیر متفاوت متفورمین بر روی حجم جزایر لانگرهانس بررسی شده است.*

روش بررسی: *۲۴ سر موش سوری نر بالغ نژاد C57BL/6 در محدوده‌ی وزنی ۵±۳۰ گرم به صورت تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند. گروه شاهد نرمال سالین دریافت کرد و گروه‌های آزمون اول تا سوم به ترتیب متفورمین با غلظت‌های ۷۵، ۱۵۰ و۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم و بـا روش تزریق داخل صفاقی طی ۷ روز به‌صورت روزانه دریافت کردند. یک روز پس از آخرین تزریق، موش‌هـا بـه روش جابجـایی مهـره‌هـای گردنـی قربانی شدند و پانکراس آن‌ها جهت بررسی‌های بافت شناسی در فرمالین ۱۰ درصـد فـیکس شـد. بـا اسـتفاده از روش کـاوالیری حجـم جزایـر لانگرهانس تخمین زده شد.*

یافته‌ها: *حجم جزایر لانگرهانس در گروه‌های دریافت کننده‌ی دوزهای ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم متفورمین اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان نداد ($P>۰/۰۵$). موش‌های تیمارشده با دوز ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم متفورمین در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنـی‌داری را در حجم جزایر لانگرهانس نشان دادند ($P<۰/۰۵$).*

نتیجه‌گیری: *متفورمین به صورت وابسته به دوز باعث افزایش حجم جزایر لانگرهانس می‌شود. اثر افزایشی متفورمین بر حجم جزایر لانگرهانس احتمالاً ناشی از تکثیر یا افزایش حجم سلول‌های بتا می‌باشد.*

واژگان کلیدی: ***متفورمین، پانکراس، جزایر لانگرهانس، موش سوری***

مقدمه

دیابـت قنـدی یـک سـندرم مـزمن متابولیـک اسـت کـه در جهـان حـدود ۲۰۰ میلیـون نفـر بـه آن مبـتلا هـستند و تخمین زده می‌شود که این تعـداد در سـال ۲۰۳۰ دو برابـر خواهد شد. دو نوع دیابت قندی وجود دارد، دیابت نوع I بـه دلیل فقدان ترشح انسولین ناشـی از تخریـب سـلول‌هـای بتـا پانکراسی ایجاد می‌شود و دیابت نوع II کـه بـر اثـر کـاهش

۱- دکترای بافت شناسی، استادیار مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
۲- کارشناس ارشد زیست شناسی گرایش سلولی تکوینی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
۳- دکترای بافت و جنین شناسی، دانشیار مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی جندی شاپور اهواز
٤- کارشناس ارشد آناتومی، مربی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

حساسیت بافت‌های هدف نسبت به آثار متابولیک انسولین ایجاد می‌گردد (۱). در واقع همه اشکال دیابت به‌صورت مشترک ناشی از فقدان عملکرد مناسب توده‌ی سلول‌های بتا (فقدان مطلق سلول‌های بتا در دیابت نوع I و نسبی آن‌ها در دیابت نوع II) می‌باشند (۳و۲). متفورمین یک داروی خوراکی متعلق به دسته‌ی بی‌گوانیدها است که بیماران مبتلا به دیابت نوع II به‌صورت رایج از آن استفاده می‌کنند. این دارو با کاهش تولید گلوکز کبدی از طریق مهار گلوکونئوژنز و یا کاهش مقاومت انسولینی بدون اثر مستقیم بر ترشح انسولین به‌صورت مؤثر سبب کاهش سطح گلوکز پلاسما می‌گردد (۵و۴). متفورمین همچنین متابولیسم و ذخیره سازی گلوکز را در بافت‌های هدف خصوصا کبد کنترل می‌کند. اثرات آن بر سلول‌های بتای پانکراس کاملا روشن نشده است (۶). از آنجا که این دارو سبب بقا و حفظ سلول‌های بتا می‌گردد، لذا ممکن است اثرات ناشی از افزایش گلوکز و اسیدهای چرب را خنثی سازد (۷).

داروی متفورمین به‌صورت معنی‌داری سبب افزایش سطح GLP-1 می‌گردد (۸). GLP-1 پپتید آزادکننده‌ی انسولین معدی-روده‌ای است (۴). این هورمون مشتق شده از فرایند پس ترجمه‌ای پروگلوکاگون در سلول‌های L انتروانـدوکرین می‌باشد و پس از صرف غذا از سلول‌های انتهای روده ترشح می‌شود (۹). این پپتید موجب افزایش رها شدن انسولین وابسته به گلوکز می‌گردد. همچنین سبب مهار ترشح گلوکاگون، تحریک بیوسنتز انسولین، توسعه‌ی توده‌ی سلول‌های β و افزایش فنوتیپ سلول‌های β می‌شود (٤). در دیابت نوع I، GLP-1 سبب افزایش توده‌ی سلول‌های بتا از طریق افزایش تکثیر و نئوژنز و کاهش آپوپتوز سلول‌های بتا می‌گردد (۱۰). علیرغم مطالعات گسترده بر روی اثرات GLP-1 بر روی سلول‌های بتا پانکراس تاکنون مطالعه‌ی کمی اثرات آگونیست‌های GLP-1 بر جزایر لانگرهانس صورت نگرفته است. در این پژوهش سعی شده است اثر دوزهای مختلف داروی متفورمین بر حجم جزایر لانگرهانس مورد بررسی قرار گیرد.

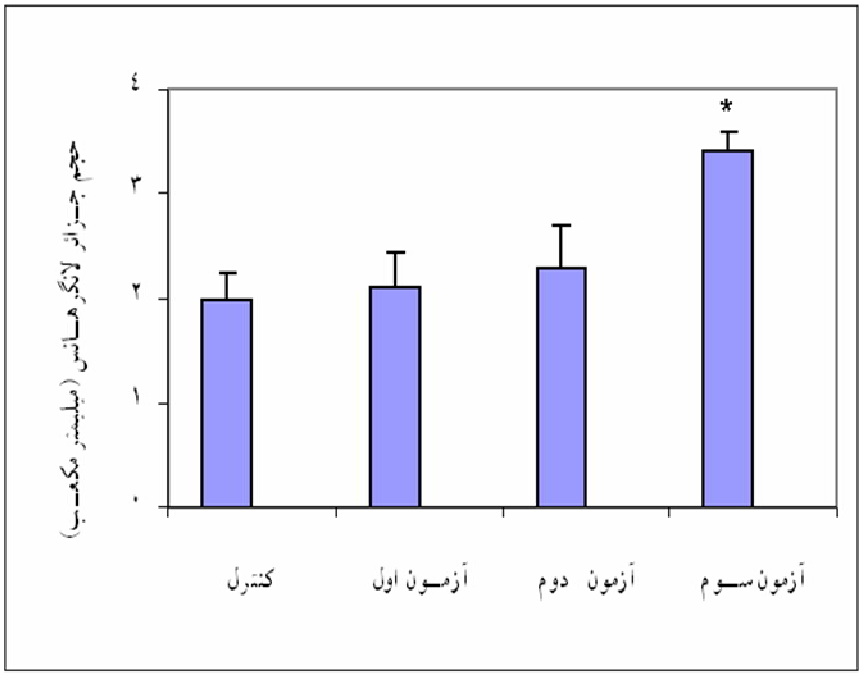
روش بررسی

این مطالعه‌ی تجربی در پائیز ۱۳۸۸ در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه جندی شاپور اهواز انجام شده است. ۲٤ سر موش سوری نر بالغ نژاد C57BL/6 در محدوده‌ی وزنی ۵±۳۰ گرم از مرکز تحقیقات، تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز تهیه شد. نگهداری حیوانات مطابق با راهنمای انستیتوی بین‌المللی سلامت انجام شده‌است. حیوانات در شرایط استاندارد (دمای ۲±۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و نور کنترل شده با شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) با دسترسی به آب و غذای کافی در خانه‌ی حیوانات دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز نگهداری شدند. موش‌ها به صورت تصادفی به ٤ گروه تقسیم شدند. گروه شاهد نرمال سالین دریافت کرد. متفورمین به‌صورت پودر از شرکت ماهان شیمی- ایران تهیه و از نرمال سالین به عنوان حلال استفاده شد. در گروه‌های آزمون متفورمین با غلظت‌های ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به روش تزریق داخل صفاقی طی ۷ روز به‌صورت روزانه تجویز شد (۱۱). یک روز پس از آخرین تزریق حیوانات به روش جابجایی مهره‌های گردنی (مرگ آسان) قربانی شده، پانکراس آن‌ها جهت بررسی‌های استریولوژیکی جدا شده، در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد. در این تحقیق از تکنیک معروف کاوالیری (Cavalieri) برای تخمین حجم جزایر لانگرهانس استفاده شده است. مراحل مختلف این روش به شرح زیر می باشد. ابتدا پانکراس فیکس شده را در بلوک ژل آگار ۷ درصد قرار داده، پس از تهیه‌ی برش‌های ۱ میلی‌متری (۱۰تا۱۲عدد)، مراحل پاساژ بافتی انجام شد و از آن‌ها بلوک‌های پارافینی تهیه گردید. از هر کدام از برش‌های ۱ میلی‌متری (از هر بلوک)

یک مقطع ۵ میکرومتری تهیه، به روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی شد. در مرحله‌ی بعدی مقاطع رنگ شده در زیر میکروسکوپ دارای صفحه‌ی مانیتور (MP3, Nr 3437, Poland) گذاشته، پروبی متشکل از نقاط صلیبی شکل، که قلمرو هر نقطه کاملاً مشخص بود (شکل ۱)، بر روی صفحه‌ی مانیتور گذاشته شد (۱۲). سپس در ۶ فیلد میکروسکوپ، که به‌طور تصادفی انتخاب شده بود، با شمارش تعداد نقاطی که با جزایر لانگرهانس برخورد نموده بودند با استفاده از فرمول زیر (فرمول کاوالیری) حجم بخش مورد نظر تخمین زده شد (۱۴-۱۲). لازم به ذکر است نقاط مذکور توسط ۲ همکار و یک کارشناس آزمایشگاه جداگانه شمارش شده، سپس میانگین آن‌ها در نظر گرفته شده است. ($V=\Sigma p. {}^{a}/_{p} .t$ ، V: حجم بخش مورد نظر Σp: مجموع تعدادنقاط شمارش شده، ${}^{a}/_{p}$: دامنه یا قلمرو اطراف هر نقطه)، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با روش آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) انجام شد و متعاقب آن برای تعیین معنی‌دار بودن از آزمون LSD استفاده شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان گردید. سطح معنی‌دار آزمون‌ها P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

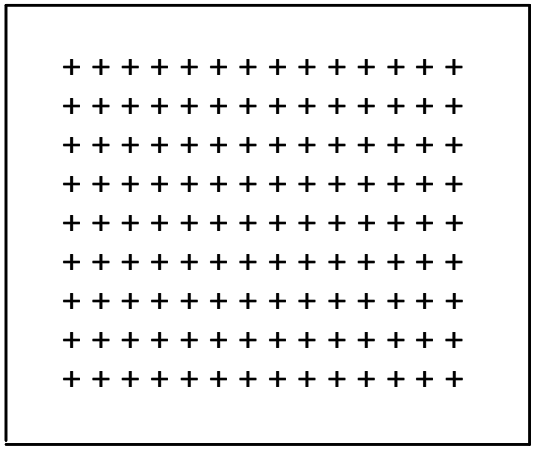
یافته‌ها

در بررسی‌های استریولوژی حجم جزایر لانگرهانس در گروه دریافت کننده‌ی دوز ۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم متفورمین نسبت به گروه کنترل اندکی افزایش را نشان داد (نمودار ستونی ۱) که از نظر آماری معنی‌دار نبود (P: ۰/۰۷۶).

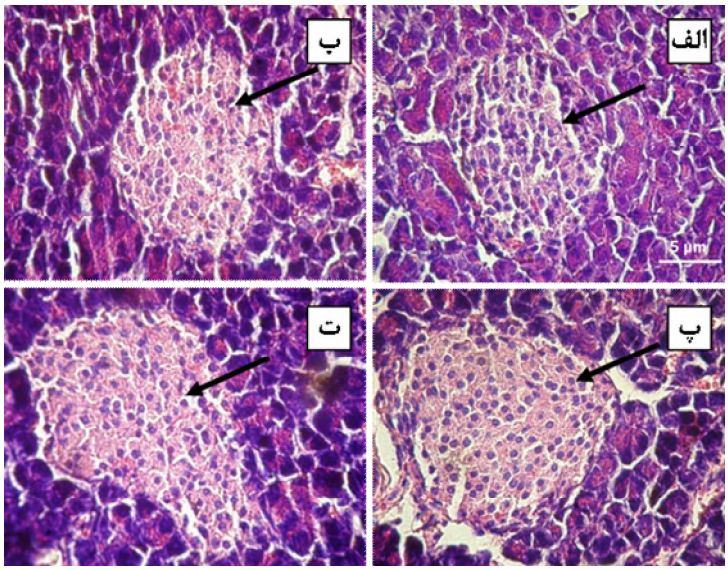


نمودار ۱: اثر متفورمین بر حجم جزایر لانگرهانس در گروه‌های مختلف. گروه آزمون اول: ۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم متفورمین، گروه آزمون دوم: ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم متفورمین، گروه آزمون سوم: ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم متفورمین. n=۶ میانگین ± انحراف معیار، P<۰/۰۵*

گروه دریافت کننده‌ی دوز ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم متفورمین نیز در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (نمودار ستونی-۱). جزایر لانگرهانس در گروه دریافت کننده‌ی دوز ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم متفورمین افزایش حجم قابل ملاحظه‌ای را نسبت به گروه کنترل نشان داد که از نظر آماری معنی‌دار بود (P:۰/۰۳۴) (نمودار ستونی ۱). شکل ۲ مقاطع میکروسکوپی جزایر لانگرهانس گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. گروه دریافت کننده‌ی دوز ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم متفورمین نیز در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (نمودار ستونی ۱).



شکل ۱: پروب نقطه ای مورد استفاده جهت تعیین حجم



شکل ۲: تصاویری از جزایر لانگرهانس در گروه‌های مختلف که با فلش مشخص شده اند. الف) گروه کنترل (نرمال سالین)، ب) گروه متفورمین با دوز ۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم، پ) گروه متفورمین با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، ت) گروه متفورمین با دوز ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم. بزرگنمایی: ۲۰۰X، H&E

بحث

مکانیسم‌های تنظیم کننده‌ی رشد جزایر لانگرهانس تحت شرایط مختلف به‌صورت وسیع مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته‌اند (۱۵). بیشتر مطالعات پیرامون فاکتورهای درون جزیره‌ای که در طی تولید یا ترمیم جزایر بیان می‌شوند و یا فاکتورهای آغازگری که توسط پارانشیم مجاور جزایر رها می‌گردند، صورت گرفته است (۱۶). تعداد زیادی از فاکتورهای رشد و پپتیدهای محرک رشد در طی رشد جزایر

بیان می‌شوند (۱۵). پیرامون سیگنال‌های آغازگر رشد سلول‌های بتا اطلاعات اندکی در دسترس هست. Edvel و همکارانش در سال ۱۹۹۹ از میان این فاکتورها اثرات GLP-1 را انتخاب کردند. یافته‌های آن‌ها نشان داد که GLP-1 سبب تحریک رشد جزایر لانگرهانس در موش می‌گردد (۱۶).

مانوسی و همکارانش نشان دادند که چنانچه بیماران غیر دیابتی چاق با متفورمین تیمار داده شوند، پس از جذب گلوکز سطح GLP-1 به‌صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد. این گروه تحقیقاتی اعلام کردند که این اثر می‌تواند ناشی از اثر مهاری متفورمین بر تجزیه‌ی GLP-1 باشد (۸). در پژوهش حاضر اثر متفورمین (که هم آنالوگ GLP-1 است و هم افزایش دهنده‌ی سطح این هورمون)، بر حجم جزایر لانگرهانس، به‌صورت کمی بررسی شده است. یافته‌های این تحقیق نشان داد متفورمین به‌صورت وابسته به دوز سبب افزایش حجم جزایر لانگرهانس می‌گردد. زو و همکارانش (۱۷) در بررسی که بر روی پانکراس رت‌های تیمار شده با Exendin-4، یک آگونیست گیرنده‌ی GLP-1 (۱۸)، انجام دادند، مشخص ساختند که Exendin-4 از طریق افزایش تکثیر سلول‌های بتای موجود و یا از طریق القای نئوژنز جزایر سبب افزایش تشکیل سلول‌های بتای جدید می‌گردد. در بررسی که توسط تورل و همکارانش انجام شد، افزایش توده‌ی سلول‌های بتا در رت‌های تیمار شده با GLP-1/Exendin-4 به دو فرایند تکثیر سلول‌های بتا و افزایش تعداد جزایر لانگرهانس کوچک نسبت داده شد (۱۹). Couto و همکارانش نشان دادند که در دیابت نوع I، GLP-1 از طریق افزایش تکثیر و نئوژنز و کاهش آپوپتوز سلول‌های بتا سبب افزایش توده‌ی سلول‌های بتا می‌گردد (۲۰). پرفتی و همکارانش نیز اعلام کردند که GLP-1 سبب تحریک تکثیر سلول‌های پانکراسی و نیز تمایز سلول‌های بتا در پانکراس موش می‌گردد (۱۱). در پژوهشی که در سال ۲۰۰۱ توسط Ling و همکارانش انجام شد، مشخص گردید که در موش‌های فاقد گیرنده GLP-1 حجم و تعداد سلول‌های بتا در مقایسه با گروه کنترل تغییر نمی‌کند، اما جایگاه سلول‌های بتا در جزایر تغییر می‌کند. آن‌ها نشان دادند توزیع سلول‌های بتا در موش‌های فاقد گیرنده‌ی GLP-1 در جزایر بزرگ کم و در جزایر کوچک و متوسط بیشتر می‌شود. علاوه بر این موقعیت سلول‌های آلفای جزایر نیز تغییر یافته به‌طوری‌که در این موش‌ها سلول‌های آلفا ۲ تا ۳ برابر گروه کنترل در مرکز جزایر قرار گرفته‌اند. آن‌ها نتیجه گرفتند، گیرنده‌ی GLP-1 در جوندگان نقش مهمی در سازماندهی سلول‌های اندوکرین پانکراس دارند (۲۱).

از این مطالعه، نمی‌توان مکانیسم اثر افزایشی متفورمین بر روی حجم جزایر لانگرهانس را یافت، اما با توجه به مطالعات فوق الذکر و از آنجا که عمده‌ی سلول‌های موجود در جزایر لانگرهانس سلول‌های بتا می‌باشند (۲۲)، لذا می‌توان گفت که شاید افزایش حجم جزایر لانگرهانس ناشی از افزایش تعداد سلول‌های بتا باشد.

نتیجه‌گیری

متفورمین به صورت وابسته به دوز باعث افزایش حجم جزایر لانگرهانس می‌شود. اثر افزایشی متفورمین بر حجم جزایر لانگرهانس احتمالا ناشی از تکثیر یا افزایش حجم سلول‌های بتا می‌باشد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس خود را نسبت به معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی جندی شاپور اهواز که امکان اجرای این طرح را فراهم کرده‌اند، ابراز می‌دارند.

References

1- Guerra SD, Lupi R, Marselli L. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabets.* 2005; 54: 727-35.

2- Donath MY, Halban PA. Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia.* 2004; 47: 581-9.

3- Rhodes CJ. Type 2 Diabetes-a Matter of beta-Cell Life and Death? *Science.* 2005; 307: 380-4.

4- Green BD, Irwin N, Duffy NA, Gault VA, O'Harte FPN, Flatt PR. Inhibition of dipeptidyl peptidase-IV activity by metformin enhances the antidiabetic effects of glucagon-like peptide-1. *Euro J Pharmacol.* 2006; 547: 192-9.

5- Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G, Gerich JE. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Engl J Med.* 1995; 333: 550-4.

6- Richardson H, Campbell SC. Effects of rosiglitazone and metformin on pancreatic beta cell gene expression. *Diabetologia.* 2006; 49: 685-96.

7- Hull RL, Shen ZP. Long-term treatment with rosiglitazone and metformin reduces the extent of, but does not prevent, islet amyloid deposition in mice expressing the gene for human islet amyloid polypeptide. *Diabetes.* 2005; 54: 2235-44.

8- Mannucci E, Ognibene A, Cremasco F, Bardini G, Mencucci A, Pierazzuoli E. Effect of Metformin on Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1) and Leptin Levels in Obese Nondiabetic Subjects. *Diabets Care.* 2001; 24: 489-94.

9- Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF. Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J Biol Chem.* 1986; 261:11880-9.

10- Li Y, Hansotia T. Glucagon-like peptide-1 reseptor modulates beta cell apoptosis. *Biol Chem.* 2003; 278: 471-8.

11- Perfetti R, Zhou J, Doyle ME, Egan JM. Glucagon-Like Peptide-1 Induces Cell Proliferation and Pancreatic-Duodenum Homeobox-1 Expression and Increases Endocrine Cell Mass in the Pancreas of Old, Glucose-Intolerant Rat. *Endocrinol.* 2000; 141:4600-5.

12- Howard CV, Reed MG. Unbiased stereology. *Chester: Bios scientific.* 1998; 39-45.

13- Gundersen HJ, Bendsten TF, Korbo L. Some new, simple and efficient stereological methods and theiruse in pathological research and diagnosis. *Apmiss.* 1988; 96: 391-4.

14- Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF. The new stereological tools; Disector, fractionator; nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Apmiss.* 1988; 96: 857-81.

15- Corbett J, Serup P, Bonner-Weir S, Nielsen JH. B-Cell ontogeny: growth and death. *Diabetologia.* 1997; 40: B27-B32

16- Edvell A, Lindstrom P. Initiation of increased pancreatic islet growth in young normoglycemic mice. *Endocrinol.* 1999; 140: 778-83.

17- Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S. Exendin-4 stimulates both b-Cell replication and neogenesis, resulting in increased b-Cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes*. 1999; 48: 2270-6.

18- Greig N, Halloway HW, De Ore K, et al. Once daily injections of Exendin-4 to diabetic mice achieves long-term beneficial effects on blood glucose levels. *Diabetologia*. 1999; 42: 45-50.

19- Tourrel C, Bailbe D, Meile MJ, Kergoat M, Portha B. Glucagon-Like Peptide-1 and Exendin-4 stimulate b-Cell neogenesis in streptozotocin-treated newborn rats resulting in persistently improved glucose homeostasis at adult age. *Diabetes*. 2001; 50: 1562-70.

20- Couto MF, Minn AH, Pise-Masison CA, et al. Exenatide blocks JAK1-STAT1 in pancreatic beta cell. *Metabolism*. 2007; 56: 915-8.

21- Ling Z, Wu D, Zambre Y, et al. Glucagon-like peptide 1 receptor signaling influences topography of islet cells in mice. *Virchows Arch*. 2001; 438: 382-7.

22- Guyton AC, Hall JE. Textbook of medical physiology. Mississippi: Saunders; 2005.

Metformin Effect on the Mouse Pancreatic Langerhans Islets Volume

Khorsandi LS[1], Bahramzadeh S[1], Hashemitabar M[1], Kalantar Mahdavi SR[1]

[1]Cell and Molecular Research Center, Ahwaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahwaz, Iran

Corresponding author: Khorsandi LS, Cell and Molecular Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Email: Layasadat@yahoo.com

Received: 5 Jan 2010 **Accepted:** 30 May 2010

Background and Objective: Metformin is a widely used medicine for treatment of type 2 diabetes. In this study, the effect of various doses of metformin on the mouse islets of langerhans volume was investigated.

Materials and methods: Twenty four C57BL/6 adult male mice weighting 30±5 gr were randomly divided into 4 groups. Normal saline was given to the control group (group 4) and the experimental groups (groups 1-3) received 75, 150 and 300 mg/kg metformin daily by ***intraperitoneal injection for seven days.*** One day after the last ***injection the mice were*** sacrificed by cervical dislocation and their pancreases were fixed in 10% formalin for histological studies. The volume of the islets of langerhans was estimated by using Cavalieri method.

Results: Volume of the islets of langerhans in doses of 75 and 150 mg/kg Metformin showed a non-significant difference in comparison to control group ($P>0.05$). 300 mg/kg metformin treated mice showed a significant increase in islets of langerhans volume compared to the control group ($P<0.05$).

Conclusion: Metformin increases in the islets of langerhans volume in a dose-dependent manner. Increasing effects of Metformin on the islets of langerhans volume may be due to proliferation or hypertrophy of beta cells.

Keywords: Metformin, Pancreas, Islets of langerhans, Mice