

## درمان موش‌های دیابتیک نوع ۱ با آل-ترانس رتینوئیک اسید از طریق مهار سایتوکاین‌های پیش التهابی

فرین ملکی فرد<sup>۱</sup>، نوروز دلیرز<sup>۲\*</sup>، رحیم حب‌نقی<sup>۳</sup>، حسن ملکی‌نژاد<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت ۱۳۹۳/۰۴/۱۵ تاریخ پذیرش ۱۳۹۳/۰۶/۲۱

## چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** دیابت نوع ۱ یک بیماری خودایمن ناشی از تخریب سلول‌های بتا پانکراس به‌وسیله سلول‌های T هست. ویتامین آ (رتینول) و متابولیت‌های آن از جمله آل‌ترانس رتینوئیک اسید (ATRA) دارای انواع فعالیت‌های بیولوژیکی از جمله تعدیل گر ایمنی در بیماری‌های التهابی و خودایمنی می‌باشند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات آل ترانس رتینوئیک اسید در درمان موش‌های دیابتیک نوع ۱ بود.

**مواد و روش‌ها:** دیابت به‌وسیله چندین دوز متوالی و کم استرپتوزوتوسین در موش‌های نر C57BL/6 القا شد. بعد از القای دیابت، موش‌ها تحت درمان با ATRA به مدت ۲۱ روز (روزانه ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و به‌صورت داخل پری‌توئن) قرار گرفتند. سطح قند خون در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از ابتلا به دیابت حاصل از القای STZ اندازه‌گیری شد. سپس سلول‌های طحالی از نظر میزان تکثیر به‌وسیله آزمون MTT و میزان تولید سایتوکاین‌ها به‌وسیله آزمون الایزا مورد ارزیابی قرار گرفتند

**یافته‌ها:** درمان توسط ATRA مانع از افزایش قند خون در موش‌های دیابتی شد. هم‌زمان با کاهش تکثیر لنفوسیتی، ATRA به‌طور قابل توجهی باعث مهار تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی IL-17 و IFN- $\gamma$  گردید درحالی‌که باعث افزایش سطح سایتوکاین‌های ضدالتهابی IL-10 و TGF- $\beta$  در مقایسه با گروه کنترل دیابتی شد ( $p < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** درمان با ATRA در موش‌های دیابتی باعث مهار افزایش قند خون، کاهش تکثیر لنفوسیتی، مهار تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی IL-17 و IFN- $\gamma$  شد درحالی‌که باعث افزایش سطح سایتوکاین‌های ضدالتهابی IL-10 و TGF- $\beta$  در مقایسه با گروه کنترل دیابتی شد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ATRA ممکن است اثر درمانی در برابر تخریب خودایمن سلول‌های بتا پانکراس در طی دیابت نوع ۱ ناشی از القای توسط STZ در موش داشته باشد.

**کلمات کلیدی:** دیابت نوع ۱، آل-ترانس رتینوئیک اسید، سایتوکاین

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره نهم، ص ۷۹۰-۷۸۴، آذر ۱۳۹۳

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروشناسی، تلفن: ۳۲۷۷۱۹۲۶

Email: Email:n.delirez@urmia.ac.ir

## مقدمه

دیابت نوع ۱ در اثر تخریب سلول‌های بتای پانکراس که تولیدکننده انسولین هست توسط حمله سلول‌های ایمنی به‌ویژه لنفوسیت‌های T اتوراکتیو CD4<sup>+</sup> و CD8<sup>+</sup>، سل‌ها، ماکروفاژ و دندریتیک سل‌ها به وجود می‌آید (۱). برای روشن شدن مکانیسم پاتوژنیک دیابت نوع ۱ در انسان و آزمون روش‌های درمانی جدید مدل‌های پری‌کلینیکال مختلف از بیماری وجود دارد. یکی از این روش‌ها ایجاد دیابت در جوندگان توسط استرپتوزوتوسین (STZ) با دوزهای متوالی و کم هست (۲). سایتوکاین‌های مختلفی از جمله

IL-1، TNF- $\alpha$ ، IFN- $\gamma$  و IL-17 در ایجاد دیابت نوع ۱ مؤثر است درحالی‌که تصور می‌شود که سایتوکاین‌های ضدالتهابی از جمله IL-10، IL-4، TGF- $\beta$  در جلوگیری از بیماری نقش مهمی دارند (۳). آل ترانس رتینوئیک اسید (ATRA) از جمله متابولیت‌های فعال ویتامین آ می‌باشد که دارای خواص تعدیل گر ایمنی و ضدالتهابی می‌باشد. مطالعات گذشته نشان داده آل ترانس رتینوئیک اسید در جلوگیری از پیشرفت مدل جانوری برخی از بیماری‌های خودایمن از جمله آنفالومیلیت خودایمن تجربی (۴)، نفریت خود ایمن (۵)، لوپوس (۶) و آرتریت خودایمن (۷) موثراند.

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری ایمنی شناسی گروه میکروشناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران<sup>۲</sup> دانشیار گروه میکروشناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)<sup>۳</sup> دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران<sup>۴</sup> پروفیسور گروه فارماکولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

آن‌ها 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 موش‌ها نخاعی شده و سپس طحال موش‌ها تحت شرایط استریل خارج گردید و بعد از قطعه‌قطعه شدن در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 (Sigma, USA) حاوی ۱۰ درصد FBS (Gibco, Germany) له گردید. بافت حاصل از توری سیمی به قطر ۰/۲ میلی‌متر جهت تهیه سوسپانسیون سلولی عبور داده شد. به‌منظور حذف گلبول‌های قرمز پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۲۰۰، ۵ میلی‌لیتر بافر لیز کننده (۰/۱۵) مول کلرید آمونیوم، ۱۰ میلی مول بی‌کربنات پتاسیم و ۰/۱ میلی مول EDTA با pH=7/2 بر روی رسوب سلولی به‌دست‌آمده افزوده شد. پس از ۵ دقیقه ضمن افزودن ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت بار دیگر به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۲۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس رسوب سلولی در محیط کشت RPMI حاوی FBS ۱۰ درصد به حالت سوسپانسیون درآوردید. پس از شمارش سلول‌ها، سوسپانسیون سلولی با  $2 \times 10^6$  سلول در میلی‌لیتر از آن تهیه شد. این سلول‌ها در پلیت‌های کشت ۲۴ خانه در حضور  $2 \mu\text{g/ml}$  Concanvalin (Con A, Sigma) به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور  $\text{CO}_2$  ۵ درصد کشت داده شدند. پس از طی این مدت مایع رویی آن‌ها جمع‌آوری شد.

برای سنجش سایتوکین‌های IFN- $\gamma$ ، IL-17، IL-10 و TGF- $\beta$  از کیت‌های الایزا (Bendermed Co, Germany) استفاده شد و بر طبق دستورالعمل مندرج در دفترچه‌ی راهنمای هرکدام از کیت‌ها اقدام گردید.

- بررسی میزان تکثیر سلول‌های ایمنی با روش MTT: پس از طی مراحل ذکرشده، به دنبال شمارش سلول‌ها سوسپانسیونی حاوی  $1 \times 10^6$  سلول در میلی‌لیتر تهیه گردید و ۱۰۰ میکرو لیتر از آن در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. برای هر نمونه سه تکرار در حضور Con A  $\mu\text{g/ml}$  و سه تکرار بدون حضور Con A در نظر گرفته شد. به‌عنوان بلانک نیز در سه چاهک از محیط RPMI خالی استفاده گردید. بعد از ۷۲ ساعت نگهداری در انکوباتور حاوی  $\text{CO}_2$  ۵ درصد، به هر چاهک ۲۵ میکرو لیتر محلول MTT (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر PBS) افزوده شد و به مدت ۴ ساعت دیگر نگهداری گردید. در این مدت احیای ماده MTT توسط سلول‌های زنده در حال تکثیر سبب تشکیل کریستال‌های فورمازون گردید که با افزودن ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO به حالت محلول در آمد. سپس شدت رنگ در طول موج

ATRA در شرایط In vitro باعث ساپرس پاسخ‌های Th1 و افزایش پاسخ‌های Th2 می‌شود (۸) واز این رو در درمان بیماری‌های خودایمن برای سوق پاسخ‌های ایمنی از Th1 به سمت Th2 مورد توجه بوده است و تأثیر آن بر روی پاسخ‌های Th17 و سلول‌های T تنظیمی (Treg) کمتر مورد توجه بوده است. در این مطالعه پس از القاء بیماری و اطمینان از شروع بیماری اقدام به درمان با آل ترانس رتینوئیک و بررسی اثرات درمانی آن بر روی میزان قند خون، میزان تکثیر لنفوسیت‌های طحالی و تولید سایتوکین‌های IFN- $\gamma$ ، IL-17، IL-10 و TGF- $\beta$  مورد ارزیابی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

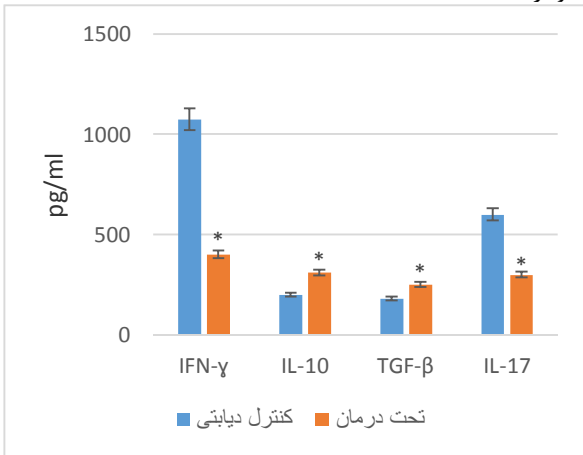
در این مطالعه که به‌صورت تجربی انجام شد، جامعه مورد مطالعه شامل موش‌های نر نژاد خالص C57BL/6 با محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته (وزن ۱۵-۲۰ gr) که از انیستیتو پاستور ایران خریداری شده بودند. این موش‌ها در حیوان خانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه در شرایط استاندارد آب، غذا، دما و نور کافی نگهداری شدند. کلیه مراحل این تحقیق در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه ارومیه مورد تأیید قرار گرفت. موش‌ها بعد از اطمینان از القاء دیابت در آن‌ها به‌صورت تصادفی به سه گروه ۵ تایی تقسیم شدند. گروه A شامل موش‌های سالمی بودند که تحت هیچ تیماری قرار نگرفتند و فقط بافر سیترات با pH= 4/5 به آن‌ها تجویز می‌شد. گروه B شامل موش‌های دیابتی بودند که تنها دیابت در آن‌ها القاء شده بود (گروه کنترل دیابتی). گروه C شامل موش‌هایی بودند که بعد از القاء دیابت تحت درمان با ATRA (20 mg/kg/day) برای ۲۱ روز متوالی به‌صورت داخل صفاقی قرار گرفتند (گروه تحت درمان).

-القاء دیابت: قبل از تجویز هر دوز STZ (streptozotocin) موش‌ها به مدت چهار ساعت ناشتا می‌شدند و حتی پوشال بستر آن‌ها نیز جمع‌آوری می‌شد سپس STZ (Sigma, Germany) را به‌صورت داخل صفاقی تا پنج روز متوالی در یافت می‌کردند (۴۰ mg/kg) در ۲۰۰ میکرو لیتر سیترات بافر با pH= 4/5 که ۱۰ دقیقه قبل از تجویز حل می‌شد. موش‌ها زمانی دیابتی شده ارزیابی می‌شدند که میزان قند خون ناشتا آن‌ها بیشتر از ۲۵۰ mg/dl بود.

-ارزیابی قند خون ناشتا: بدین منظور توسط سرنگ‌های انسولینی بعد از مقید کردن موش‌ها از ورید دمی آن‌ها اقدام به خون گیری کرده و سپس توسط دستگاه خودکار گلوکومتر (Accu-Chech Compact plus, Irland) میزان گلوکز خون

دیابتی) به صورت معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) کاهش و در عوض سطح سایتوکین‌های ضدالتهابی IL-10 و TGF- $\beta$  در گروه تحت درمان در مقایسه با گروه کنترل دیابتی افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ) (نمودار ۲).

نتایج آزمون MTT حاکی از کاهش در میزان تکثیر لئوسیتی در گروه درمانی با ATRA در مقایسه با گروه شاهد دیابتی بود (نمودار ۳).



**نمودار (۲):** مقایسه میانگین غلظت سایتوکین‌های IFN- $\gamma$ ، IL-17، IL-10، و TGF- $\beta$  در سوپ رویی کشت سلول‌های طحالی تحریک شده به وسیله Con A پس از ۷۲ ساعت کشت. (\* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$  بین گروه دریافت کننده دارو و گروه کنترل دیابتی)



**نمودار (۳):** مقایسه تکثیر لئوسیت‌های طحالی تحریک شده با Con A پس از ۷۲ ساعت (\* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$  بین گروه دریافت کننده دارو و گروه کنترل دیابتی)

### بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه اقدام به تجویز دارو پس از اطمینان از افزایش قند خون و بروز بیماری در تمامی موش‌های گروه درمانی شده است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد ATRA موجب کاهش قند خون در گروه درمانی نسبت به گروه کنترل دیابتی می‌گردد؛

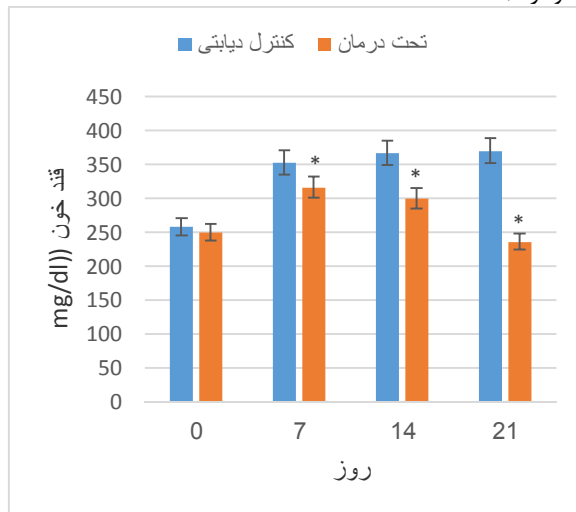
۴۹۰ نانومتر تعیین و ایندکس تحریک بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید:

شاخص تحریک: OD پرولیفراسیون لئوسیت‌های تحریک‌شده با OD - Con A / OD پرولیفراسیون لئوسیت‌ها در عدم حضور OD - Con A  
آنالیز آماری:

از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و Tukey s test برای مقایسه بین گروه‌ها استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها  $P < 0/05$  به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel (۲۰۰۷) استفاده شد. داده‌ها به صورت Means $\pm$ SEM گزارش گردید.

### یافته‌ها

بررسی میزان قند خون ناشتای موش‌ها در تمامی گروه‌ها در طی ۲۱ روز پس از تجویز ATRA 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 ( $P < 0/05$ ) پایین‌تر بوده است (نمودار ۱).



**نمودار (۱):** تأثیر ATRA بر میزان قند خون ناشتا در روزهای ۰، ۷، ۱۴، ۲۱ روز پس از آغاز درمان (\* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$  بین گروه دریافت کننده دارو و گروه کنترل دیابتی)

میزان سایتوکین‌های پیش‌التهابی IFN- $\gamma$  و IL-17 تولید شده در مایع رویی کشت سلول‌های طحالی در گروه موش‌های دیابتی که دارو دریافت کرده بودند (گروه تحت درمان) نسبت به گروه شاهد دیابتی که دارو دریافت نکرده بودند (گروه کنترل

لنفوسیتی در گروه درمانی با ATRA و به دنبال آن کاهش لنفوسیت‌های اتوراکتیو از جمله عوامل درمان بیماری می‌باشد. مطالعات گذشته نیز نشان از اثرات ضد تکثیر لنفوسیتی ATRA بوده است (۱۸).

لنفوسیت‌های T تنظیمی یا سلول‌های T reg نقش مهمی در روند تحمل به خود ایفا می‌کند (۱۹-۲۰). شروع بیماری‌های خود ایمن در اثر عدم تعادل بین این سلول‌ها و لنفوسیت‌های Th-17 است (۲۰-۲۱). لنفوسیت‌های T reg برای تکامل خود نیازمند سایتوکاین TGF- $\beta$  است درحالی‌که سلول‌های Th-17 برای تکامل خود علاوه بر TGF- $\beta$  نیاز به حضور سایتوکاین پیش التهابی IL-6 نیز دارد (۲۲). از طرفی سلول‌های Treg علاوه بر اینکه برای تکامل نیاز به TGF- $\beta$  دارند، خود نیز توانایی ترشح این سایتوکاین را دارا می‌باشند. TGF- $\beta$  سایتوکاین ایمونوساپرسور است که باعث مهار پاسخ‌های التهابی می‌شود (۲۳). در بدن رتینوئیک اسید تولید شده توسط سلول‌های دندریتیک موکوسال باعث افزایش جمعیت Treg<sup>+</sup> Foxp3 از راه وابسته به TGF- $\beta$  و مهار تمایز جمعیت Th-17 می‌شود (۲۴). مطالعات اخیر نشان می‌دهد رتینوئیک اسید در شرایط invitro نیز باعث افزایش سطح سلول‌های Treg<sup>+</sup> Foxp3 و ممانعت از گسترش سلول‌های Th-17 می‌گردد (۲۵). تجویز ATRA در موش‌های مبتلا به آنفالومیلیت تجربی خودایمن باعث کاهش سطح سلول‌های Th-17 شده درحالی‌که تغییری در جمعیت سلول‌های Treg مشاهده نشده است (۲۶)، این در حالی است که تجویز ATRA به موش‌های مبتلا به کولیت خود ایمن باعث کاهش سطح سلول‌های Th-17 و افزایش جمعیت سلول‌های Treg<sup>+</sup> Foxp3 شده است (۲۷).

در این مطالعه افزایش معنی‌دار سطح TGF- $\beta$  شاید حاکی از افزایش جمعیت سلول‌های Treg<sup>+</sup> Foxp3 بوده باشد و نقش ایمونوساپرسور این سایتوکاین به همراه افزایش سطح IL-10 و کاهش سطح سایتوکاین‌های پیش التهابی IL-17 و IFN- $\gamma$ ، با همراهی کاهش تکثیر لنفوسیت‌های خود واکنشگر نقش مهمی در کنترل و بهبود بیماری دیابت نوع ۱ در مطالعه حاضر داشته باشد. در نهایت اینکه به نظر می‌رسد افزودن آل ترانس رتینوئیک اسید به رژیم درمانی افراد مبتلا به دیابت خود ایمن دارای اثرات سودمندی باشد.

### تشکر و قدر دانی

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

این مقاله حاصل پایان نامه‌ی دوره‌ی دکتری تخصصی ایمنی شناسی دانشگاه ارومیه بوده است.

که نشان از نقش مهم ATRA در کنترل پیشرفت بیماری و درمان آن دارد. این نتیجه در راستای تحقیقاتی بوده که از ATRA برای پیشگیری و درمان موش‌های NOD مبتلا به دیابت نوع ۱ استفاده شده است (۹).

تحقیقات گذشته نشان می‌دهد سلول‌های Th1 با تولید سایتوکین‌های پیش التهابی از جمله IFN- $\gamma$ ، TNF- $\alpha$ ، IL-12 باعث فعال سازی ماکروفاژ و T سل‌های سایتو توکسیک شده که مسبب تخریب سلول‌های  $\beta$  پانکراس می‌باشند. درحالی‌که IL-4 و IL-10 ترشح شده توسط سلول‌های Th-2 فعال شده مانع تخریب سلول‌های  $\beta$  می‌شوند (۱۰). مطالعات گذشته حاکی از آن است که ATRA سبب مهار تولید IL-12 توسط ماکروفاژ های موش می‌شود و باعث ساپرس پاسخ‌های Th-1 در T<sub>H</sub>1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> سل‌ها می‌شود (۱۱). در این مطالعه نتایج نشان از کاهش سطح سایتوکاین پیش التهابی IFN- $\gamma$  در موش‌های دیابتی تحت درمان با ATRA دارد. در سال‌های اخیر نشان داده شده که T سل‌ها تولیدکننده IL-17 (Th-17) نقش مهمی در بسیاری از بیماری‌های خود ایمن از جمله مولتیپل اسکلروز، روماتوئید آرتریت و دیابت نوع ۱ را دارا می‌باشد. IL-17 سایتوکاین پیش التهابی است که نقش آن در بیماری دیابت، تحریک تولید نیتریک اکساید که از طریق سلول‌های  $\beta$  در پاسخ به تحریک سایتوکاینی و توسط ماکروفاژ‌های فعال شده توسط سایتوکاین تولید می‌شود که باعث تخریب سلول‌های  $\beta$  می‌شود (۱۳-۱۲) و همچنین IL-17 باعث افزایش انفلتراسیون نوتروفیل و ماکروفاژ و در نهایت با القاء تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی توسط ماکروفاژ های فعال شده و القاء کموکین‌ها سبب بسیج سلول‌های Th1 به بافت پانکراس را سبب می‌شود (۱۴). نتایج حاصله از مطالعه حاضر در موش‌های دیابتی تحت درمان نشان می‌دهد ATRA سبب کاهش سطح سایتوکاین IL-17 می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که IL-10 به صورت اگزوزنوس یا با استفاده از القاء آن توسط پروبیوتیک های خوراکی در موش باعث جلوگیری از دیابت نوع ۱ در موش‌ها می‌شود (۱۵). IL-10 از جمله سایتوکاین‌های ضدالتهابی مهمی است که نقش اصلی را در محدود کردن پاسخ‌های التهابی و ممانعت از ایجاد آسیب‌های بافتی را ایفا می‌کند (۱۶). این سایتوکاین به‌عنوان فاکتور مهارکننده‌ی ساخت سایتوکاین<sup>۱</sup> شناخته شده است (۱۷).

در این تحقیق افزایش معنی‌دار سطح سایتوکاین IL-10 به همراه کاهش سطح سایتوکاین‌های پیش التهابی IL-17 و IFN- $\gamma$  از جمله عوامل مهم در کنترل و درمان موش‌های دیابتی تحت درمان مورد مطالعه می‌باشد. در این مطالعه کاهش تکثیر

<sup>۱</sup> Cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF)

## References

1. Roep BO, Peakman M. Diabetogenic T lymphocytes in human type 1 diabetes. *Curr Opin Immunol* 2011; 23: 746–53.
2. Kolb H. Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab Rev* 1987;3(3):751–78.
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. 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: 1331–7.
5. 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.
6. 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: 1018–28.
7. Brinckerhoff CE, Coffey JW, Sullivan AC. Inflammation and collagenase production in rats with adjuvant arthritis reduced with 13-cis-retinoic acid. *Science* 1983; 221: 756–8.
8. 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: 581–6.
9. 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.
10. 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.
11. 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: 581–6.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
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 Rev* 2003; 55(2): 241–69.

18. Racke MK, Burnett D, Pak SH, Albert PS, Cannella B, Raine CS, et al. Retinoid treatment of experimental allergic encephalomyelitis. IL-4 production correlates with improved disease course. *J Immunol* 1995; 154(1): 450-8.
19. O'Connor RA, Taams LS, Anderton SM. Translational mini-review series on Th17 cells: CD4 T helper cells: functional plasticity and differential sensitivity to regulatory T cell mediated regulation. *Clin Exp Immunol* 2010; 159(2): 137-47.
20. Oukka M. Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. *Ann Rheum Dis* 2007; 66(Suppl 3): iii87-iii90.
21. Petro TM. Regulatory role of resveratrol on Th17 in autoimmune disease. *Int Immunopharmacol* 2011; 11(3): 310-8.
22. Dong C. Mouse Th17 cells: current understanding of their generation and regulation. *Eur J Immunol* 2009; 39(3): 640-4.
23. Taylor A. Review of the activation of TGF- $\beta$  in immunity. *Biol* 2009; 85: 29-33.
24. Kang, SG, Lim HW, Andrisani OM, Broxmeyer HE, Kim CH. Vitamin A metabolites induce gut-homing FoxP3 +regulatory T cells. *J Immunol* 2007; 179: 3724-33.
25. Elias KM, Laurence A, Davidson TS, Stephens G, Kanno Y, Shevach EM, et al. Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway. *Blood* 2008; 111(3): 1013-20.
26. Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 2007; 317(5835):256-60.
27. Bai A, Lu N, Guo Y, Liu Z, Chen J, Peng Z. All-trans retinoic acid down-regulates inflammatory responses by shifting the Treg/Th17 profile in human ulcerative and murine colitis. *J Leukoc Biol* 2009; 86(4): 959-69.

## TREATMENT OF TYPE I DIABETIC MICE WITH ALL-TRANS RETINOIC ACID BY INHIBITION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES

Farin Malekifard<sup>1</sup>, Nowruz Delirezh<sup>2</sup>, Rahim Hobbenaghi<sup>3</sup>, Hassan Malekinejad<sup>4</sup>

Received: 6 Jul , 2014; Accepted: 13 Sep , 2014

### Abstract

**Background & Aims:** Type 1 diabetes is an autoimmune condition associated with the T-cell-mediated destruction of Pancreatic  $\beta$  cells. Vitamin A (retinol) and its metabolites (such as all-trans retinoic acid (ATRA)) have a variety of biological activities including immunomodulatory action in a number of inflammatory and autoimmune conditions. The purpose of this study was to investigate the effects of all-trans retinoic acid on the treatment of autoimmune diabetes in mice.

**Materials & Methods:** Diabetes was induced by multiple low-dose of streptozotocin (MLDS) injection in male C57BL/6 mice. After induction of diabetes, mice were treated with ATRA (20 mg/kg/day i.p.) for 21 days. Blood glucose levels was measured in 0, 7, 14 and 21 days after Streptozotocin induction induced diabetes. Splenocytes were tested for proliferation by MTT test and cytokine production by ELISA.

**Results:** ATRA treatment prevented hyperglycemia in the diabetic mice. Aside from reducing lymphocyte proliferation, ATRA significantly inhibited the production of proinflammatory cytokines interleukin 17 (IL-17) as well as interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) while it increased the level of anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- $\beta$  compared with those in diabetic control group ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Treatment with ATRA in the diabetic mice prevented hyperglycemia, decreased lymphocyte proliferation, and inhibited the production of proinflammatory cytokines interleukin 17 (IL-17) as well as interferon gamma (IFN- $\gamma$ ). In addition, it increased anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- $\beta$  as compared with those in diabetic control group. 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

**Address:** Department of Microbiology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran  
Tel: +984432771926

**Email:** n.delirezh@urmia.ac

SOURCE: URMIA MED J 2014; 25(9): 790 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup> PhD Student of Immunology, Department of Microbiology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Microbiology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)

<sup>3</sup> Associate Professor, Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>4</sup> Professor, Department of Pharmacology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran