ORIGINAL ARTICLE

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

Mehdi Rasouli[1],
Yaser Jafari-khataylou[2],
Javad Ashrafi-Helan[3]

[1] Doctor of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[2] Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz University, Tabriz, Iran
[3] 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-1β, IL-6 and TNF-α, and pathological changes of the pancreas were studied during the course of the disease.

Results: Carbenoxolone increased the levels of IL-1β, IL-6, TNF-α, 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

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (161): 1-11 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-08-02]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۶۱ خرداد سال ۱۳۹۷ (۱۱-۱)

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

مهدی رسولی[۱]
یاسر جعفری خطایلو[۲]
جواد اشرفی هلان[۳]

چکیده

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

مواد و روش‌ها: 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 موش‌ها 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)، سایتوکین‌های پیش التهابی IL-1β، IL-6 و TNF-α و تغییرات پاتولوژیک پانکراس در طی سیر بیماری پرداخته شد.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده نشان داد که کاربنوکسولون باعث افزایش میزان IL-1β، IL-6، TNF-α و FBS شده و نفوذ سلول های التهابی به جزایر پانکراس را افزایش می‌دهد که معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$).

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

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

مقدمه

دیابت نوع یک Type 1 diabetes (T1D) بیماری خودایمن مزمنی است که طی آن سلول‌های T خودواکنشگر Autoreactive آسیبی انتخابی و پیشرونده را در سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس پانکراس میانجی‌گری می‌کنند. کاهش توده سلول‌های بتا باعث کمبود انسولین و در نتیجه آن از دست رفتن کنترل

مولف مسئول: یاسر جعفری خطایلو- تبریز: دانشگاه تبریز، دانشکده دامپزشکی، بخش پاتوبیولوژی E-mail:y.jafari@tabrizu.ac.ir
۱. دکترای عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، ایران
۲. استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۳. استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۹/۱۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۶/۹/۲۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۱۱/۲

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-08-02]

روی میزان گلوکز خون می‌شود(۲،۱). در واقع بیماری T1D در اثر عدم تعادل بین سلول‌های T تنظیمی[1] $CD4^+CD25^+foxp3^+$ (Treg) و سلول های T یاریگر[2] ۱۷ (Th17) تولیدکننده اینترلوکین[3]-۱۷ (IL-17) ایجاد می‌شود(۴،۳). 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 کنترل‌کرده ومسئول 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 $T\ CD4^+$ 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-1β و TNF-α دارای اثرات سمی و کشنده روی سلول های بتا پانکراس هستند(۷، ۸).

کاربنوکسولون[4] 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(۱۱-۹). داروهای القاکننده پروتئین های شوک حرارتی[5] از جمله کاربنوکسولون که القاءکننده خوبی برای HSP ها از جمله HSP70 می‌باشند، در متون مختلف علمی به‌عنوان 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 مختلف سرکوب می‌کند(۱۴،۹-۱۲) 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[6] کاهش می‌دهد و تجویز آن می‌تواند استراتژی درمانی مناسبی علیه بیماری‌های خودایمن با واسطه Th17 باشد(۱۴). از آن‌جایی‌که کاربنوکسولون دارای اثرات ضد التهابی ومحافظت سلولی است و جمعیت سلول‌های Th17 موثر در پاتوژنز بیماری های خودایمن از جمله دیابت نوع یک را مهار می‌کند، لذا در این مطالعه به بررسی اثر کاربنوکسولون روی میزان القای IL-1β، IL-6 و TNF-α به عنوان سایتوکاین‌های پیش التهابی و کنترل‌کننده‌های تعادل Th17/Treg و تاثیر آن را روی میزان قندخون ناشتا[7] و وضعیت پاتولوژیکی پانکراس در موش‌های دیابتی C57BL/6 پرداختیم.

مواد و روش ها

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 آن ها القاء شد، ۵ عدد از موش‌ها تا روز ۱۴ پس از آخرین تجویز استرپتوزوتوسین[8](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 پاتولوژیک نمونه‌برداری‌های لازم از بافت پانکراس انجام شد.

1. Regulatory T cell (Treg)
2. Helper T cell (Th)
3. Interleukin
4. Carbenoxolone
5. Heat shock protein (HSP)
6. Experimental autoimmune encephalomyelitis
7. Fasting Blood Sugar (FBS)
8. Streptozotocin (STZ)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-08-02]

گروه C (پیشگیری[1]) 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(۹،۱۵،۱۶) 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[2]) شامل موش‌هایی بود که بعد از القای بیماری هر۲۴ ساعت ۵۰ mg/kg داروی کاربنوکسولون به صورت داخل صفاقی به آن ها 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 °C ۲۵ 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 آن ها 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[3] 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 آن ها تحت شرایط استریل جمع آوری 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 نمونه ها 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 سانتریفیوژ قرار گرفت و ۳ میلی لیتر 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 سانتریفیوژ شد. پلاک سلولی به دست آمده ۲ بار توسط P.B.S شسته شد و سپس در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای (به تعداد cell/ml ۲×۱۰^{۶} 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 µg/ml ۵۰ به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO2 کشت داده شدند(۱۹).

1. Prophylactic
2. Therapeutic
3. RPM

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-08-02]

سنجش سایتوکین‌های موجود در مایع رویی کشت سلول های طحال

مایع رویی کشت سلول های طحال پس از ۷۲ ساعت جمع آوری شد و میزان سایتوکاین های IL-1β، IL-6 و TNF-α توسط کیت الایزا 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 موش‌ها نخاعی شدند، پانکراس آن ها جمع‌آوری شده (تمامی گروه‌ها) و بلافاصله در فرمالین ۱۰ درصد خنک قرار گرفتند، بعد از تهیه بلوک‌های پارافینی از آن ها، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون ایجاد شده و به روش هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. سپس لام‌های تهیه شده از نظر پرخونی و ادم، نکروز و خونریزی، نفوذ سلول‌های التهابی و فیبروز 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

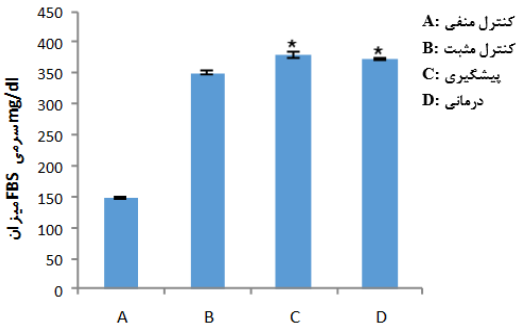
آنالیز آماری

نتایج با استفاده از Tukey HSD، analysis of variance (ANOVA) و SPSS نسخه 19.0 تجزیه و تحلیل شدند. داده‌ها به صورت Mean ± SEM گزارش گردید.

یافته ها

اندازه‌گیری میزان FBS

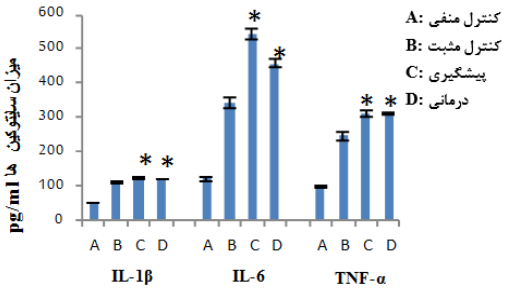
میزان FBS، در موش‌هایی که کاربنوکسولون دریافت کرده بودند (گروه پیشگیری و درمانی)، به‌طور مشخصی بیش‌تر از موش‌هایی بود که درمان نشده بودند (گروه کنترل مثبت) ($p < ۰/۰۵$) (نمودار شماره ۱).



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

*: نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ($p < ۰/۰۵$) بین گروه های دریافت کننده دارو (C و D) و گروه دیابتی کنترل (B)

اندازه‌گیری میزان IL-1β، IL-6 و TNF-α در مایع روئی کشت ۷۲ ساعت سلول‌های طحالی در موش‌هایی که کاربنوکسولون دریافت کرده بودند (گروه پیشگیری و درمانی) به طور مشخصی بیش‌تر از موش‌های دیابتی کنترل بود (گروه کنترل مثبت) که این تفاوت به صورت معنی دار است ($p < ۰/۰۵$) (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۱: میزان IL-1β، IL-6 و TNF-α در مایع روئی کشت ۷۲ ساعت سلول های طحالی

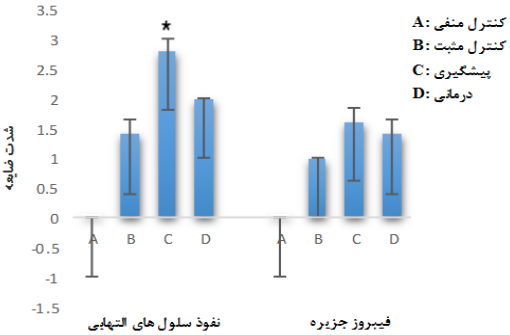
*: نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ($p < ۰/۰۵$) بین گروه های دریافت کننده دارو (C و D) و گروه دیابتی کنترل (B)

میزان پرخونی و ادم جزایر لانگرهانس در موش‌های گروه درمانی بیش‌تر از گروه دیابتی کنترل بود ولی این اختلاف معنی‌دار نبود ($p > ۰/۰۵$). میزان نکروز و خونریزی جزایر لانگرهانس در موش‌های گروه پیشگیری بیش‌تر از گروه دیابتی کنترل بوده ولی به صورت معنی‌دار نبود ($p > ۰/۰۵$) (نمودار شماره ۳).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-08-02]

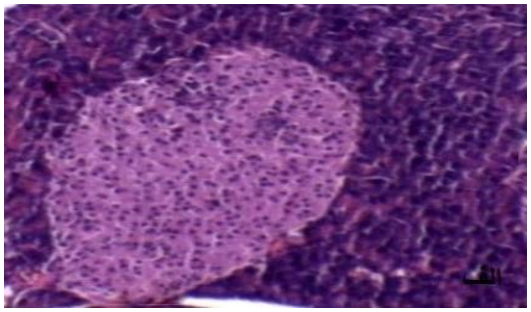
میزان نفوذ سلول‌های التهابی در جزایر لانگرهانس موش‌های گروه پیشگیری بیش تر از گروه دیابتی کنترل بود که این اختلاف معنی‌دار بود (p <۰/۰۵). هم چنین این میزان در موش‌های گروه درمانی نیز بیش‌تر از گروه دیابتی کنترل بود، اگرچه معنی‌دار نبود (p >۰/۰۵). میزان فیبروز جزایر لانگرهانس موش‌های گروه پیشگیری و درمانی بیش‌تر از گروه دیابتی کنترل بود، اگرچه این اختلاف معنی‌دار نبود (p >۰/۰۵) (نمودار شماره ۴).

نمودارشماره ۳: میزان پرخونی و ادم و نکروز وخونریزی در بافت پانکراس

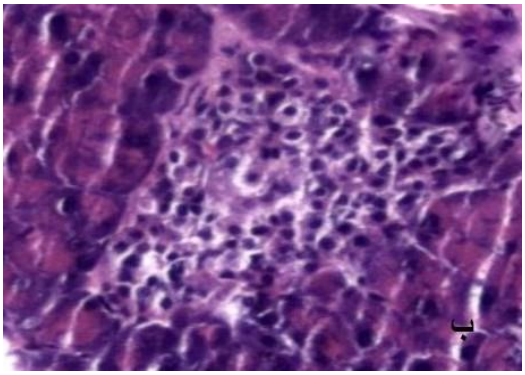


نمودار شماره ۴: میزان فیبروز و نفوذ سلول های التهابی در جزایر لانگرهانس پانکراس

*: نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح (p <۰/۰۵) بین گروه پیشگیری (C) و گروه دیابتی کنترل (B)

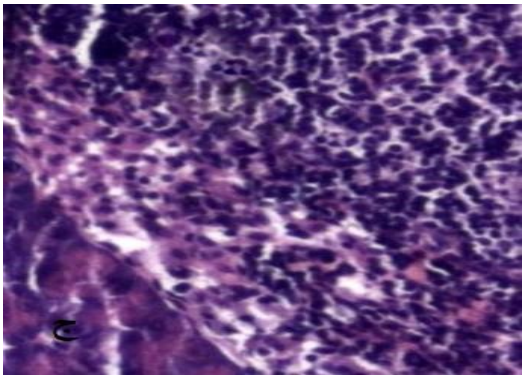


الف) سیمای بافتی طبیعی در موش های گروه کنترل منفی (سالم)،

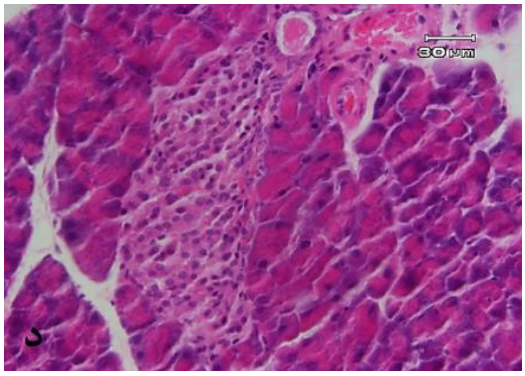


ب) نفوذ سلول های التهابی در جزایر لانگرهانس موش های گروه کنترل مثبت (دیابتی)

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



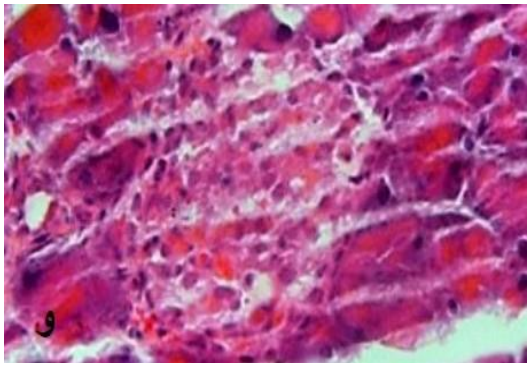
ج) نفوذ شدید سلول‌های التهابی در جزایر لانگرهانس موش‌های گروه پیشگیری (دریافت ۷ دز دارو).



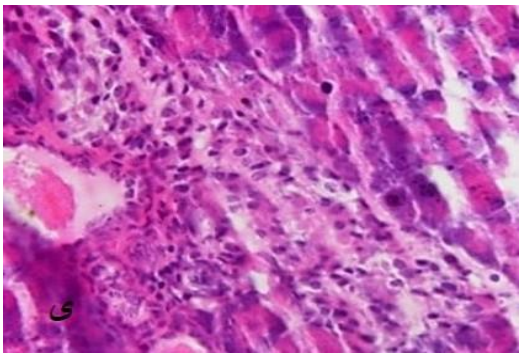
د) نفوذ سلول های التهابی در جزایر لانگرهانس موش‌های گروه درمانی (دریافت ۵ دز دارو).

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-08-02]



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



ی) فیبروز در جزیره لانگرهانس

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

بحث

در این مطالعه به بررسی اثر کاربنوکسولون در دیابت خودایمن در موش‌های نر نژاد خالص C57BL/6 پرداختیم. مطالعه ما نشان داد که این دارو میزان سایتوکاین‌های پیش التهابی IL-1β، IL-6 و TNF-α را در موش‌های درمان شده (گروه پیشگیری و درمانی) افزایش می دهد که در مقایسه با موش‌های دیابتی درمان نشده (گروه کنترل مثبت) این تفاوت معنی‌دار بود. به نظر می‌رسد که کاربنوکسولون در این مطالعه با افزایش بیان سایتوکین‌های پیش‌التهابی باعث ایجاد اثرات سمی در موش‌های دیابتی شده است. مطالعات Zündorf و همکاران نشان داد که کاربنوکسولون سمیت سلولی با واسطه NMDA[1] را افزایش داده و باعث افزایش مرگ سلولی در نورون ها می‌شود(۲۰). در مطالعه ای مشخص شد که تجویز کاربنوکسولون به مقدار زیاد اثر کشندگی دارد(۲۱). حسینی جزنی و همکاران که از دزهای مختلف کاربنوکسولون برای کاهش التهاب ناشی از لیپوپلی‌ساکارید[2] سالمونلا انتریکا در موش استفاده کردند نشان داد که دز ۲۰ mg/kg کاربنوکسولون باعث کم ترین میزان مرگ و میر در موش‌ها می‌شود و دزهای بالاتر درصد مرگ و میر ناشی از LPS را در موش‌ها افزایش می‌دهند(۲۱). از طرف دیگر Li و همکاران نشان دادند که کاربنوکسولون در غلظت بالا (۵۰ μmol/L[3]) اثرات سمی سلولی قابل توجهی روی سلول های RAW 264.7[4] دارد، به طوری که به جای کاهش HMGB1[5] باعث افزایش آن می‌شود(۲۲). HMGB1 فاکتور نسخه برداری سایتوکاین‌های پیش التهابی است که نقش مهمی در اختلالات خودایمنی مختلف ایفا می‌کند(۲۳). این پروتئین از ماکروفاژها، مونوسیت‌ها و پیتوسیت[6] هایی که در معرض LPS، TNF یا IL-1β فعال شده اند ترشح می‌شود. هم‌چنین به صورت غیرفعال از سلول‌های آسیب دیده و نکروتیک آزاد می گردند. اضافه کردن HMGB1 به محیط کشت مونوسیت‌ها، آزادسازی TNF، IL-1β، IL-1α، IL-1Ra، IL-6، IL-8، MIP-1α و MIP-1β را تحریک می‌کند(۲۴). هم‌چنین مطالعات Fu و همکاران نشان داد که HMGB1 باعث افزایش تولید سایتوکاین های IL-1β، IL-6 و TNF-α در موش‌های C57BL/6 مبتلا به سندروم زجر تنفسی حاد[7] می‌شود(۲۵). از طرفی در مطالعه‌ای که اخیراً انجام شد، نتایج نشان داد که درمان با آنتی‌بادی ضد HMGB1 باعث کاهش بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی مانند IL-1β و TNF-α می‌شود(۲۶). مطالعات Zhang و همکاران بر روی مدل موشی آسم نوتروفیلیک نشان داد که ارتباط مثبتی بین

1. N-methyl-D-aspartate

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-08-02]

افزایش بیان HMGB1 و التهاب مجاری هوایی با واسطه سلول‌های Th17 وجود دارد، به‌طوری‌که القای HMGB1 باعث افزایش پلاریزاسیون 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[1] می شود(۲۹). در این مطالعه به نظر می‌رسد که کاربنوکسولون از طریق افزایش بیان HMGB1 باعث افزایش میزان سایتوکاین‌های پیش التهابی شده و در نتیجه تمایز به سمت Th17 افزایش پیدا کرده است.

نشان داده شده است که تمایز سلول‌های $CD4^+$ T به سلول‌های Th17 یا سلول‌های Treg به نوع سایتوکاین‌های محیط بستگی دارد(۵)، به‌طوری‌که فاکتور رشد تغییردهنده-بتا[2] (TGF-β) تولید سلول‌های Treg را القا می‌کند، در حالی که TGF-β همراه با IL-6 (که در مطالعه ما افزایش یافته است) تولید سلول‌های Treg را مهار کرده و باعث افزایش تولید سلول‌های پیش التهابی 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-α (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-α 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 پیش التهابی IL-1β، IL-6 و TNF-α شده، سپس IL-6 با افزایش فراوانی سلول‌های Th17 و کاهش فراوانی سلول های Treg و TNF-α 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، هم چنین شدت فیبروز 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 پیش التهابی IFN-γ و IL-1β 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، به‌طوری که پاسخ‌های التهابی را در سلول‌های جزایر پانکراس افزایش داده و اثر پروآپوپتوزی IL-1β را در این سلول‌ها شدت

1. In vitro
2. Transforming growth factor-β (TGF-β)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-08-02]

می‌بخشد(۳۶،۳۵). هم‌چنین نشان داده شده است که سلول‌های Th17 با القای سایتوکین‌های پیش‌التهابی IL-1β، IL-6 و TNF-α و کموکاین‌های التهابی بافتی را تشدید کرده و باعث بسیج شدن سلول‌های T اجرایی به بافت هدف می‌شوند(۳۷). از طرفی مطالعات Emamaullee و همکاران نشان داد که درمان با IL-25 و آنتی‌بادی علیه IL-17 باعث کاهش تورم جزایر پانکراس و مهار سلول‌های Th17 با IL-25 و آنتی‌بادی علیه IL-17 باعث کاهش ارتشاح سلول‌های T التهابی اختصاصی و افزایش سلول‌های T تنظیمی در اطراف جزایر می‌شود(۳۸). به نظر می‌رسد که سایتوکاین‌های پیش التهابی با القای تمایز به سمت Th17 باعث افزایش نفوذ سلول‌های التهابی به جزایر لانگرهانس پانکراس شده‌اند.

در ارتباط با نتایج ارزیابی میزان FBS، شاهد افزایش معنی‌دار میزان این پارامتر در موش‌های درمان شده با کاربنوکسولون 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 تحقیق داشتیم که از آن جمله می‌توان به القاء بیماری دیابت خود ایمن نوع یک، زنده نگهداشتن موش‌ها در طی القاء بیماری دیابت تیپ یک، تهیه دشوار عصاره هموژنیزه پانکراسی و جداسازی بسیار سخت سلول‌های طحالی، می‌توان گفت که اگرچه کاربنوکسولون دارای اثرات ضد التهابی و محافظت سلولی است، به نظر می‌رسد کاربنوکسولون با افزایش تولید سایتوکاین های پیش التهابی، باعث القای تمایز سلول های $CD4^+$ T به Th17 و مهار تمایز به Treg شده، نفوذ سلول‌های التهابی به جزایر پانکراس را افزایش داده، و با تخریب سلول‌های 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+ regulatory T cells and CD4+ IL17A+ 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-08-02]

7. Dogan Y, Akarsu S, Ustundag B, Yilmaz E, Gurgoze MK. Serum IL-1β, 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-Δ 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-ΔEx3 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 11β 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, Delirezh 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-γ 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).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-08-02]

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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-08-02]