ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۰، شماره۲، اردیبهشت ۱۳۹۴(شماره پی در پی۹۷)

مقاله پژوهشی

اثر ایمونوتراپیوتیک پنتوکسی فیلین بر دیابت تیپ ۱ در موش و تأثیر آن بر بیان ژن peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ)

فرین ملکی فرد [۱]، نوروز دلیرژ [۱*]، رحیم حب نقی [۲]، حسن ملکی نژاد [۳]، علی سلیمان زاده [۴]

[۱] گروه میکروب شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، [۲] گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، [۳] گروه فارماکولوژی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، [۴] گروه مامایی و طیور، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۳/۸/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: پنتوکسی فیلین تعدیل گر ایمنی و ضد التهاب می‌باشد. پنتوکسی فیلین تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی را مهار می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات پنتوکسی فیلین در درمان دیابت تیپ ۱ در موش و تأثیر آن در بیان ژن peroxisome proliferator- activated receptor gamma (PPAR-γ) بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی بعد از القائ دیابت در موش‌های نر نژاد خالص C57BL/6، موش‌ها تحت درمان با پنتوکسی فیلین به مدت ۲۱ روز (روزانه ۱۰۰میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) قرار گرفتند. سطح قند خون در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از ابتلا به دیابت اندازه‌گیری شد. سلول‌های طحالی از نظر میزان تولید سایتوکاین‌ها به وسیله تست الایزا مورد ارزیابی قرار گرفتند. تحقیقات بیشتر در تغییرات سیستم ایمنی در طحال به وسیله semi-quantitative RT-PCR ژن PPAR-γ مورد آزمایش قرار گرفت. داده‌های آماری با استفاده آزمون‌های تی دانشجویی و آنالیز واریانس تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: درمان به وسیله پنتوکسی فیلین مانع از افزایش قند خون در موش‌های دیابتی شد. درمان با پنتوکسی فیلین به طور قابل توجهی باعث مهار تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی IL-17 و IFN-γ گردید، در حالی که باعث افزایش سطح سایتوکاین ضد التهابی IL- 10 و افزایش بیان ژن PPARγ در طحال در مقایسه با گروه کنترل دیابتی شد($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: پنتوکسی فیلین ممکن است اثر درمانی در برابر تخریب خودایمن سلول‌های بتا پانکراس در طی دیابت نوع ۱ ناشی از القا به وسیله STZ در موش داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: دیابت نوع ۱، پنتوکسی فیلین ، سایتوکاین، PPAR γ

[*] **نویسنده مسئول: نوروز دلیرژ**، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروب‌شناسی
Email: n.delirezh@urmia.ac.ir

مقدمه

دیابت تیپ یک یا دیابت ملیتوس وابسته به انسولین، یک بیماری خود ایمن ویژه اندام است که به صورت خود به خودی اتفاق می‌افتد و در این بیماری تخریب سلول‌های بتای تولید کننده انسولین در پانکراس اتفاق می‌افتد(۱). التهاب مزمن پانکراس (insulitis) و تخریب سلول‌های بتا به وسیله سلول‌های ایمنی به ویژه لنفوسیت‌های T اتوراکتیو $CD4^+$ و $CD8^+$، B سلول‌ها، ماکروفاژ و دندریتیک سل‌ها به وجود می‌آید(۲). در مطالعه‌های مختلف معلوم گردیده که در ایجاد بیماری دیابت تیپ یک رده‌های سلولی Th1 و Th17 درگیر می‌باشند. سایتوکین‌های مختلفی از جمله IFN-α ، TNF-α، IL-1 و هم‌چنین 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(۳). یکی از مدل های پری کلینیکال مختلف از بیماری برای روشن شدن مکانیسم پاتوژنیک دیابت نوع ۱ در انسان و تست روش‌های درمانی جدید استفاده از استرپتوزوتوسین(Streptozotocin, STZ) است. استرپتوزوتوسین توکسین سلول‌های بتا پانکراس می‌باشد و زمانی که با دوز کم و متوالی در گونه‌های حساس از جمله موش نژاد C57BL/6 تجویز شود، سبب ایجاد التهاب در جزایر پانکراس می‌شود(۴). پنتوکسی‌فیلین(pentoxifylline) از مشتقات متیل گزانتین، مهارکننده فسفودی استراز (Phosphodiesterase ,PDE) است که دارای خواص تعدیل‌گر ایمنی و ضد التهابی می‌باشد. پنتوکسی فیلین سالها در درمان بیماری های عروقی استفاده می‌شد(۵). فسفو دی استرازها از خانواده آنزیم‌هایی هستند که در تنظیم سطح نوکلئوتیدهای حلقوی cAMP و cGMP داخل سلولی از طریق کاتالیز تجزیه آنها به متابولیت‌های غیر فعال نقش دارد. از این طریق فسفو دی استرازها در سلول‌های ایمنی سبب افزایش تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی و کاهش سایتوکاین‌های ضدالتهابی می‌گردد. داروهای مهارکننده فسفودی استراز باعث کاهش تولید مدیاتورهای پیش‌التهابی و افزایش تولید مدیاتورهای ضد التهابی در سلول‌های ایمنی می‌شوند(۶). در سال‌های اخیر نقش تنظیم کننده سیستم ایمنی و ضدالتهابی پنتوکسی فیلین مورد توجه قرار گرفته است، به دلیل این که این دارو باعث سرکوب تولید TNF-α و سایر سایتوکاین‌های پیش التهابی از جمله IFN-γ و IL-12 به صورت برون تنی و درون تنی می‌شود(۸ و۷). پنتوکسی فیلین در جلوگیری از پیشرفت مدل جانوری برخی از بیماری‌های خود ایمن از جمله میوکاردیت خود ایمن تجربی(۹)، آنسفالومیلیت خودایمن تجربی(۱۰) و اجونت آرتریت(۱۱) مؤثراست.

peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-γ) از خانواده بزرگ نوکلئار استروئید رسپتورها می‌باشد که در بیان ژن‌های مختلفی که تنظیم کننده متابولیسم انرژی، تمایز سلولی و آپوپتوز هستند نقش دارد. مطالعه‌ها نشان از نقش PPAR-γ و لیگاندهایش به عنوان تنظیم کننده پاسخ‌های التهابی و

ایمنی از جمله تنظیم تمایز و گسترش سلول‌های ایمنی از جملـه مونوسـیت، ماکروفـاژ، سـلول‌هـای کشـنده طبیعی و هم‌چنین در تنظیم تغییـر پاسـخ‌هـای Th1/Th2 مؤثر می‌باشد(۱۲).

هدف از مطالعه حاضـر بررسـی اثـر درمـانی پنتوکسی فیلین بر میزان بیان ژن PPAR-γ در موش‌های دیـابتی شـده بـا استرپتوزوتوسـین و ارتبـاط آن بـا میـزان بیـان سـایتوکاین‌هـای IL-10,IFN-γ و IL-17 می‌باشد.

روش بررسی

این یک مطالعه تجربی مـی‌باشـد کـه بـر روی موش‌های نر نژاد خالص C57BL/6 با محدوده سنی ۶ تـا ۸ هفته (۲۰ـ۱۵ گـرم) کـه از انیسـتیتو پاسـتور ایـران خریداری شـده بودنـد، انجـام شـد. ایـن مـوش‌هـا در حیوان خانه دانشکده دامپزشـکی دانشـگاه ارومیـه در شرایط استاندارد آب، غذا، دما و نـور کـافی نگهـداری شـدند. کلیـه مراحـل ایـن تحقیـق در کمیتـه اخـلاق پژوهشی دانشـگاه ارومیـه مـورد تأییـد قـرار گرفـت. موش‌ها بـه صـورت تصـادفی بـه سـه گـروه ۵ تـایی تقسیم شدند. گروه اول شامل موش‌های سالمی بودند که تحت هیچ تیماری قرار نگرفتند و فقط بافر سـیترات با Ph =۴/۵ به آن‌ها تجویز می‌شـد. گـروه دوم شـامل موش‌های دیابتی بودند کـه تنهـا دیابـت در آنهـا القـاء شده بود(گروه کنترل دیابتی). گروه سوم شامل موش هایی بودنـد کـه بعـد از القـاء دیابـت تحـت درمـان بـا پنتوکسی فیلین(۱۰۰ میلـی‌گـرم بـر کیلـوگرم روزانـه) برای ۲۱ روزمتوالی به صـورت داخـل صـفاقی قـرار گرفتند (گروه تحت درمان).

قبـل از تجـویز هـر دوز(streptozotocin) STZ موش‌ها به مدت چهار ساعت ناشتا مـی‌شـدند و حتـی پوشـال بسـتر آن‌هـا نیـز جمـع‌آوری مـی‌شـد، سـپس STZ(Sigma, Germany) را به صورت داخل صفاقی تا پـنج روز متـوالی دریافـت مـی‌کردنـد (۴۰ میلـی‌گـرم بـر کیلوگرم در ۲۰۰ میکرولیتر سیترات بافر بـا pH =۴/۵ که۱۰ دقیقه قبل از تجویز حل می‌شد). موش‌ها زمـانی دیابتی شده ارزیابی می‌شدند که میزان قندخون ناشـتا آن‌ها بیشتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی لیتر بود(۱۳).

به منظور بررسی قندخون ناشتا بـدین منظـور با استفاده از سرنگ‌های انسولینی بعد از مقیـد کـردن موش‌ها از ورید دمی‌آن‌ها اقدام به خون‌گیری کـرده و سـپس بـه وسـیله دسـتگاه خودکـار گلوکـومتر (Accu-Chech Compact plus, Irland) میزان گلوکز خون آن‌ها در روز صفر، روز ۷، روز ۱۴ و روز ۲۱ پـس از القاء دیابت و شروع درمان بررسی شد.

۲۱ روز پس از آغاز درمـان مـوش‌هـا نخـاعی شده وسپس طحـال مـوش‌هـا تحـت شـرایط اسـتریل خارج گردید و بعد از قطعه قطعه شدن در ۵ میلی‌لیتـر محیط کشت RPMI-1640 (Sigma, USA) حاوی ۱۰ درصـد FBS (Gibco, Germany) لـه گردیـد. بافـت حاصـل از تـوری سیمی به قطر ۰/۲ میلی‌متر جهت تهیـه سوسپانسـیون سلولی عبور داده شـد. بـه منظـور حـذف گلبـول‌هـای قرمز پـس از سـانتریفیوژ بـه مـدت ۱۰ دقیقـه در دور ۲۰۰ ، ۵ گرم بر میلی‌لیتـر بـافر لیـز کننـده (۰/۱۵مـول

کلرید آمونیوم، ۱۰ میلی‌مول بی کربنات پتاسیم و ۰/۱ میلی‌مول EDTA با pH=۷/۲) بر روی رسوب سلولی به دست آمده افزوده شد. پس از ۵ دقیقه ضمن افزودن ۱۰ میلی‌لیتر 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 سلول‌ها، سوسپانسیون سلولی با ۲×۱۰^{۶} سلول در میلی‌لیتر از آن تهیه شد. این سلول‌ها در پلیت های کشت ۲۴ خانه در حضور ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر 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 آن‌ها جمع‌آوری شد.

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

برای بررسی بیان ژن PPAR-γ: RNA کامل طحال موش‌ها به وسیله TRIZOL Reagent kit (GIBICOL) استخراج گردید. غلظت RNA با اندازه‌گیری مقدار جذب نوری به ۱ میکروگرم در میکرولیتر تنظیم شد و در ۸۰C° – نگهداری شد. رونوشت برداری معکوس با ۱ میکروگرم از RNA کامل با استفاده از کیت BcaBEST RNA PCR Kit Ver.1.1 (Takara, Japan) انجام شد. DNA مکمل با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) آمپلی تکثیر شد، در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ×۱۰، ۱ میکرولیتر از هر dNTP از هر۲/۵ میلی‌مول در لیتر، ۱ واحد از Ex Taq DNA polymerase (Takara, Japan)، ۱ میکرولیتر از DNA مکمل، ۱ میکرولیتر از هر پیکومول پرایمر؛ (PPARγ, sense 5′ -GAG ATG CCA TTC TGG CCC ACC AAC TTC GGA-3′ و antisense 5′ – TAT CAT AAA TAA GCA TCA TGG AAT CCT GTG – β-actin, sense 5′ ;ATC GGA TGG TTC-3′ و antisense 5′ – TAAAAC GCA GCT CAG GCA TCC ATG AAA C-3′ TAA CAG TCC G-3′)

شرایط ترمال سایکلر بعد از بهینه سازی شامل:۱ سیکل در ۷C° سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل برای ژن PPAR-γ (و ۲۶سیکل برای β-actin control fragment) در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ژن PPARγ (و ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای β-actin control fragment) به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و سیکل نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه.

قطعات تکثیر شده PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد و سپس ژل با اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی شده و با دستگاه electrophoresis gel imaging system (UVP) عکس‌برداری شد. برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن مورد نظر از نسبت جذب نوری .PPAR-γ/β-actin باندهای روی ژل استفاده گردید.

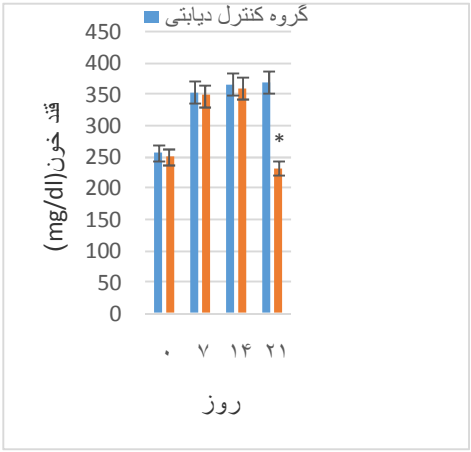
داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

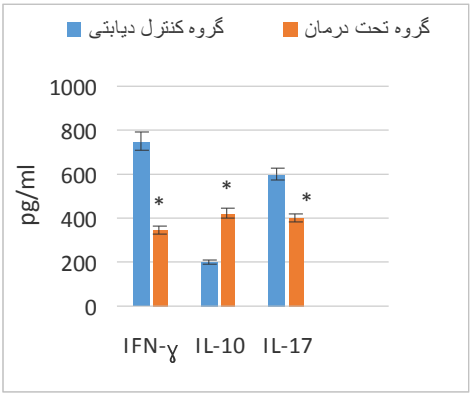
بررسی میزان قند خون ناشتا موش‌ها در تمامی گروه‌ها در طی ۲۱ روز پس از تجویز پنتوکسی فیلین نشان داد که در گروه موش‌های دیابتی که دارو دریافت کرده بودند(گروه تحت درمان) نسبت به گروه شاهد دیابتی که دارو دریافت نکرده بودند(گروه کنترل دیابتی) به صورت معنی‌داری($p<۰/۰۵$)پایین‌تر بوده است(نمودار ۱)

میزان سایتوکین های پیش التهابی IFN-γ و IL-17تولید شده در مایع رویی کشت سلول های طحالی در گروه درمانی کاهش و در عوض سطح سایتوکین ضد التهابی IL-10 افزایش معنی داری را نشان داد(نمودار۲).

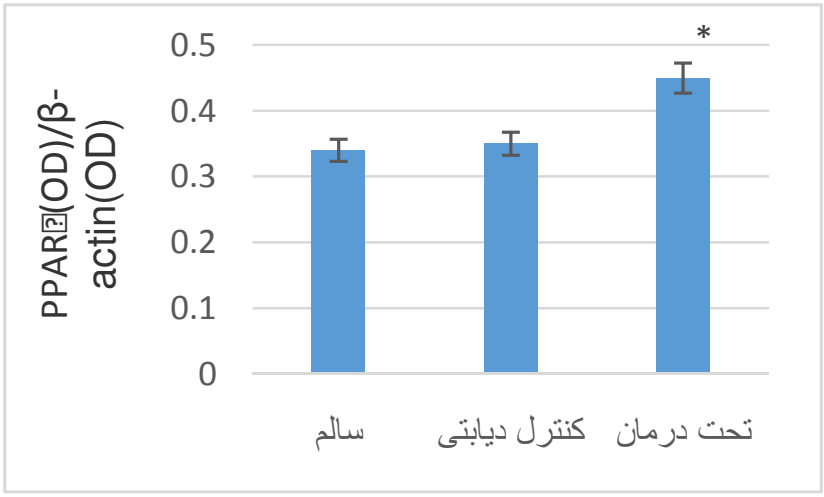
برای بررسی میزان بیان ژن PPAR-γ در طحال موش های دیابتی شده پس از طی ۲۱ روز از آغاز درمان از Semi-quantitative RT-PCR استفاده شد. نتایج ما نشان می دهد که بعد از ۲۱ روز از آغاز درمان میزان بیان mRNA ژن PPAR-γ به طور معنی داری در طحال موش های تحت درمان افزایش یافته است و هیچ تفاوت معنی داری بین گروه کنترل دیابتی و سالم وجود نداشت (نمودار۳).



نمودار ۱: تاثیر پنتوکسی فیلین بر میزان قند خون ناشتا در روزهای ۰، ۷، ۱۴، ۲۱ روز پس از آغاز درمان (* نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $p<۰/۰۵$ بین گروه دریافت کننده دارو و گروه کنترل دیابتی) میزان سایتوکین های پیش التهابی IFN-γ و IL-17 تولید شده در مایع رویی کشت سلول های طحالی در گروه درمانی کاهش و در عوض سطح سایتوکین ضد التهابی IL-10 افزایش معنی داری را نشان داد(نمودار۲).



نمودار۲: مقایسه میانگین غلظت سایتوکین‌های IFN-γ، IL-10 و IL-17 در سوپ رویی کشت سلول‌های طحالی تحریک شده به وسیله Con A پس از ۷۲ ساعت کشت.(* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p<۰/۰۵$ بین گروه دریافت کننده دارو و گروه کنترل دیابتی)



نمودار۳: بیان ژن PPAR-γ در طحال موش های دیابتی شده تحت درمان با پنتوکسی فیلین.آنالیز RT-PCR mRNA ژن PPARγ
* سطح معنی داری در مقایسه با گروه کنترل دیابتی و گروه سالم

بحث

نتایج مطالعه‌های گذشته نشان از نقش پنتوکسی فیلین در کاهش قند خون حیوانات مبتلا به دیابت می‌دهد(۲۲). در این مطالعه اقدام به درمان با پنتوکسی فیلین پس از اطمینان از افزایش قند خون و القاء بیماری در تمامی موش‌های گروه درمانی شده است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد پنتوکسی فیلین موجب کاهش قند خون در گروه درمانی نسبت به گروه کنترل دیابتی می‌گردد که نشان از نقش مهم پنتوکسی فیلین در کنترل پیشرفت بیماری و درمان آن دارد.

تحقیقات گذشته نشان می‌دهد عامل مهاری در جلوگیری از تخریب سلول‌های β سلول‌های Th2 می‌باشند که تولید سایتوکاین‌های IL-4 و IL-10 می‌کند. در حالی که سلول‌های Th1 با تولید سایتوکین های پیش التهابی از جمله IFN-γ ، TNF-α و IL-12 باعث فعال‌سازی ماکروفاژ و T سل‌های سایتوتوکسیک شده که سبب تخریب سلول های β پانکراس می‌باشند و از این طریق نقش مهمی در تخریب سلول‌های بتا پانکراس ایفا می‌کنند(۱۴). پنتوکسی فیلین مشابه سایر داروهای افزاینده سطح cAMP باعث مهار سلول‌های Th1 و ممانعت از تولید سایتوکاین‌های پیش‌التهابی IL-2و IFN-γ می‌شود، ولی بر Th2 اثر مهاری ندارد(۱۵).

IL-10 از جمله سایتوکاین‌های ضد التهابی مهمی‌است که نقش اصلی را در محدود کردن پاسخ‌های التهابی و ممانعت از ایجاد آسیب‌های بافتی را ایفا می‌کند (۱۶). این سایتو کاین به عنوان فاکتور مهار کننده ساخت سایتوکاین شناخته شده است(۱۷). مطالعات نشان داده اند که IL-10 به صورت اگزوژنوس یا با استفاده از القاء آن به وسیله پروبیوتیک‌های خوراکی در موش باعث جلوگیری از دیابت نوع ۱ در موش‌ها می‌شود(۱۸).

سلول‌های Th-17 با تولید سایتوکاین IL-17 نقش مهمی در بسیاری از بیماری‌های خود ایمن از جمله مولتیپل اسکلروز، روماتوئید آرتریت و دیابت نوع ۱ را

دارا می‌باشد. IL-17 سایتوکین پیش التهابی است که نقش آن در بیماری دیابت، تحریک تولید نیتریک اکساید که از طریق سلول‌های β در پاسخ به تحریک سایتوکاینی و به وسیله ماکروفاژهای فعال شده با سایتوکاین تولید می‌شود که باعث تخریب سلول‌های β می‌شود(۲۰ـ۱۹) و هم‌چنین IL-17 باعث افزایش انفلتراسیون نوتروفیل و ماکروفاژ و در نهایت با القاء تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی به وسیله ماکروفاژهای فعال شده و القاء کموکین‌ها سبب بسیج سلول‌های Th1 به بافت پانکراس را سبب می‌شود(۲۱).

نتایج این تحقیق نشان از افزایش معنی‌دار سطح سایتوکاین IL-10 به همراه کاهش سطح سایتوکاین‌های پیش التهابی IL-17 و IFN- می‌دهد که 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 Real time PCR نیمه کمی مورد تحقیق قرار گرفت.

PPAR-γ در تنظیم بیان ژن‌های مختلفی نقش دارد که شامل؛ متابولیسم انرژی، تمایز سلولی و آپوپتوز می‌شود. امروزه نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که PPAR-γ و لیگاند هایش درواکنش های ایمنی و التهابی مؤثر هستند(۱۲). مطالعه‌های گذشته نشان داده که PPARγ درتنظیم بیان سایتوکاین‌های التهابی نقش دارد. PPARγ به طور منفی تنظیم کننده بیان ژن سایتوکاین IFN-γ در ماکروفاژ می‌باشد(۲۲). PPARγ و لیگاند هایش دردرمان آنسفالومیلیت باعث کاهش تولید سایتوکاین‌های Th1 شده است (۲۴ و۲۳). PPAR-γ در بلوغ دندریتیک سل‌ها و شیفت پاسخ‌های ایمنی به سمت Th2 مؤثر است(۲۵) و در بافت کلون(۲۶) و بافت قلبی و سلولهای طحالی(۲۷) باعث افزایش سطح IL-4 شده است.

در مطالعه حاضر بیان ژن PPAR در سطح mRNA در طحال موش‌های دیابتی شده افزایش داشته که این هم زمان با افزایش سطح سایتوکاین ضد التهابی IL-10 و کاهش سطح سایتوکاین‌های پیش التهابی IL-17 و IFNγبوده است.

در تمایز سلول‌های Th1/Th2 دو فاکتور نسخه برداری T-bet و GATA-3 نقش مهم دارند(۲۸). تمایز T سل‌های نابالغ به Th1 به عهده T-bet می‌باشد و GATA-3 باعث تمایز آنها به Th2 می‌شود. گزارش شده که PPARγ باعث فعال‌سازی GATA-3 شده و از این طریق دردرمان کولیت مؤثر بوده است(۲۶)، ولی تأثیر PPARγ بر پاسخ Th17 مورد بررسی قرار نگرفته است.

نتیجه‌گیری

به طور خلاصه پنتوکسی فیلین دارای اثر درمانی بر دیابت خود ایمن القاء شده با STZ در موش می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر و و بر اساس مطالعه‌های مشابه ممکن است پنتوکسی فیلین از طریق افزایش بیان ژن PPARγ و با فعال‌سازی GATA-3 باعث شیفت پاسخ Th1 به سمت Th2 و تضعیف پاسخ‌های Th17 شود.

با انجام تحقیقات بیشتراحتمالاً افزودن این دارو به رژیم درمانی افراد مبتلا به دیابت خود ایمن اثرات سودمندی می‌تواند داشته باشد.

تقدیر و تشکر

نگارندگان از زحمات کارکنان دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه کمال تشکر و تقدیر را دارند.

REFRENCES

1.Atkinson MA, McLaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. NEngl J Med 1994; 31: 1428–36.
2.Roep BO, Peakman M. Diabetogenic T lymphocytes in human type 1 diabetes. Curr Opin Immunol 2011; 23: 746–53.
3.Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Roles of cytokines in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes. Cell Biochem Biophys 2007; 48: 159–63.
4.Kolb H. Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozotocin induced diabetes and non-obese diabetic (NOD) mice. Diabetes Metab 1987; 3: 751–78.
5.Bacher A, Eggensperger E, Koppensteiner R, Mayer N, Klimscha W. Pentoxifylline attenuates the increase in whole blood viscosity after transfusion. Acta Anaesthesiol Scand 2005; 49: 41–6.
6.Banner KH, Trevethick MA. PDE4 inhibition: a novel approach for the treatment of inflammatory bowel disease. Trends Pharmacol Sci 2004; 25: 430–6.
7.Haddad JJ, Land SC, Tarnow-Mordi WO, Zembala M, Kowalczyk D, Lauterbach R. Immunopharmacological potential of selective phosphodiesterase inhibition. I. Differential regulation of lipopolysaccharide mediated proinflammatory cytokine (interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha) biosynthesis in alveolar epithelial cells. J Pharmacol Exp Ther 2002; 300: 559–66.
8.Marcinkiewicz J, Grabowska A, Lauterbach R, Bobek M. Differential effects of pentoxifylline, a non-specific phosphodiesterase inhibitor, on the production of IL-10, IL-12 p40 and p35 subunits by murine peritoneal macrophages. Immunopharmacology 2000; 49: 335–43.
9.Takehana H, Inomata T, Niwano H, Nishii M, Matsuda C, Kohno K, *et al*. Immunomodulatory effect of pentoxifylline in suppressing experimental autoimmune myocarditis. Circ J 2002; 66: 499–504.
10.Rott O, Cash E, Fleischer B. Phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline, a selective suppressor of T helper type 1- but not type 2-associated lymphokine production, prevents induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. Eur J Immunol 1993; 23: 1745–51.
11.Silva JC, Rocha MF, Lima AA, Brito GA, Menezes DB, Rao VS. Effects of pentoxifylline and nabumetone on the serum levels of IL-1beta and TNFalpha in rats with adjuvant arthritis. Inflamm Res 2000; 49: 14–9.
12.Zhang X, Young HA. PPAR and immune system—what do we know?. Int Immunopharmacol; 2002; 2: 1029—44.
13. Choi JB, 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): 1366-74.
14.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.
15.Eigler A, Siegmund B, Emmerich U, Baumann KH, Hartmann G, Endres S. Anti-inflammatory activities of cAMP-elevating agents: enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF production. J Leukocyte Biol 1998; 63: 101–7.
16.Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. Nat Rev Immunol 2010; 10(3): 170-81.
17.Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy-review of a new approach. Pharmacol 2003; 55(2): 241-69.
18.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: 1565-75.
19.Miljkovic D, Cvetkovic I, Momcilovic M, Maksimovic-Ivanic D, Stosic-Grujicic S, Trajkovic V. Interleukin-17 stimulates inducible nitric oxide synthasedependent toxicity in mouse beta cells. Cell Mol Life Sci 2005; 62: 2658–68.
20.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.
21.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-1beta and TNF-alpha, by human macrophages. J Immunol 1998; 160: 3513–21.

22.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: 6712–7.
23.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.
24.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: 5743–50.
25.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—65.
26.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—9.
27.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.
28.Gor DO, Rose NR, Greenspan NS. Th1-Th2: a procrustean paradigm. Nat Immunol 2003; 4: 503-5.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ) **Original Article**

The Immunotherapeutic Effects of Pentoxifylline in Type 1 Diabetic Mice and its Effects on Expressions of Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) gene

Malekifar F[1], Delirezh N[1*], Hobbenaghi R[2], Malekinejad H[3], Soleimanzadeh A[4]

[1]Department of Microbiology, Urmia University, Urmia, Iran, [2]Department of Pathobiology, Urmia University of Medical Sciences,Urmia, Iran, [3]Department of Pharmacology, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran, [4]Department of Theriogenology and Poultry, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 9 Nov 2014 Accepted: 29 Feb 2015

Abstract

Background & aim: Pentoxifylline is an immunomodulatory and anti-inflammatory agent which inhibits the production of proinflammatory cytokines. The purpose of this study was to evaluate the effect of pentoxifylline in the treatment of type 1 diabetes in mice and its effect on the expression of peroxisome proliferator- activated receptor gamma (PPARγ).

Methods: After induction of diabetes in male C57BL/6 mice, they were treated with Pentoxifylline (100 mg/kg/day) for 21 days. Blood sugar levels were measured on days 0, 7, 14 and 21. Splenocytes were tested for cytokines production by ELISA. Further investigations on immune system changes in spleens were tested by semi-quantitative RT-PCR on PPARγ gene. Statistical data were analyzed using the Student t-test and ANOVA.

Results: Treatment with pentoxifylline prevented the level of blood sugar in diabetic rats. Pentoxifylline treatment also significantly inhibited the production of proinflammatory cytokines IL-17 and IFN-γ, while cause increasing the anti-inflammatory cytokine IL- 10 and the expression of PPARγ gene in the spleen compared to the diabetic control group ($p< 0.05$).

Conclusion: Due to STZ induction, Pentoxifylline may have therapeutic effects against autoimmune destruction of pancreatic beta cells on type 1 diabetes in mice

Keywords: Type 1 diabetes, Pentoxifylline, Cytokine, PPAR γ

[*]**Corresponding author: Delirezh N,** Department of Microbiology, Urmia University, Urmia, Iran
Email: n.delirezh@urmia.ac.ir

Please cite this article as follows:
Malekifar F, Delirezh N, Hobbenaghi R, Malekinejad H, Soleimanzadeh A. The Immunotherapeutic Effects of Pentoxifylline in Type 1 Diabetic Mice and its Effects on Expressions of Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) gene. Armaghane-danesh 2015; 20 (2): 103-113.