

## *Effect of Carbenoxolone on Inflammatory Cytokine Levels, Fasting Blood Sugar, and Histopathology of Pancreas on Experimental Autoimmune Diabetes in C57BL/6 Mice*

Mehdi Rasouli<sup>1</sup>,  
Yaser Jafari-khataylou<sup>2</sup>,  
Javad Ashrafi-Helan<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Doctor of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz University, Tabriz, Iran

<sup>3</sup> Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz University, Tabriz, Iran

(Received December 2, 2017 ; Accepted January 31, 2018)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Destruction of insulin-producing beta cells by T cells causes type-1 diabetes (T1D). Carbenoxolone has cytoprotective and anti-inflammatory effects, and has been shown to be capable of suppressing Th17 cells that are effectively involved in the pathogenesis of type 1 diabetes, therefore, we studied the effect of Carbenoxolone on T1D in C57BL/6 mice.

**Materials and methods:** Forty male C57BL/6 inbred strain mice were randomly divided into four groups and in three groups diabetes was induced by streptozotocin. A positive control group was considered and two other groups received 50 mg/kg/day i.p. carbenoxolone (7 and 5 doses). Then, on days 7 and 14 after the disease induction, fasting blood sugar (FBS) level, anti-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , and pathological changes of the pancreas were studied during the course of the disease.

**Results:** Carbenoxolone increased the levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and FBS. Also, it significantly increased infiltration of inflammatory cells into the pancreatic islets (P <0.05).

**Conclusion:** It seems that carbenoxolone triggers a breakdown in Treg/Th17 balance by increasing the levels of pro-inflammatory cytokines and increases the number of Th17 cells, thereby causing toxic effects on the pancreatic beta cells and increasing the severity of the disease.

**Keywords:** type 1 diabetes, carbenoxolone, pre-inflammatory cytokines, histopathology of pancreas

# اثر کاربنوکسولون بر میزان سایتوکاین های التهابی، قند خون ناشتا و هیستوپاتولوژی پانکراس در دیابت خودایمن تجربی در موش های C57BL/6

مهدی رسولی<sup>۱</sup>

یاسر جعفری خطایلو<sup>۲</sup>

جواد اشرفی هلان<sup>۳</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** تخریب سلول های بتای تولید کننده انسولین به واسطه سلول های T باعث ایجاد دیابت نوع یک (T1D) می شود. از آنجایی که کاربنوکسولون دارای اثرات محافظت سلولی و ضد التهابی است و نشان داده شده که قادر به سرکوب سلول های TH17 موثر در پاتوژنز T1D می باشد، لذا در این مطالعه اثر کاربنوکسولون در بیماری T1D در موش های C57BL/6 بررسی شده است.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی، تعداد ۴۰ سر موش نر خالص C57BL/6 به صورت تصادفی به ۴ گروه تقسیم کرده و در ۳ گروه از موش ها با استرپتوزوتوسین دیابت القا شد. یک گروه کنترل مثبت و دو گروه دریافت کننده ۵۰ mg/kg/day کاربنوکسولون، به طوری که در یک گروه ۷ دز و در دیگری ۵ دز دارو به صورت داخل صفاقی تزریق شد و سپس ۷ و ۱۴ روز پس از القای بیماری به بررسی میزان قند خون ناشتا (FBS)، سایتوکین های پیش التهابی IL-1 $\beta$ ، IL-6 و TNF- $\alpha$  و تغییرات پاتولوژیک پانکراس در طی سیر بیماری پرداخته شد.

**یافته ها:** نتایج به دست آمده نشان داد که کاربنوکسولون باعث افزایش میزان IL-1 $\beta$ ، IL-6، TNF- $\alpha$  و FBS شده و نفوذ سلول های التهابی به جزایر پانکراس را افزایش می دهد که معنی دار بود ( $p < 0.05$ ).

**استنتاج:** به نظر می رسد که کاربنوکسولون با افزایش میزان سایتوکاین های پیش التهابی باعث شکستن تعادل Th17/Treg شده، تعداد سلول های Th17 افزایش یافته در نتیجه باعث ایجاد اثرات سمی روی سلول های بتای پانکراس شده و بر شدت بیماری افزوده است.

**واژه های کلیدی:** دیابت نوع یک، کاربنوکسولون، سایتوکاین های پیش التهابی، هیستوپاتولوژی پانکراس

## مقدمه

را در سلول های بتای جزایر لانگرهانس پانکراس میانجی گری می کنند. کاهش توده سلول های بتا باعث کمبود انسولین و در نتیجه آن از دست رفتن کنترل

دیابت نوع یک (Type 1 diabetes (T1D بیماری خودایمن مزمنی است که طی آن سلول های T خودواکنشگر Autoreactive آسیمی انتخابی و پیشرونده

E-mail: y.jafari@tabrizu.ac.ir

**مؤلف مسئول:** یاسر جعفری خطایلو - تبریز: دانشگاه تبریز، دانشکده دامپزشکی، بخش پاتوبیولوژی

۱. دکترای عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، ایران

۲. استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۳. استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۱۱/۲

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۹/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۱۱

مختلف سرکوب می‌کند (۹، ۱۴-۱۲) و دارای اثرات محافظت سلولی می‌باشد (۹). هم‌چنین نشان داده شده است که کاربنوکسولون به‌طور مشخصی جمعیت سلول‌های Th17 را در موش‌های مبتلا به انسفالومیلیت خودایمن تجربی<sup>۶</sup> کاهش می‌دهد و تجویز آن می‌تواند استراتژی درمانی مناسبی علیه بیماری‌های خودایمن با واسطه Th17 باشد (۱۴). از آنجایی که کاربنوکسولون دارای اثرات ضد التهابی و محافظت سلولی است و جمعیت سلول‌های Th17 موثر در پاتوژنز بیماری‌های خودایمن از جمله دیابت نوع یک را مهار می‌کند، لذا در این مطالعه به بررسی اثر کاربنوکسولون روی میزان القای IL-1 $\beta$ ، IL-6 و TNF- $\alpha$  به عنوان سایتوکاین‌های پیش التهابی و کنترل‌کننده‌های تعادل Th17/Treg و تاثیر آن را روی میزان قندخون ناشتا<sup>۷</sup> و وضعیت پاتولوژیکی پانکراس در موش‌های دیابتی C57BL/6 پرداختیم.

## مواد و روش‌ها

جامعه مورد مطالعه، شامل موش‌های نر خالص C57BL/6 با محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته بودند که از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. موش‌ها به صورت تصادفی در چهار گروه تقسیم شدند که هر گروه شامل ۱۰ موش بود.

گروه A (کنترل منفی) شامل موش‌های سالمی بود که فقط بافر سیترات با pH=۴/۵ به آن‌ها تجویز شد. گروه B (کنترل مثبت) شامل موش‌هایی بود که تنها بیماری در آن‌ها القاء شد، ۵ عدد از موش‌ها تا روز ۱۴ پس از آخرین تجویز استرپتوزوتوسین<sup>۸</sup> (شرکت Sigma، آلمان) نگهداری شده و سپس نخاعی شده و در روز ۷ پس از آخرین تجویز استرپتوزوتوسین به بررسی قند خون ناشتا پرداخته و در روز ۱۴ پس از آخرین تجویز استرپتوزوتوسین به منظور بررسی اثرات پاتولوژیکی نمونه‌برداری‌های لازم از بافت پانکراس انجام شد.

روی میزان گلوکز خون می‌شود (۱، ۲). در واقع بیماری T1D در اثر عدم تعادل بین سلول‌های T تنظیمی<sup>۱</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>foxp3<sup>+</sup> (Treg) و سلول‌های T یاریگر<sup>۲</sup> ۱۷ (Th17) تولیدکننده اینترلوکین ۳-۱۷ (IL-17) ایجاد می‌شود (۳، ۴). سلول‌های Th17 در پاتوژنز بیماری‌های خودایمن و التهابی نقش دارند، در حالی که سلول‌های Treg فعالیت سلول‌های خودواکنشگر و التهابی را کنترل می‌کنند، تعادل بین این دو جمعیت سلولی، التهاب را کنترل کرده و مسئول عملکرد مناسب سیستم ایمنی می‌باشد (۳). نشان داده شده است که در افراد مبتلا به T1D میزان خاصیت سرکوب‌کنندگی سلول‌های Treg به دست آمده از عقده لنفی درناژ کننده پانکراس، کاهش پیدا کرده و میزان ترشح سایتوکاین پیش التهابی IL-17 افزایش یافته است (۴). تمایز سلول‌های T CD4<sup>+</sup> به سلول‌های Th17 یا سلول‌های Treg بستگی به نوع سایتوکاین‌های محیط دارد (۵)، به طوری که سایتوکاین IL-6 باعث القای تمایز به سمت Th17 و مهار تمایز به Treg می‌شود و تعادل بین این دو سلول را کنترل می‌کند (۶). از طرفی نشان داده شده است که سایتوکاین‌های IL-1 $\beta$  و TNF- $\alpha$  دارای اثرات سمی و کشنده روی سلول‌های بتا پانکراس هستند (۷، ۸).

کاربنوکسولون<sup>۴</sup> یک داروی نیمه سنتتیک مشتق شده از گلیسیریتینیک اسید است که برای درمان زخم دهان، مری و معده و کنترل التهاب مورد استفاده قرار می‌گیرد (۹-۱۱). داروهای القاکننده پروتئین‌های شوک حرارتی<sup>۵</sup> از جمله کاربنوکسولون که القاء کننده خوبی برای HSP ها از جمله HSP70 می‌باشند، در متون مختلف علمی به عنوان تعدیل‌کننده‌های ایمنی در بیماری‌های خودایمنی از جمله دیابت نوع یک ذکر شده‌اند. به عنوان مثال مطالعات مختلف نشان داده‌اند که کاربنوکسولون پاسخ‌های التهابی و اکسیداتیو را وضعیت‌های پاتولوژیکی

6. Experimental autoimmune encephalomyelitis  
7. Fasting Blood Sugar (FBS)  
8. Streptozotocin (STZ)

1. Regulatory T cell (Treg)  
2. Helper T cell (Th)  
3. Interleukin  
4. Carbenoxolone  
5. Heat shock protein (HSP)

گروه C (پیشگیری<sup>۱</sup>) شامل موش‌هایی بود که ۴۸ ساعت قبل از القای بیماری هر ۲۴ ساعت ۵۰ mg/kg داروی کاربنوکسولون (شرکت Sigma، آلمان) به صورت داخل صفاقی تزریق شد (۱۶،۱۵،۹) و بعد از القاء بیماری نیز هر ۲۴ ساعت ۵۰ mg/kg دارو تزریق شد (۲ دز قبل از القای بیماری و ۵ دز بعد از القای بیماری)، به همین ترتیب ۵ عدد از موش‌ها به منظور انجام آزمایشات تا روز ۱۴ بعد از القای بیماری نگهداری شدند.

گروه D (درمانی<sup>۲</sup>) شامل موش‌هایی بود که بعد از القای بیماری هر ۲۴ ساعت ۵۰ mg/kg داروی کاربنوکسولون به صورت داخل صفاقی به آن‌ها تزریق شد. سپس ۵ عدد از موش‌ها در روزهایی مشابه روزهای فوق نخاعی شدند. هر گروه از موش‌ها در قفس‌های مجزا و تمیز در اتاقی با دمای ثابت ۲۵ °C و سیکل ۱۲ ساعته روشنایی، تاریکی نگهداری می‌شدند و به مقدار کافی به آب و غذا دسترسی داشتند.

#### القاء دیابت

قبل از تجویز هر دز STZ، موش‌ها به مدت ۴ ساعت ناشتا می‌شدند. سپس STZ را به صورت داخل صفاقی تا ۵ روز متوالی دریافت می‌کردند (ده دقیقه قبل از تزریق STZ مقدار ۵۰ mg/kg از آن در ۲۰۰ میکرو لیتر بافر سیترات با pH=۴/۵ حل می‌شد) (۱۷).

#### ارزیابی FBS موش‌ها

بدین منظور بعد از مقید کردن موش‌ها، با سرنگ‌های انسولینی اقدام به خونگیری از ورید دمی آن‌ها کرده و سپس توسط دستگاه گلوکومتر خودکار (ACCU-CHEK® Compact plus, Irland) میزان گلوکز خون آن‌ها ۷ روز پس از آخرین تزریق STZ بررسی شد (قبل از ارزیابی، تمامی گروه‌ها به مدت ۴ ساعت ناشتا شدند).

#### تهیه عصاره پانکراسی

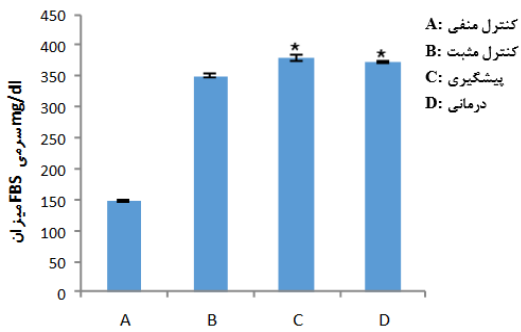
تعداد ۶ سر موش‌ها نخاعی شدند و بلافاصله پانکراس آن‌ها جمع‌آوری شده و بعد از توزین در بافر فسفات‌سالین (PBS) خنک محتوی مهارکننده پروتئاز (شرکت Sigma، آلمان) هموژنیزه شدند. بافت هموژنیزه را طی دو مرحله در دستگاه سانتریفوژ قرار داده، مرحله اول ۳۰۰۰ دور در دقیقه<sup>۳</sup> به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C و مرحله دوم ۱۲۰۰۰ RPM به مدت ۲۰ دقیقه بود. در پایان مایع رویی شفاف که همان عصاره مورد نظر است، جمع‌آوری شده و غلظت پروتئین عصاره با روش برادفورد اندازه‌گیری شد (۱۸).

#### تهیه کشت سلولی طحال

دو هفته پس از آخرین دز تجویزی STZ، موش‌ها به روش انسانی کشتار شدند و طحال آن‌ها تحت شرایط استریل جمع‌آوری شده و در پتری دیش حاوی ۵ml محیط کشت RPMI-1640 (شرکت سیگما آمریکا) شامل ۱۰ درصد آلبومین سرم گاوی (F.B.S) (شرکت Gibco آلمان) قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها به طور کامل به قطعات کوچک خرد شدند و بافت حاصل جهت تهیه سوسپانسیون سلولی و حذف قطعات بافتی اضافی از توری سیمی به قطر ۰/۱ میلی‌متر عبور داده شد. سپس سوسپانسیون سلولی به دست آمده (۳ میلی‌لیتر) در لوله‌های سانتریفوژ قرار گرفت و ۳ میلی‌لیتر فایکول (شرکت سیگما آلمان) به آرامی به آن اضافه شد، به طوری که فایکول زیر سوسپانسیون سلولی قرار گیرد و به دنبال آن به مدت ۱۵ دقیقه در ۴°C و ۶۰۰ g سانتریفوژ شد. پلاک سلولی به دست آمده ۲ بار توسط P.B.S شسته شد و سپس در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای (به تعداد cell/ml  $10^6 \times 2$  از هر نمونه) حاوی محیط کشت RPMI-1640 شامل ۱۰ درصد FBS در حضور و عدم حضور عصاره پانکراس به عنوان تحریک‌کننده آنتی‌ژنی با غلظت ۵۰  $\mu\text{g/ml}$  به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO<sub>2</sub> کشت داده شدند (۱۹).

3. RPM

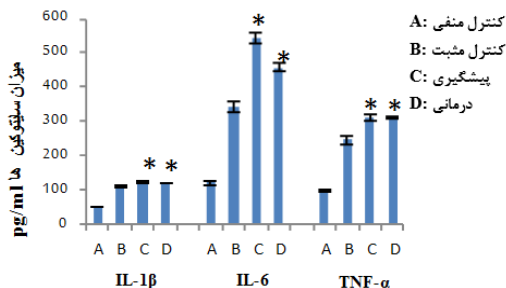
1. Prophylactic  
2. Therapeutic



نمودار شماره ۱: میزان قندخون ناشتا (FBS) ۷ روز پس از تزریق آخرین دز استرپتوزوتوسین.

\*: نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ( $p < 0.05$ ) بین گروه های دریافت کننده دارو (C و D) و گروه دیابتی کنترل (B)

اندازه گیری میزان IL-1 $\beta$ ، IL-6 و TNF- $\alpha$  در مایع روئی کشت ۷۲ ساعت سلول های طحالی در موش هایی که کاربنوکسلون دریافت کرده بودند (گروه پیشگیری و درمانی) به طور مشخصی بیش تر از موش های دیابتی کنترل بود (گروه کنترل مثبت) که این تفاوت به صورت معنی دار است ( $p < 0.05$ ) (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۱: میزان IL-1 $\beta$ ، IL-6 و TNF- $\alpha$  در مایع روئی کشت ۷۲ ساعت سلول های طحالی

\*: نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ( $p < 0.05$ ) بین گروه های دریافت کننده دارو (C و D) و گروه دیابتی کنترل (B)

میزان پرخونی و ادم جزایر لانگرهانس در موش های گروه درمانی بیش تر از گروه دیابتی کنترل بود ولی این اختلاف معنی دار نبود ( $p > 0.05$ ). میزان نکروز و خونریزی جزایر لانگرهانس در موش های گروه پیشگیری بیش تر از گروه دیابتی کنترل بوده ولی به صورت معنی دار نبود ( $p > 0.05$ ) (نمودار شماره ۳).

سنجش سائتوکین های موجود در مایع روئی کشت سلول های طحال

مایع روئی کشت سلول های طحال پس از ۷۲ ساعت جمع آوری شد و میزان سائتوکین های IL-1 $\beta$ ، IL-6 و TNF- $\alpha$  توسط کیت الیزا با حساسیت بالا (شرکت BENDERMED - اتریش) طبق پروتکل شرکت سازنده سنجش شد.

بررسی تغییرات پاتولوژیکی پانکراس

بدین منظور ۱۴ روز پس از آخرین دز تجویزی STZ موش ها نخاعی شدند، پانکراس آن ها جمع آوری شده (تمامی گروه ها) و بلافاصله در فرمالین ۱۰ درصد خنک قرار گرفتند، بعد از تهیه بلوک های پارافینی از آن ها، برش هایی با ضخامت ۵ میکرون ایجاد شده و به روش هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) رنگ آمیزی شدند. سپس لام های تهیه شده از نظر پرخونی و ادم، نکروز و خونریزی، نفوذ سلول های التهابی و فیروز جزایر لانگرهانس پانکراس توسط متخصص پاتولوژی با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. برای تعیین شدت ضایعه به صورت زیر عمل کردیم:

۰: بدون ضایعه، ۱: ضایعه در حد کم، ۲: ضایعه در حد متوسط، ۳: ضایعه شدید

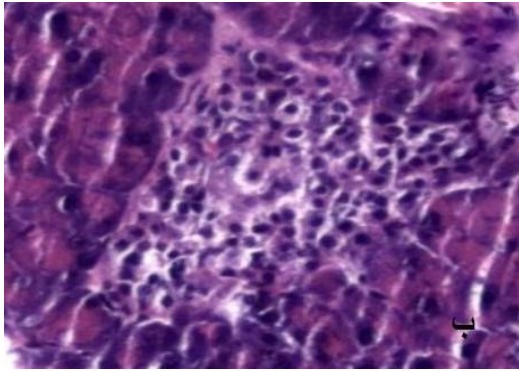
آنالیز آماری

نتایج با استفاده از Tukey HSD analysis of variance (ANOVA) و SPSS نسخه 19.0 تجزیه و تحلیل شدند. داده ها به صورت Mean  $\pm$  SEM گزارش گردید.

## یافته ها

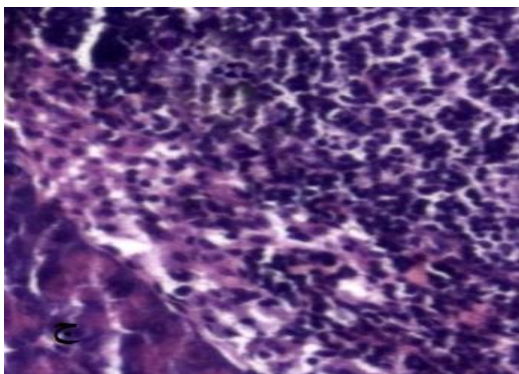
اندازه گیری میزان FBS

میزان FBS، در موش هایی که کاربنوکسلون دریافت کرده بودند (گروه پیشگیری و درمانی)، به طور مشخصی بیش تر از موش هایی بود که درمان نشده بودند (گروه کنترل مثبت) ( $p < 0.05$ ) (نمودار شماره ۱).

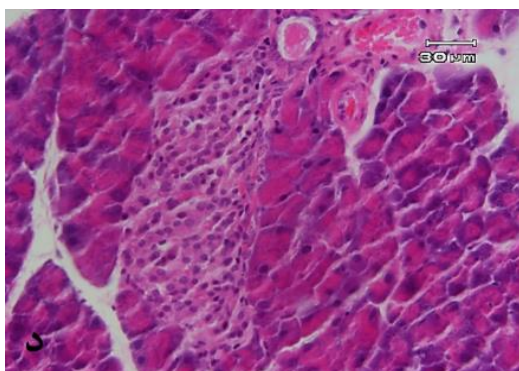


ب) نفوذ سلول های التهابی در جزایر لانگرهانس موش های گروه کنترل مثبت (دیابتی)

تصویر شماره ۱: نمای میکروسکوپییک جزایر لانگرهانس پانکراس موش های گروه های کنترل منفی و مثبت. (رنگ آمیزی H&E، بزرگ نمایی 40x)



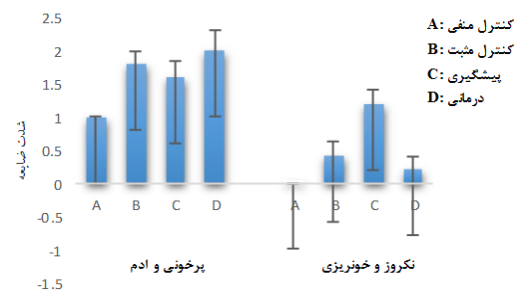
ج) نفوذ شدید سلول های التهابی در جزایر لانگرهانس موش های گروه پیشگیری (دریافت ۷ دز دارو).



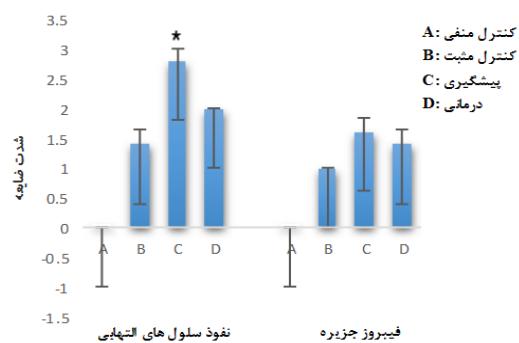
د) نفوذ سلول های التهابی در جزایر لانگرهانس موش های گروه درمانی (دریافت ۵ دز دارو).

تصویر شماره ۲: نمای میکروسکوپییک جزایر لانگرهانس پانکراس موش های گروه های پیشگیری و درمان. (رنگ آمیزی H&E، بزرگ نمایی 40x)

میزان نفوذ سلول های التهابی در جزایر لانگرهانس موش های گروه پیشگیری بیش تر از گروه دیابتی کنترل بود که این اختلاف معنی دار بود ( $p < 0.05$ ). هم چنین این میزان در موش های گروه درمانی نیز بیش تر از گروه دیابتی کنترل بود، اگرچه معنی دار نبود ( $p > 0.05$ ). میزان فیروز جزایر لانگرهانس موش های گروه پیشگیری و درمانی بیش تر از گروه دیابتی کنترل بود، اگرچه این اختلاف معنی دار نبود ( $p > 0.05$ ) (نمودار شماره ۴).

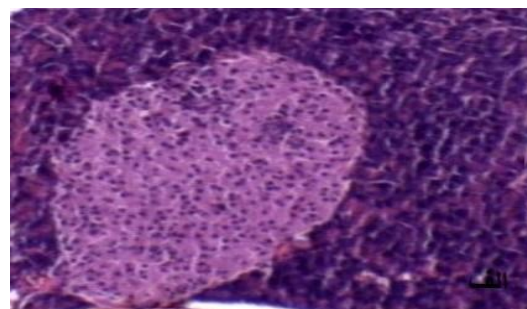


نمودار شماره ۳: میزان پرخونی و ادم و نکروز و خونریزی در بافت پانکراس



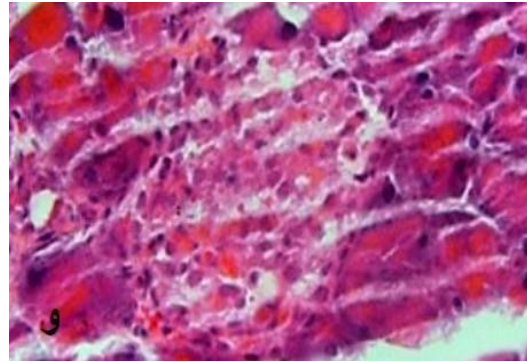
نمودار شماره ۴: میزان فیروز و نفوذ سلول های التهابی در جزایر لانگرهانس پانکراس

\*: نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ( $p < 0.05$ ) بین گروه پیشگیری (C) و گروه دیابتی کنترل (B)

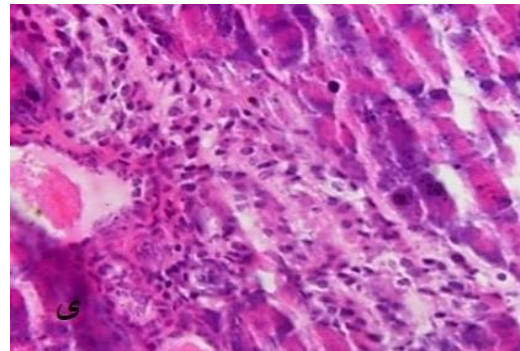


الف) سیمای بافتی طبیعی در موش های گروه کنترل منفی (سالم)،

سلولی در نورون ها می شود (۲۰). در مطالعه ای مشخص شد که تجویز کاربنو کسولون به مقدار زیاد اثر کشندگی دارد (۲۱). حسینی جزئی و همکاران که از دزهای مختلف کاربنو کسولون برای کاهش التهاب ناشی از لیپوپولی ساکارید<sup>۲</sup> سالمونلا انتریکا در موش استفاده کردند نشان داد که دز ۲۰ mg/kg کاربنو کسولون باعث کم ترین میزان مرگ و میر در موش ها می شود و دزهای بالاتر درصد مرگ و میر ناشی از LPS را در موش ها افزایش می دهند (۲۱). از طرف دیگر Li و همکاران نشان دادند که کاربنو کسولون در غلظت بالا (۵۰ μmol/L<sup>۳</sup>) اثرات سمی سلولی قابل توجهی روی سلول های RAW 264.7<sup>۴</sup> دارد، به طوری که به جای کاهش<sup>۵</sup> HMGB1 باعث افزایش آن می شود (۲۲). HMGB1 فاکتور نسخه برداری سایتوکاین های پیش التهابی است که نقش مهمی در اختلالات خودایمنی مختلف ایفا می کند (۲۳). این پروتئین از ماکروفاژها، مونوسیت ها و پیتوسیت<sup>۶</sup> هایی که در معرض LPS، TNF یا IL-1β فعال شده اند ترشح می شود. هم چنین به صورت غیرفعال از سلول های آسیب دیده و نکروتیک آزاد می گردند. اضافه کردن HMGB1 به محیط کشت مونوسیت ها، آزادسازی TNF، IL-1β، IL-1α، IL-1Ra، IL-6، IL-8، MIP-1α و MIP-1β را تحریک می کند (۲۴). هم چنین مطالعات Fu و همکاران نشان داد که HMGB1 باعث افزایش تولید سایتوکاین های IL-1β، IL-6 و TNF-α در موش های C57BL/6 مبتلا به سندروم زجر تنفسی حاد<sup>۷</sup> می شود (۲۵). از طرفی در مطالعه ای که اخیراً انجام شد، نتایج نشان داد که درمان با آنتی بادی ضد HMGB1 باعث کاهش بیان سایتوکاین های پیش التهابی مانند IL-1β و TNF-α می شود (۲۶). مطالعات Zhang و همکاران بر روی مدل موشی آسم نوتروفیلیک نشان داد که ارتباط مثبتی بین



و) پرخونی، خونریزی و نکروز همراه با تخریب سلول های جزیره لانگرهانس،



ی) فیروز در جزیره لانگرهانس

تصویر شماره ۳: نمای میکروسکوپی جزایر لانگرهانس پانکراس موش های گروه پیشگیری (رنگ آمیزی H&E، بزرگ نمایی 40x)

## بحث

در این مطالعه به بررسی اثر کاربنو کسولون در دیابت خودایمن در موش های نژاد خالص C57BL/6 پرداختیم. مطالعه ما نشان داد که این دارو میزان سایتوکاین های پیش التهابی IL-1β، IL-6 و TNF-α را در موش های درمان شده (گروه پیشگیری و درمانی) افزایش می دهد که در مقایسه با موش های دیابتی درمان نشده (گروه کنترل مثبت) این تفاوت معنی دار بود. به نظر می رسد که کاربنو کسولون در این مطالعه با افزایش بیان سایتوکاین های پیش التهابی باعث ایجاد اثرات سمی در موش های دیابتی شده است. مطالعات Zündorf و همکاران نشان داد که کاربنو کسولون سمیت سلولی با واسطه<sup>۱</sup> NMDA را افزایش داده و باعث افزایش مرگ

2. Lipopolysaccharide (LPS)

3. Micromole per liter

4. Murine macrophage like RAW 264.7 cells

5. High mobility group box1

6. Pituicyte

7. Acute respiratory distress syndrome

1. N-methyl-D-aspartate

افزایش بیان HMGB1 و التهاب مجاری هوایی با واسطه سلول‌های Th17 وجود دارد، به طوری که القای HMGB1 باعث افزایش پلازماسیون سلول‌های Th17 شده و مهار آن پاسخ‌های Th17 را سرکوب می‌کند (۲۸، ۲۷). هم‌چنین مطالعات Shi و همکاران که رابطه بین سایتوکاین‌های Th17 و HMGB1 را در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید بررسی کردند نشان داد که HMGB1 باعث افزایش تمایز به Th17 در شرایط آزمایشگاهی<sup>۱</sup> می‌شود (۲۹). در این مطالعه به نظر می‌رسد که کاربنوکسولون از طریق افزایش بیان HMGB1 باعث افزایش میزان سایتوکاین‌های پیش‌التهابی شده و در نتیجه تمایز به سمت Th17 افزایش پیدا کرده است.

نشان داده شده است که تمایز سلول‌های  $T CD4^+$  به سلول‌های Th17 یا سلول‌های Treg به نوع سایتوکاین‌های محیط بستگی دارد (۵)، به طوری که فاکتور رشد تغییردهنده-بتا<sup>۲</sup> (TGF- $\beta$ ) تولید سلول‌های Treg را القا می‌کند، در حالی که TGF- $\beta$  همراه با IL-6 (که در مطالعه ما افزایش یافته است) تولید سلول‌های Treg را مهار کرده و باعث افزایش تولید سلول‌های پیش‌التهابی Th17 می‌شود (۵، ۳۰، ۳۱). پس می‌توان گفت که تعادل بین سلول‌های Treg و Th17 به وسیله IL-6 کنترل می‌شود (۶) و فراوانی این دو جمعیت سلولی ارتباط معکوسی با هم دارند (۳۱). Garbers و همکاران در مدل موشی آرتریت القا شده با کلاژن نشان دادند که آنتی‌بادی خنثی‌کننده ضد گیرنده IL-6 (IL-6R) با کاهش درصد سلول‌های Th17 و افزایش درصد سلول‌های Treg به طور مشخصی میزان بیماری را کاهش می‌دهد (۳۲). هم‌چنین مطالعات Ryba-Stanisławowska و همکاران نشان دادند مقادیر افزایش یافته IL-6 که در بیماران مبتلا به دیابت نوع یک دیده می‌شود، باعث تغییر تعادل Treg/Th17 به سمت سلول‌های التهابی Th17 می‌شود (۶). از طرفی مطالعات Ryba و همکاران نشان داد که TNF- $\alpha$  (که در مطالعه

ما افزایش پیدا کرده است) فراوانی سلول‌های Treg را در بچه‌های مبتلا به T1D کاهش می‌دهد و درمان با آنتی‌بادی ضد TNF- $\alpha$  در شرایط آزمایشگاهی اثر مثبتی روی جمعیت این سلول‌ها می‌گذارد (۳۳). پس به عنوان یک فرضیه می‌توان گفت که کاربنوکسولون با القای HMGB1 باعث افزایش سایتوکاین‌های پیش‌التهابی IL-1 $\beta$ ، IL-6 و TNF- $\alpha$  شده، سپس IL-6 با افزایش فراوانی سلول‌های Th17 و کاهش فراوانی سلول‌های Treg و TNF- $\alpha$  با کاهش فراوانی سلول‌های Treg باعث تشدید بیماری دیابت تیپ یک شده‌اند. در بررسی‌های پاتولوژی، شاهد افزایش شدت نفوذ سلول‌های التهابی به جزایر لانگرهانس پانکراس در موش‌های درمان شده گروه پیشگیری نسبت به گروه دیابتی کنترل بودیم که اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد که نشان دهنده افزایش شدت بیماری در این گروه است. از طرفی ضایعات پرخونی و ادم در گروه درمانی و نکروز و خونریزی در گروه پیشگیری نسبت به گروه کنترل مثبت شدت بیش‌تری داشت اما اختلافات معنی‌دار نبود، هم‌چنین شدت فیروز جزایر در گروه‌های درمان‌شده با دارو (گروه‌های پیشگیری و درمانی) بیش‌تر از گروه دیابتی کنترل بود، هرچند نتایج معنی‌دار نبود.

مطالعات Ngamjariyawat و همکاران در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که کاربنوکسولون در محیط کشت حاوی سایتوکین‌های پیش‌التهابی IFN- $\gamma$  و IL-1 $\beta$  به عنوان القاکننده مرگ سلول‌های بتای تولیدکننده انسولین نه تنها اثر محافظتی ایجاد نکرد بلکه باعث افزایش مرگ سلول‌های بتا شد (۳۴) که در راستای مطالعه ما بود.

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که سلول‌های Th17 نقشی حیاتی در پاتوژنز بیماری دیابت تیپ یک دارند و سایتوکاین IL-17 مشتق از این سلول‌ها اثرات سمیت سلولی روی سلول‌های بتا انسانی دارد، به طوری که پاسخ‌های التهابی را در سلول‌های جزایر پانکراس افزایش داده و اثر پروآپوپتوزی IL-1 $\beta$  را در این سلول‌ها شدت

1. In vitro  
2. Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )



تحقیق داشتیم که از آن جمله می توان به القاء بیماری دیابت خود ایمن نوع یک، زنده نگهداشتن موش ها در طی القاء بیماری دیابت تیپ یک، تهیه دشوار عصاره هموژنیزه پانکراسی و جداسازی بسیار سخت سلول های طحالی، می توان گفت که اگرچه کاربنوکسلون دارای اثرات ضد التهابی و محافظت سلولی است، به نظر می رسد کاربنوکسلون با افزایش تولید سایتوکاین های پیش التهابی، باعث القای تمایز سلول های  $CD4^+$  T به Th17 و مهار تمایز به Treg شده، نفوذ سلول های التهابی به جزایر پانکراس را افزایش داده، و با تخریب سلول های بتای تولید کننده انسولین باعث افزایش FBS و تشدید بیماری دیابت نوع یک در موش های C57BL/6 شده است.

### سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس خود را نسبت به پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه و هم چنین آقای حقی مسئول آزمایشگاه آسیب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز ابراز می دارند.

### References

1. Malekifard F, Delirezh N, Hobbenaghi R, Malekinejad H. Therapeutic Effects of Tretinoin on Plasma Insulin and Nitric Oxide Levels in Streptozotocin-induced Diabetes in C57BL/6 Mice. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2016; 26(136): 1-8 (Persian).
2. Aribi M. Autoimmunity and Immunotherapy of Type 1 Diabetes. In: *Type 1 Diabetes- Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy*. Wagner D. Colorado, In Tech Pub; 2011.
3. Ryba-Stanisławowska M, Skrzypkowska M, Myśliwiec M, Myśliwska J. Loss of the balance between  $CD4^+$  Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells and  $CD4^+$  IL17A<sup>+</sup> Th17 cells in patients with type 1 diabetes. *Hum Immunol* 2013; 74(6): 701-707.
4. Ferraro A, Socci C, Stabilini A, Valle A, Monti P, Piemonti L, et al. Expansion of Th17 cells and functional defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2011; 60(11): 2903-2913.
5. Shi B, Wang Z, Jin H, Chen YW, Wang Q, Qian Y. Immunoregulatory Cordyceps sinensis increases regulatory T cells to Th17 cell ratio and delays diabetes in NOD mice. *Int Immunopharmacol* 2009; 9(5): 582-586.
6. Ryba-Stanisławowska M, Skrzypkowska M, Myśliwska J, Myśliwiec M. The serum IL-6 profile and Treg/Th17 peripheral cell populations in patients with type 1 diabetes. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 1-7.

می بخشید (۳۶،۳۵). هم چنین نشان داده شده است که سلول های Th17 با القای سایتوکاین های پیش التهابی  $IL-1\beta$ ، IL-6 و  $TNF-\alpha$  و کموکاین های التهابی بافتی را تشدید کرده و باعث بسیج شدن سلول های T اجرایی به بافت هدف می شوند (۳۷). از طرفی مطالعات Emamaullee و همکاران نشان داد که درمان با IL-25 و آنتی بادی علیه IL-17 باعث کاهش تورم جزایر پانکراس و مهار سلول های Th17 با IL-25 و آنتی بادی علیه IL-17 باعث کاهش ارتشاح سلول های T التهابی اختصاصی و افزایش سلول های T تنظیمی در اطراف جزایر می شود (۳۸). به نظر می رسد که سایتوکاین های پیش التهابی با القای تمایز به سمت Th17 باعث افزایش نفوذ سلول های التهابی به جزایر لانگرهانس پانکراس شده اند.

در ارتباط با نتایج ارزیابی میزان FBS، شاهد افزایش معنی دار میزان این پارامتر در موش های درمان شده با کاربنوکسلون نسبت به موش های درمان نشده بودیم که نشان دهنده افزایش تخریب سلول های بتای پانکراس و کاهش تولید انسولین می باشد. در پایان، صرف نظر از مشکلاتی که در انجام این

7. Dogan Y, Akarsu S, Ustundag B, Yilmaz E, Gurgoze MK. Serum IL-1 $\beta$ , IL-2, and IL-6 in insulin-dependent diabetic children. *Mediators Inflamm* 2006; 2006 (1): 59206.
8. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Role of cytokines in the pathogenesis of autoimmune diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord* 2003; 4(3): 291-299.
9. Zhang X, Gao S, Tanaka M, Zhang Z, Huang Y, Mitsui T, et al. Carbenoxolone inhibits TRPV4 channel initiated oxidative urothelial injury and ameliorates cyclophosphamide induced bladder dysfunction. *J Cell Mol Med* 2017; 21(9): 1791-1802.
10. Moosavi MA, Asadi M, Asvadi Kermani I. Inhibition of survivin and its anti-apoptotic splice variant sur- $\Delta$  Ex3 genes expression followed by apoptosis through carbenoxolone in K562 cells. *AMUJ* 2011; 14(4): 86-96 (Persian).
11. Moosavi M, Moasses Ghafary S, Asvadi kermani I, Hamzeiy H, Rahmati M, Ahmadi A, et al. Carbenoxolone induces apoptosis and inhibits survivin and survivin- $\Delta$ Ex3 genes expression in human leukemia K562 cells. *DARU* 2011; 19(6): 455-461 (Persian).
12. Ram A, Singh SK, Singh VP, Kumar S, Ghosh B. Inhaled carbenoxolone prevents allergic airway inflammation and airway hyperreactivity in a mouse model of asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2009; 149(1): 38-46.
13. Shijie J, Takeuchi H, Yawata I, Harada Y, Sonobe Y, Doi Y, et al. Blockade of glutamate release from microglia attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Tohoku J Exp Med* 2009; 217(2): 87-92.
14. Endong L, Shijie J, Sonobe Y, Di M, Hua L, Kawanokuchi J, et al. The gap-junction inhibitor carbenoxolone suppresses the differentiation of Th17 cells through inhibition of IL-23 expression in antigen presenting cells. *J Neuroimmunol* 2011; 240: 58-64.
15. Leshchenko Y, Likhodii S, Yue W, Burnham WM, Velazquez JLP. Carbenoxolone does not cross the blood brain barrier: an HPLC study. *BMC Neurosci* 2006; 7(1): 3.
16. Dhanesha N, Joharapurkar A, Shah G, Kshirsagar S, Dhote V, Sharma A, et al. Inhibition of 11 $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase 1 by carbenoxolone affects glucose homeostasis and obesity in db/db mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012; 39(1): 69-77.
17. Choi J, Uchino H, Azuma K, Iwashita N, Tanaka Y, Mochizuki H, et al. Little evidence of transdifferentiation of bone marrow-derived cells into pancreatic beta cells. *Diabetologia* 2003; 46(10): 1366-1374.
18. Sabz FTK, Farokhi F, Delirez N, Javadi S, Chapari H. In-vitro differentiation of rat peripheral blood monocytes into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. *Tehran Univ Med J* 2011; 69(4) (Persian).
19. Mosayebi G, Ghazaavi A, Payani M. Effect of sesame oil on production of IFN- $\gamma$  and IL-10 from TH1 and TH2 cells in autoimmune encephalomyelitis on mice. *Med J Tabriz Univ Med Sci* 2007; 29(3): 99-104 (Persian).
20. Zündorf G, Kahlert S, Reiser G. Gap junction blocker carbenoxolone differentially enhances NMDA induced cell death in hippocampal neurons and astrocytes in co culture. *J Neurochem* 2007; 102(2): 508-521.
21. Hosseini Jazani N, Mehdi Shishavan M, Shahabi S, Ilkhanizadeh B, Mansourafshar B. Investigation Of The Effect Of Carbenoxolone In Reduction Of Inflammation Severity Induced By Salmonella Enterica Lps In A Mouse Model. *Biological Journal of Microorganism* 2012; 1(3): 29-40 (Persian).

22. Li W, Li J, Sama AE, Wang H. Carbenoxolone blocks endotoxin-induced protein kinase R (PKR) activation and high mobility group box 1 (HMGB1) release. *Mol Med* 2012; 19(1): 203-211.
23. Imbalzano E, Quartuccio S, Di Salvo E, Crea T, Casciaro M, Gangemi S. Association between HMGB1 and asthma: a literature review. *Clin Mol Allergy* 2017; 15(1): 12.
24. Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. HMGB1 as a cytokine and therapeutic target. *J Endotoxin Res* 2002; 8(6): 469-472.
25. Fu J, Lin S-h, Wang C-j, Li S-y, Feng X-y, Liu Q, et al. HMGB1 regulates IL-33 expression in acute respiratory distress syndrome. *Int Immunopharmacol* 2016; 38: 267-274.
26. Xu M, Zhou G-m, Wang L-h, Zhu L, Liu J-M, Wang X-d, et al. Inhibiting High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) Attenuates inflammatory cytokine expression and neurological deficit in ischemic brain injury following cardiac arrest in rats. *Inflammation* 2016; 39(4): 1594-1602.
27. Zhang F, Huang G, Hu B, Fang L-P, Cao E, Xin X-F, et al. Anti-HMGB1 neutralizing antibody ameliorates neutrophilic airway inflammation by suppressing dendritic cell-mediated Th17 polarization. *Mediators Inflamm* 2014 (2014): 1-11.
28. Zhang F, Huang G, Hu B, Qian G-s, Song Y. Recombinant HMGB1 A box protein inhibits Th17 responses in mice with neutrophilic asthma by suppressing dendritic cell-mediated Th17 polarization. *Int Immunopharmacol* 2015; 24(1): 110-118.
29. Shi Y, Sandoghchian Shotorbani S, Su Z, Liu Y, Tong J, Zheng D, et al. Enhanced HMGB1 expression may contribute to Th17 cells activation in rheumatoid arthritis. *Clin Dev Immunol* 2012 (2012): 1-8.
30. MartinOrozco N, Chung Y, Chang SH, Wang YH, Dong C. Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells. *Eur J Immunol* 2009; 39(1):216-224.
31. Kleinewietfeld M, Hafler DA. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Sem Immunol* 2013; 25(4): 305-312.
32. Garbers C, Rose John S. The balance between Treg and TH17 cells: CD11b and interleukin 6. *Eur J Immunol* 2017; 47(4): 629-632.
33. Ryba M, Marek N, Hak Ł, Rybarczyk-Kapturska K, Myśliwiec M, Trzonkowski P, et al. Anti-TNF rescue CD4+ Foxp3+ regulatory T cells in patients with type 1 diabetes from effects mediated by TNF. *Cytokine* 2011; 55(3): 353-361.
34. Ngamjariyawat A, Turpaev K, Vasylovska S, Kozlova EN, Welsh N. Co-Culture of Neural Crest Stem Cells (NCSC) and Insulin Producing Beta-TC6 Cells Results in Cadherin Junctions and Protection against Cytokine-Induced Beta-Cell Death. *PloS one* 2013; 8(4): e61828.
35. Li Y, Liu Y, Chu C-Q. Th17 cells in type 1 diabetes: role in the pathogenesis and regulation by gut microbiome. *Mediators Inflamm* 2015; 2015: 1-7.
36. Solt LA, Burris TP. Th17 cells in Type 1 diabetes: a future perspective. *Diabetes Manag (Lond)* 2015; 5(4): 247-250.
37. Dardalhon V, Korn T, Kuchroo VK, Anderson AC. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J Autoimmun* 2008; 31(3): 252-256.
38. Emamaullee JA, Davis J, Merani S, Toso C, Elliott JF, Thiesen A, et al. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 2009; 58(6): 1302-1311.