اثرایمونوتراپیوتیک آل- ترانس رتینوئیک اسید بر دیابت تیپ ۱ در موش و تاثیر آن بر بیان ژن *PPARγ*

فرین ملکی فرد: دانشجوی دکتری ایمنی شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
* **نوروز دلیرژ:** دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (*نویسنده مسئول).n.delirezh@urmia.ac.ir
رحیم حب نقی: دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
حسن ملکی نژاد: استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: آل ترانس رتینوئیک اسید (ATRA) دارای فعالیت‌های بیولوژیکی مختلفی از جمله تعدیل‌گر ایمنی در تعدادی از بیماری‌های التهابی و خودایمن می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات آل ترانس رتینوئیک اسید در درمان دیابت خودایمن در موش و تاثیر آن در بیان ژن peroxisome proliferator- activated receptor gamma (*PPARγ*) بود.

روش کار: دیابت بوسیله چندین دوز متوالی و کم استرپتوزوتوسین (STZ) در موش‌های نر C57BL/6 القا شد (روزانه ۴۰ میلی‌گرم به ازائ هر کیلوگرم وزن بدن برای ۵ روز متوالی). بعد از القای دیابت، موش‌ها تحت درمان با ATRA به مدت ۲۱ روز (روزانه ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و به صورت داخل پریتوئن) قرار گرفته و سطح قند خون در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از ابتلا به دیابت حاصل از القائ STZ اندازه‌گیری شد. سلول‌های طحالی از نظر میزان تولید سایتوکاین‌ها بوسیله تست الایزا و تغییرات سیستم ایمنی در طحال توسط semi-quantitative RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه بین گروه‌ها استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: درمان توسط ATRA مانع از افزایش قند خون در موش‌های دیابتی شد. درمان با ATRA به طور قابل توجهی باعث مهار تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی IL-17 وIFN-γ گردید در حالی که باعث افزایش سطح سایتوکاین ضد التهابی IL- 10 و افزایش بیان ژن peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPARγ*) در طحال در مقایسه با گروه کنترل دیابتی شد.

نتیجه گیری: این یافته‌ها نشان می‌دهد که ATRA ممکن است اثر درمانی در برابر تخریب خودایمن سلول‌های بتا پانکراس در طی دیابت نوع ۱ ناشی از القائ توسط STZ در موش داشته باشد.

کلیدواژه‌ها: دیابت نوع ۱، آل- ترانس رتینوئیک اسید، سایتوکاین، *PPAR γ*

مقدمه

دیابت نوع ۱ از جمله بیماری‌های خود ایمن می‌باشد که در اثر تخریب سلول‌های بتای پانکراس تولید کننده انسولین و با حمله سلول‌های ایمنی بوجود می‌آید (۱). التهاب مزمن پانکراس (Insulitis) و تخریب سلول‌های بتا توسط سلول‌های ایمنی بویژه لنفوسیت‌های T اتوراکتیو $CD4^+$ و $CD8^+$، B سل‌ها، ماکروفاژ و دندریتیک سل‌ها بوجود می‌آید (۲). استرپتوزوتوسین (STZ) توکسین سلول‌های بتا پانکراس می‌باشد و زمانی که با دوز کم و متوالی (MLDS) در گونه‌های حساس تجویز شود، مسبب ایجاد التهاب در جزایر پانکراس می‌شود و یکی از مدل‌های پری‌کلینیکال مختلف از بیماری برای روشن شدن مکانیسم پاتوژنیک دیابت نوع ۱ در انسان و تست روش‌های درمانی جدید می‌باشد (۳). سایتوکین‌های مختلفی از جمله IFN-γ، TNF-α، IL-1 وهمچنین IL-17 در ایجاد دیابت نوع ۱ موثر هستند در حالی که تصور می‌شود که سایتوکین‌های ضد التهابی از جمله IL-10، IL-4 و TGF-β در جلوگیری از بیماری نقش مهمی دارند (۴). آل ترانس رتینوئیک اسید (ATRA) از جمله متابولیت‌های فعال ویتامین آ می‌باشد که دارای خواص تعدیل‌گر ایمنی و ضد التهابی می‌باشد. مطالعات نشان داده

آل ترانس رتینوئیک اسید در شرایط In vitro باعث مهار پاسخ های Th1 و افزایش پاسخ‌های Th2 می‌شود (۵) و از این رو در درمان بیماری‌های خودایمن برای سوق پاسخ های ایمنی از Th1 به سمت Th2 مورد توجه بوده است. ATRA در جلوگیری از پیشرفت مدل جانوری برخی از بیماری‌های خودایمن از جمله آنسفالومیلیت خودایمن تجربی (۶)، نفریت خود ایمن (۷)، لوپوس (۸) و آرتریت خودایمن (۹) موثراست. peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARɣ) از خانواده بزرگ نوکلئار استروئید رسپتور ها می باشد که در بیان ژن های مختلفی که تنظیم کننده متابولیسم انرژی، تمایز سلولی و آپوپتوز هستند نقش دارد. مطالعات نشان از نقش PPARɣ و لیگاند هایش به عنوان تنظیم کننده پاسخ های التهابی و ایمنی از جمله تنظیم تمایز و گسترش سلول های ایمنی از جمله مونوسیت، ماکروفاژ، سلول های کشنده طبیعی (NK cell) و همچنین در تنظیم شیفت پاسخ های Th1/Th2 موثر می باشد (۱۰).

هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر درمانی آل ترانس رتینوئیک اسید بر میزان بیان ژن PPARɣ در موش های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین و ارتباط آن با میزان بیان سایتوکاین های IL-10,IFN-ɣ و IL-17 می باشد.

روش کار

در این مطالعه که به صورت تجربی انجام شد، جامعه مورد مطالعه شامل موش های نر نژاد خالص C57BL/6 با محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته (وزن ۲۰-۱۵ gr) که از انیستیتو پاستور ایران خریداری شده بودند. این موش ها در حیوان خانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه در شرایط استاندارد آب، غذا، دما و نور کافی نگهداری شدند. کلیه مراحل این تحقیق در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه ارومیه مورد تایید قرار گرفت. موش ها بعد از اطمینان از القاء دیابت در آن ها به صورت تصادفی به سه گروه ۵ تایی تقسیم شدند. گروه A شامل موش های سالمی بودند که تحت هیچ تیماری قرار نگرفتند و فقط بافر سیترات با pH=۴/۵ به آن‌ها تجویز می شد. گروه B شامل موش‌های دیابتی بودند که تنها دیابت در آنها القاء شده بود (گروه کنترل دیابتی). گروه C شامل موش هایی بودند که بعد از القاء دیابت تحت درمان با ATRA (20 mg/kg/day) برای ۲۱ روزمتوالی به صورت داخل صفاقی قرار گرفتند (گروه تحت درمان).

-القاء دیابت: قبل از تجویز هر دوز STZ (streptozotocin) موش ها به مدت چهار ساعت ناشتا می شدند و حتی پوشال بستر آن ها نیز جمع آوری می شد سپس STZ(Sigma, Germany) را به صورت داخل صفاقی تا پنج روز متوالی در یافت می کردند (۴۰mg/kg در ۲۰۰ میکرولیتر سیترات بافر با pH=۴/۵ که ۱۰ دقیقه قبل از تجویز حل می شد). موش ها زمانی دیابتی شده ارزیابی می شدند که میزان قند خون ناشتا آن ها بیشتر از ۲۵۰ mg/dl بود.

-ارزیابی قند خون ناشتا: بدین منظور توسط سرنگ های انسولینی بعد از مقید کردن موش ها از ورید دمی آن ها اقدام به خون گیری کرده و سپس توسط دستگاه خودکار گلوکومتر (Accu-Chech Compact plus, Irland) میزان گلوکز خون آن ها در روز صفر، روز ۷، روز ۱۴ و روز ۲۱ پس از القاء دیابت و شروع درمان بررسی شد.

-کشت سلولی طحال و سنجش سایتوکین‌های موجود در مایع رویی: ۲۱ روز پس از آغاز درمان موش ها نخاعی شده وسپس طحال موش ها تحت شرایط استریل خارج گردید و بعد از قطعه قطعه شدن در ۵ میلی لیتر محیط کشت RPMI-1640 (Sigma, USA) حاوی ۱۰ درصد FBS (Gibco, Germany) له گردید. بافت حاصل از توری سیمی به قطر ۰/۲ میلی متر جهت تهیه سوسپانسیون سلولی عبور داده شد. به منظور حذف گلبول های قرمز پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دور g ۲۰۰، ۵ میلی لیتر بافر لیز کننده (۰/۱۵ مول کلرید آمونیوم، ۱۰ میلی مول بی کربنات پتاسیم و ۰/۱ میلی مول EDTA با pH=7/2) بر روی رسوب سلولی به دست آمده افزوده شد. پس از ۵ دقیقه ضمن افزودن ۱۰ میلی لیتر محیط کشت بار دیگر به مدت ۱۰ دقیقه در

دور g ۲۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس رسوب سلولی در محیط کشت RPMI حاوی FBS ۱۰ درصد به حالت سوسپانسیون در آورده شد. پس از شمارش سلول ها، سوسپانسیون سلولی با ۲×۱۰^{6} سلول در میلی لیتر از آن تهیه شد. این سلول ها در پلیت های کشت ۲۴ خانه در حضور 2μg/ml Concanvalin A (Con A, Sigma) به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور CO_2 ۵ درصد کشت داده شدند. پس از طی این مدت مایع رویی آن ها جمع آوری شد.

برای سنجش سایتوکین‌های IFN-γ، IL-17 و IL-10 از کیت های الایزا (Bendermed Co., Germany) استفاده شد و بر طبق دستورالعمل مندرج در دفترچه ی راهنمای هر کدام از کیت ها اقدام گردید.

- بررسی میزان بیان ژن PPARγ به روش Semi-quantitative RT-PCR: Total RNA طحال موش ها بوسیله (Reagent kit TRIZOL (GIBICOL استخراج گردید. غلظت RNA با اندازه گیری مقدار OD به ۱μg/μl تنظیم شد و در ۸۰- ℃ نگهداری شد. Reverse transcriptions با ۱ μg از total RNA با استفاده از کیت BcaBEST RNA PCR Kit Ver.1.1 (Takara, Japan) انجام شد. cDNA با استفاده از واکنش زنجیره ای پپلیمراز (CR) آمپلی فاید شد، در حجم واکنش ۲۵ μl شامل ۲/۵ μl بافر ۱۰×PCR، ۱ μl از هر dNTP ۲.۵ mmol/l، ۱ واحد از Ex Taq DNA polymerase (Takara, Japan)، ۱ μl cDNA، ۱ μl از هر ۱۰ pmol/l پرایمر:

(PPARγ, sense 5′ -GAG ATG CCA TTC TGG CCC ACC AAC TTC GGA-3 و TAT CAT AAA TAA GCA –antisense 5′ β-actin, ;TCA ATC GGA TGG TTC-3′ TGG AAT CCT GTG GCA TCC –sense 5′ TAAAAC – antisense 5′وATG AAA C-3′ GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3′)

شرایط ترمال سایکلر بعد از بهینه سازی شامل: ۱ سیکل در ۹۷ ℃ سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل برای ژن PPARγ (و۲۶سیکل برای β-actin control fragment) در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی گراد برای ژن PPARγ (و۵۰ درجه سانتی گراد برای β-actin control fragment)به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، و سیکل نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۸ دقیقه.

قطعات آمپلی فاید شده PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شده و سپس ژل با اتیدیوم برماید رنگ آمیزی شده وبا دستگاه electrophoresis gel imaging system (UVP) عکس برداری شد. برای اندازه گیری میزان بیان ژن مورد نظر از نسبت absorption density PPARγ/β-actin باند های روی ژل استفاده گردید.

از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه بین گروه ها استفاده گردید. در تمام بررسی ها (p<۰/۰۵) به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.برای ترسیم نمودار ها از نرم افزار (۲۰۰۷) Microsoft Excel استفاده شد.داده ها به صورت Means±SEM گزارش گردید.

یافته‌ها

بررسی میزان قند خون ناشتا ی موش ها در تمامی گروه ها در طی ۲۱ روز پس از تجویز ATRA نشان داد که در گروه موش های دیابتی که دارو دریافت کرده بودند (گروه تحت درمان) نسبت به گروه شاهد دیابتی که دارو دریافت نکرده بودند (گروه کنترل دیابتی) به صورت معنی داری (p<۰/۰۰۵) پایین تر بوده است. از طرفی میزان قند خون در گروه های دریافت کننده دارو و گروه کنترل دیابتی در مقایسه با گروه سالم افزایش معنی داری نشان داد (p<۰/۰۰۱) (جدول ۱).

میزان سایتوکین های پیش التهابی IFN-γ و IL-17 تولید شده در مایع رویی کشت سلول های طحالی در گروه موش های دیابتی که دارو دریافت کرده بودند (گروه تحت درمان) و گروه شاهد دیابتی که دارو دریافت نکرده بودند (گروه کنترل دیابتی) در مقایسه با گروه سالم به صورت معنی‌داری (p<۰/۰۰۵) افزایش یافت و در گروه

جدول ۱- تاثیر ATRA بر میزان قند خون ناشتا در روزهای ۰، ۷، ۱۴، ۲۱ روز پس از آغاز درمان

	سالم	کنترل دیابتی	تحت درمان
روز۰	۰,۱۴±۱۰۰,۰۱	[a]۰,۰۷±۲۵۸,۰۹	[a] ۰,۰۱±۲۵۰,۱۹
روز۷	۰,۲۳±۱۰۳,۲۰	[a] ۰,۱۹± ۳۵۲,۸۵	[b a] ۰,۲۸±۳۱۶,۴۳
روز۱۴	۰,۳۳±۹۸,۸۸	[a] ۰,۱۶±۳۶۷,۰۱	[b a]۰,۲۵±۳۰۰,۲۲
روز۲۱	۰,۴۱±۱۰۵,۰۷	[a] ۰,۲۰±۳۷۰,۲۶	[b a] ۰,۰۸±۲۳۵,۸۴

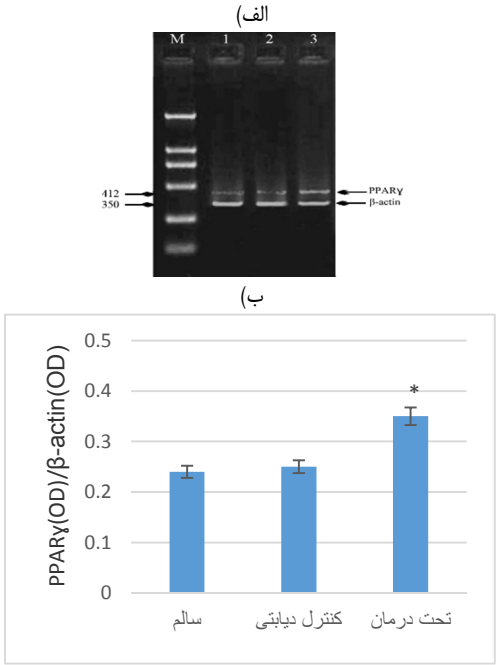
([a] نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح p< 0.001 بین گروه دریافت کننده دارو و گروه کنترل دیابتی در مقایسه با گروه سالم) ([b]نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح p< 0.005 بین گروه دریافت کننده دارو و گروه کنترل دیابتی)

جدول ۲- مقایسه میانگین غلظت سایتوکین های IFN-γ، IL-10 و IL-17 در سوپ رویی کشت سلولهای طحالی تحریک شده بوسیله Con A پس از ۷۲ ساعت کشت

	سالم	کنترل دیابتی	تحت درمان
IFN-γ	۰,۰۱±۱۰۸,۰۲	[a] ۰,۳۲±۱۰۷۵,۱۲	[b a] ۰,۱۲±۴۰۰,۳۵
IL-10	۰,۴۴±۲۵۳,۳۲	۰,۰۵±۲۰۰,۱۸	[d] ۰,۲۴±۳۱۰
IL-17	۰,۰۸±۹۱,۰۲	[a] ۰,۷۶±۶۰۰,۰۵	[b a] ۰,۵۳±۳۰۰,۷۶

([a]نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح p< 0.005 بین گروه دریافت کننده دارو و گروه کنترل دیابتی در مقایسه با گروه سالم) ([b]نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح p< 0.005 بین گروه دریافت کننده دارو و گروه کنترل دیابتی)([d] نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح p< 0.001 بین گروه دریافت کننده دارو در مقایسه با گروه کنترل دیابتی و گروه سالم)

موش‌های دیابتی که دارو دریافت کرده بودند (گروه تحت درمان) نسبت به گروه شاهد دیابتی که دارو دریافت نکرده بودند (گروه کنترل دیابتی)



نمودار ۱- بیان ژن PPARγ در طحال موش‌های دیابتی شده تحت درمان با ATRA. انالیز RT-PCR mRNA ژن PPARγ

(الف)، بیان mRNA ژن PPARγ با استفاده از نسبت absorption density PPARγ/β-actin باندهای روی ژل (ب) (*p< 0.05) ستون M (DL 2000 مارکر)، ستون ۱ (گروه موش های سالم)، ستون ۲ (گروه موش های کنترل دیابتی)، ستون ۳ (گروه موش های تحت درمان)

به صورت معنی داری (p<۰/۰۰۵) کاهش و در عوض سطح سایتوکین ضد التهابی IL-10 در گروه تحت درمان در مقایسه با گروه کنترل دیابتی و گروه سالم افزایش معنی داری را نشان داد (p<۰/۰۰۱) (جدول ۲).

برای بررسی میزان بیان ژن PPARγ در طحال موش های دیابتی شده پس از طی ۲۱ روز از آغاز درمان از Semi-quantitative RT-PCR استفاده شد. نتایج ما نشان می دهد که بعد از ۲۱ روز از آغاز درمان میزان بیان mRNA ژن PPARγ به طور معنی داری در طحال موش های تحت درمان افزایش یافته است و هیچ تفاوت معنی داری بین گروه کنترل دیابتی و سالم وجود نداشت (نمودار ۱). این افزایش بیان ژن PPARγ هم زمان با تغییر در سطح سایتوکین های پیش التهابی و ضد التهابی یعنی کاهش سطح IFN-γ، IL-17 و کاهش سطح IL-10 بوده است.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه اقدام به درمان با ATRA پس از اطمینان از افزایش قند خون و القاء بیماری در تمامی موش های گروه درمانی شده است. نتایج به دست آمده نشان می دهد ATRA موجب کاهش قند خون در گروه درمانی نسبت به گروه کنترل

دیابتی می گردد که نشان از نقش مهم ATRA در کنترل پیشرفت بیماری و درمان آن دارد. تحقیقات گذشته حاکی از این بوده که ATRA برای پیشگیری و درمان موش های NOD مبتلا به دیابت نوع ۱ موثر بوده است (۱۱).

تحقیقات نشان می دهد سلول های Th1 نقش بسیار مهمی در تخریب سلول های بتا پانکراس ایفا می کنند. آنها با تولید سایتوکین های پیش التهابی از جمله IFN-γ، TNF-α و IL-12 باعث فعال سازی ماکروفاژ و T سل های سایتو توکسیک شده که مسبب تخریب سلول های β پانکراس می‌باشند. در حالی که سلول های Th-2 فعال شده با ترشح سایتوکاین های ضد التهابی IL-4 و IL-10 مانع تخریب سلول های β می شوند (۱۲). ATRA سبب مهار تولید IL-12 توسط ماکروفاژهای موش شده و پاسخ های Th-1 در $CD4^+$ T سل ها مهار می شود (۱۳). در این تحقیق درمان با ATRA سبب کاهش سایتوکاین پیش التهابی IFN-γ و افزایش سطح سایتوکاین ضد التهابی IL-10 شد که با نتایج تحقیقات قبل در رابطه با اثر این دارو مطابقت دارد.

در سال‌های اخیررده جدیدی از سلول های T به نام سلول‌های Th-17 که تولید کننده IL-17 می‌باشند نقش مهمی در بسیاری از بیماری های خود ایمن از جمله مولتیپل اسکلروز، روماتوئید آرتریت و دیابت نوع ۱ را دارا می باشد. IL-17 سایتو کین پیش التهابی است که نقش آن در بیماری دیابت، تحریک تولید نیتریک اکساید که از طریق سلول های β در پاسخ به تحریک سایتو کاینی وتوسط ماکروفاژ های فعال شده توسط سایتوکاین تولید می شود که باعث تخریب سلول های β می شود (۱۵-۱۴) وهمچنین IL-17 باعث افزایش انفلتراسیون نوتروفیل و ماکروفاژ و در نهایت با القاء تولید سایتوکاین های پیش التهابی توسط ماکروفاژ های فعال شده و القاء کموکین‌ها سبب بسیج سلول های Th1 به بافت پانکراس را سبب می شود (۱۶). تاثیر تنظیم کنندگی ایمنی تریتوئین (ATRA) از طریق مهار سایتوکاین-IL 17 و افزایش سطح IL-10 در شرایط in vitro نشان داده شده است ولی اثری بر IFN-γ و جمعیت FoxP3 T reg نداشته است (۱۷).

مطالعه موش های تحت درمان با ATRA در این بررسی نشان از اثر مهاری این دارو بر سایتوکاین IL-17 دارد.

IL-10 از جمله سایتوکاین های ضد التهابی مهمی است که نقش اصلی را در محدود کردن پاسخ های التهابی و ممانعت از ایجاد آسیب های بافتی را ایفا می کند (۱۸). این سایتو کاین به عنوان فاکتور مهار کننده ی ساخت سایتوکاین (Cytokine synthesis inhibitory factor یا CSIF) شناخته شده است (۱۹). مطالعات نشان داده اند که IL-10 به صورت اگزوژنوس یا با استفاده از القاء آن توسط پروبیوتیک های خوراکی در موش باعث جلوگیری از دیابت نوع ۱ در موش‌ها می شود (۲۰).

در این تحقیق افزایش معنی دار سطح این سایتوکاین به همراه کاهش سطح سایتوکاین‌های پیش التهابی IL-17 و IFN-γ از جمله عوامل مهم در کنترل و درمان موش های دیابتی مورد مطالعه می‌باشد.

برای بررسی چگونگی روند مولکولی این اثر مهاری در کنترل بیماری دیابت خود ایمن، میزان بیان mRNA ژن PPARγ در طحال موش‌های دیابتی شده با STZ از طریق Semi-quantitative RT-PCR مورد تحقیق قرار گرفت.

PPARγ در تنظیم بیان ژن های مختلفی که در متابولیسم انرژی، تمایز سلولی و آپوپتوز تاثیرگذارند نقش مهمی دارد. امروزه نتایج تحقیقات نشان می دهد که PPARγ و لیگاند هایش درواکنش های ایمنی و التهابی موثر هستند (۱۰). در مطالعه حاضر بیان ژن PPARγدر سطح mRNA در طحال موش‌های دیابتی شده افزایش داشته که این هم زمان با افزایش سطح سایتوکاین ضد التهابی IL-10 و کاهش سطح سایتوکاین های پیش التهابی IL-17 و IFN-γ بوده است. مطالعات گذشته نشان داده که PPARγ درتنظیم بیان سایتوکاین های التهابی نقش دارد. PPARγ به طور منفی تنظیم کننده بیان ژن سایتوکاین IFN-γ در ماکروفاژ می باشد (۲۱). PPARγ و لیگاندهایش باعث کاهش تولید سایتوکاین های

Th1 در آنسفالومیلیت شده است (۲۲-۲۳). این در حالی است که PPARγ در بلوغ دندریتیک سل ها و شیفت پاسخ های ایمنی به سمت Th2 موثر است (۲۴) و باعث افزایش سطح IL-4 در بافت کلون (۲۵) و بافت قلبی و سلولهای طحالی (۲۶) شده است. در سالهای اخیر دو فاکتور نسخه برداری T-bet و GATA-3 نقش مهم در تمایز سلول های Th1/Th2 داشته است (۲۷). T-bet باعث تمایز T سل های نابالغ به Th1 می شود و GATA-3 باعث تمایز آنها به Th2 می شود. گزارش شده که PPARγ باعث فعال سازی GATA-3 شده و اثرات مفیدی در کولیت داشته است (۲۵). ولی تاثیر PPARγ بر پاسخ‌های Th17 مورد بررسی قرار نگرفته است.

با توجه به آن چه گفته شد، PPARγ درتنظیم بیان سایتوکاین‌های التهابی نقش دارد. نقش مهاری آن در تولید سایتوکاین‌های Th1 در بیماری های خودایمن و نقش مهم آن در تمایز T سل های نابالغ به سمت Th2 از طریق فعال سازی GATA-3 و از این طریق شیفت پاسخ های Th1 به سمت Th2 به اثبات رسیده است، ولی بررسی بیان PPARγ بر روی پاسخ های Th17 گزارش نشده است. از این رو مشابه مطالعات قبل، نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که افزایش بیان PPARγ در این بررسی از طریق مکانیسم مشابهی باعث کاهش سطح سایتوکین پیش التهابی IFN-γ و IL-17 می شود و از طرفی باعث افزایش سطح سایتوکاین ضد التهابی IL-10 می‌شود.

به طور کلی می توان گفت که ATRA دارای اثر درمانی بر دیابت خود ایمن القاء شده با STZ در موش از طریق افزایش بیان ژن PPARγ می باشد و می توان امیدوار بود افزودن این دارو به رژیم درمانی افراد مبتلا به دیابت خود ایمن اثرات سودمندی داشته باشد که نیازمند تحقیقات بیشتری می باشد.

منابع

1. Atkinson MA, McLaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. NEngl J Med; 1994. 31: 1428–1436.
2. Roep BO, Peakman M. Diabetogenic T lymphocytes in human type 1 diabetes. Curr Opin Immunol; 2011. 23: 746–53.
3. Kolb H. Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozotocin induced diabetes and non-obese diabetic (NOD) mice. Diabetes Metab; 1987. 3: 751–778.
4. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Roles of cytokines in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes. Cell Biochem Biophys; 2007. 48: 159-163.
5. Kang BY, Chung SW, Kim SN, Kang SN, Choe YK, Kim TS. Retinoid mediated inhibition of interleukin-12 production in mouse macrophages suppresses Th1 cytokine profile in CD4+ T cells. Br J Pharmacol; 2000. 130: 581–586.
6. Massacesi L, Castigli E, Vergelli M, Olivotto J, Abbamondi AL, Sarlo F. Immunosuppressive activity of 13-cis-retinoic acid and prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. J Clin Invest; 1991. 88: 1331–1337.
7. Escribese MM, Conde E, Martin A, Saenz-Morales D, Sancho D, Perez de Lema G, et al. Therapeutic effect of all-trans-retinoic acid (at-RA) on an autoimmune nephritis experimental model: role of the VLA-4 integrin. BMC Nephrol; 2007. 8: 3.
8. Perez de Lema G, Lucio-Cazana FJ, Molina A, Luckow B, Schmid H, de Wit C, et al. Retinoic acid treatment protects MLR/lpr lupus mice from the development of glomerular disease. Kidney Int; 2004. 66:1018–1028.
9. Brinckerhoff CE, Coffey JW, Sullivan AC. Inflammation and collagenase production in rats with adjuvant arthritis reduced with 13-cis-retinoic acid. Science; 1983. 221: 756–758.
10. Zhang X, Young HA. PPAR and immune system—what do we know? Int Immunopharmacol; 2002. 2: 1029—1044.
11. Zunino SJ, Storms D, Stephens CB. Diets rich in polyphenols and vitamin A inhibit the development of type 1 autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. J Nutr; 2007. 137: 1216–1221.
12. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. Biochem Pharmacol; 1998. 55: 1139–49.
13. Kang BY, Chung SW, Kim SN, Kang SN, Choe YK, Kim TS. Retinoidmediated inhibition of interleukin-12 production in mouse macrophages suppresses Th1 cytokine profile in CD4+ T cells. Br J Pharmacol; 2000. 130: 581–586.
14. Miljkovic D, Cvetkovic I, Momcilovic M, Maksimovic-Ivanic D, Stosic-Grujicic S, Trajkovic V. Interleukin-17 stimulates inducible nitric oxide synthase dependent toxicity in mouse beta cells. Cell Mol Life Sci; 2005. 62: 2658–68.

15. Honkanen J, Nieminen JK, Gao R, Luopajarvi K, Salo HM, Ilonen J, et al. IL-17 immunity in human type 1 diabetes. J Immunol; 2010. 185: 1959–67.

16. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. J Immunol; 1998. 160: 3513–21.

17. Abtahi Froushani SM, Esmaili Gourvarchin Galeh H. New insight into the immunomodulatory mechanisms of Tretinoin in NMRI mice. Iran J Basic Med Sci; 2014. 17: 632-637.

18. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. Nat Rev Immunol; 2010. 10(3): 170-81.

19. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy-review of a new approach. Pharmacol Rev; 2003. 55(2): 241-69.

20. Calcinaro F, Dionisi S, Marinaro M, Candeloro P, Bonato V, Marzotti S. Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. Diabetologia; 2005. 48: 1565-1575.

21. Welch JS, Ricote M, Akiyama TE, Gonzalez FJ, Glass CK. PPARγ and PPARδ negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFNγ target genes in macrophages. Proc Natl Acad Sci USA; 2003. 100: 6712–6717.

22. Natarajan C, Bright JJ. Curcumin inhibits experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through Janus kinase-STAT pathway in T lymphocytes. J Immunol; 2002. 168: 6506–13.

23. Natarajan C, Muthian G, Barak Y, Evans RM, Bright JJ. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-deficient heterozygous mice develop an exacerbated neural antigen-induced Th1 response and experimental allergic encephalomyelitis. J Immunol; 2003. 171: 5743–5750.

24. Gosset P, Charbonnier AS, Delerive P, Fontaine J, Staels B, Pestel J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. Eur J Immunol; 2001. 31: 2857—2865.

25. Saubermann LJ, Nakajima A, Wada K, Zhao S, Terauchi Y, Kadowaki T, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ligands stimulate a Th2 cytokine response and prevent acute colitis. Inflamm Bowel Dis; 2002. 8: 330—339.

26. Cunard R, Ricote M, DiCampli D, Archer DC, Kahn DA, Glass CK, et al. Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors. J Immunol; 2002. 168(6): 2795-802.

27. Gor DO, Rose NR, Greenspan NS. Th1-Th2: a procrustean paradigm. Nat Immunol; 2003. 4: 503-505.

The Immunotherapeutic Effects of All-trans retinoic acid in Type 1 Diabetic mice and its effects on expressions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPARγ*) gene

Farin Malekifard, PhD Student of Immunology, Department of Microbiology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
***Nowruz Delirezh**, Associate Professor, Department of Microbiology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (*Corresponding Author). n.delirezhac@urmia.ac.ir
Rahim Hobbenaghi, Associate Professor, Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
Hassan Malekinejad, Professor, Department of Pharmacology & Toxicology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Abstract

Background: All-trans retinoic acid (ATRA) has a variety of biological activities, including immunomodulatory action in a number of inflammatory and autoimmune diseases. The purpose of this study was to investigate the effects of all-trans retinoic acid on the treatment of autoimmune diabetes in mice and its effects on expressions of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma (*PPARγ*) gene.

Methods: Diabetes was induced by multiple low-dose of streptozotocin (MLDS) injection (40mg/kg/day for 5 consecutive days) in male C57BL/6 mice. After induction of diabetes, mice were treated with ATRA (20mg/kg/day i.p.) for 21 days. Blood glucose level was measured in 0, 7, 14 and 21 days after Streptozotocin induction induced diabetes. Splenocytes were tested for cytokines production by ELISA and Immune changes in spleens were tested by semi-quantitative RT-PCR. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test were used for comparisons between groups. $P<0.05$ was considered significant.

Results: ATRA treatment prevented hyperglycemia in the diabetic mice. ATRA treatment also significantly inhibited the production of proinflammatory cytokines interleukin 17 (IL-7) as well as interferon gamma (IFN-γ) while increased the level of anti-inflammatory cytokine IL-10 and upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPARγ*) gene expression in spleens as compared with those in diabetic control group.

Conclusion: In conclusion, these findings indicate that ATRA may have a therapeutic effect against the autoimmune destruction of the pancreatic beta-cells during the development of MLDS-induced type 1 diabetes in mice.

Keywords: Type 1 diabetes, All-trans retinoic acid, Cytokine, *PPAR γ*