مجله دیابت و لیپید ایران. آذر- دی ۱۳۹۰؛ دوره ۱۱ (شماره ۲) ۱۶۷-۱۶۲

بررسی اثر بیان ژن IL23 درسلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران دیابتی

سعیدپیرمرادی[۱]، فرزانه عباسی*[۲]، پروین امیری[۲]، روشنک عباسی[۲]، اکرم عیدی[۱]، باقرلاریجانی[۲]، جوادتوکلی‌بزاز[۲]، مهسا محمدآملی[۲]

چکیده

مقدمه: اثرات بیان IL23 در انواع مختلفی از بیماری‌های اتوایمنی به خصوص بیماری‌هایی که در آنها اندام خاصی درگیر می‌شود به اثبات رسیده که بیماری دیابت نوع یک از این جمله است. IL23 همچنین با تحریک تولید سایتوکاین‌هایی از Th17، به عنوان یک واسطه پیش التهابی نقش دارد. هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه تفاوت در میزان بیان ژن IL23 در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی تحریک نشده (PBMCS) بیمارانی با انواع مختف دیابت در مقایسه با افراد گروه کنترل بود.

روش‌ها: بیماران مبتلا به T_1DM به یک گروه بیست نفره با سن کمتر از ۱۸ سال در زمان تشخیص بیماری و یک گروه بیست نفره با سن بیشتر از ۱۸ سال در زمان تشخیص بیماری تقسیم‌بندی شدند. هم چنین تعداد بیست بیمار مبتلا به T_2DM و بیست فرد سالم به عنوان کنترل در همان منطقه جغرافیایی برای این کار تحقیقاتی انتخاب شدند. بیان ژن IL23 در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCS) تازه و تحریک نشده در هر گروه با استفاده از تکنیک Real-Time PCR به روش کمی تعیین شد.

یافته‌ها: بیان ژن IL23 در بیماران T_1DM (juvenile-onset) با سن کمتر از ۱۸سال افزایش بیشتری پیدا کرده بود. افزایش محسوس و معنی‌دار بیان ژن IL23 در هر دو گروه بیماران T_1DM(juvenile-onset) با سن بالای ۱۸سال و بیماران T1DM (adult-onset) با سن پائین ۱۸ سال در مقایسه با گروه افراد کنترل و افراد بیمارگروه T_2DM مشاهده شد. تفاوت محسوس و معنی‌داری در بیان ژن IL23 در بیماران مبتلا به T_2DM و افراد سالم کنترل وجود داشت.

نتیجه‌گیری: مطالعه ما نشان دهنده up-regulation بیان IL23 دربیماران دیابتی نوع یک و down-regulated در بیماران دیابتی نوع دو T2DM می‌باشد که این نتایج اطلاعات قبلی موجود درباره‌ی تنظیم بیان ژن IL23 را تایید می‌نماید. در بیماران دیابتی نوع یک هیچ تفاوت معنی‌داری را بین افراد با سن زیر۱۸سال و افراد با سن بالای ۱۸ سال دیابتی مشاهده نکردیم که این نشان می‌دهد سازوکار یکسانی می‌تواند در بیماری‌زایی هر دو نوع دخیل باشد. مطالعات بیشتری در مورد انواع دیگری از سایتوکاین‌های رده Th17 برای تأیید بیشتر یافته‌های ما لازم است.

واژگان کلیدی: دیابت، بیان ژن، اینترلوکین۲۳

۱- دانشگاه آزاداسلامی، واحدعلوم وتحقیقات تهران

۲- مرکز تحقیقات غدد/ پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* ***نشانی:*** تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران، کد پستی ۱۴۱۱۴۱۳۱۳۷ تلفن: ۸۸۲۲۰۰۳۷، نمابر: ۸۸۲۲۰۰۵۲ ، پست الکترونیک: mrmohajeri@tums.ac.ir

تاریخ دریافت:۹۰/۳/۱۱ **تاریخ درخواست اصلاح: ۹۰/۰۵/۲۶** **تاریخ پذیرش: ۹۰/۰۶/۱۸**

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

سایتوکاین های التهابی نقش مرکزی و مهمی در ایجاد بیماری های اتوایمن که دیابت نوع یک (T1DM) یکی از آنها می باشد دارند [۱]. (IL23) اینترلوکین ۲۳ یکی از سایتوکاین های مهم بدن وعضوی ازسایتوکاین های هترودایمر IL12 می باشدکه به نظر می رسد درایجاد پاسخ های Th1 نقش دارد.IL23 ازسلول های تولیدکننده اینترلوکین ۱۷ (IL17) که آنها را Th17 می نامند ترشح می‌شوند. این سایتوکاین ها در بسط و گسترش و پیدایش سلول های تولیدکننده IL17 نقش دارند [۳،۲]. IL23 در القاء بیش از ۱۶۰ژن ازجمله پروتئین های متصل شونده به DNA ونیزالقاء برخی ژن های مرتبط با سیستم دفاعی میزبان ونیزنفوذ نوتروفیل ها به محل عفونت نقش ایفا می کند [۵،۴].

درانسان، پلی مورفیسم ژن IL12B که در به رمز در آوردن زیر واحد P40 از IL23 نقش دارد، به نظر می رسد که با علایم دیررس دیابت نوع یک در ارتباط می باشد [۶]. همچنین در محیط های in vitro اولین شواهد مربوط به اثرات القایی IL23 در ایجاد آثار دیررس دیابتی در موش‌های MLD-STZ به دست آمد [۷]. همچنین مشاهده شده که IL23 ازطریق القا و تحریک سنتز NO باعث افزایش ارتشاح[1] سلول های ایمنی در جزایر پانکراسی و تحریک موش های MLD-STZ به سمت دیابتی شدن می شود [۴،۷]. گروهی دیگر از محققین طی مطالعه ای دیگر ثابت کردند که IL23 نقش اساسی و ثابت شده ای در ایجاد التهابات در ارگان های خاص ایفا می‌کند [۸]. شواهد زیادی نیز وجود دارد که بیانگر این است که سلول های Th17 در پاتولوژی بسیاری از بیماری های اتوایمن نقش دارند. این سلول ها با ترشح یک سری فاکتورها در ایجاد دیابت نوع یک نقش دارند، بدین گونه که با خالص سازی مقدار زیادی ازسلول های Th17 ازموش های BDC25 و انتقال آن به موش های ترانس ژنیک، مشاهده شد که در این سری ازموش ها مثل SCID,NOD عوارض دیابت ایجاد شد [۱۰،۹]. IL23 به همراه STATS,IL6 در ایجاد التهابات به واسطه سلول های Th نقش دارند [۸]. STATS باعث القای فاکتورهای رونویسی IL17, ROR® می شوند که کاهش این فاکتور، منجر به افزایش foxp3,T-bet که از فاکتورهای موثر در رونویسی مرتبط با ایجاد پاسخ های التهابی ایجاد شده به واسطه سلول های Th1 هستند، می‌شوند [۱۱].

از آنجایی که سازوکار موثر در پاتوژنز انواع مختلف دیابت مشخص نمی باشد بررسی بیان ژن IL23 می تواند به عنوان یک فاکتور تشخیصی در افراد مبتلا به T1DMبا سن کمتر از ۱۸سال و افراد دیابتی بالاتر از ۱۸ سال و افراد دیابتی نوع دو (T2DM) و گروه کنترل مطرح باشد. هدف از این تحقیق مقایسه تفاوت در میزان بیان ژن IL23 درسلول های تک هسته ای تحریک نشده محیطی (PBMCs) بیماران مبتلا به انواع مختلف دیابت در مقایسه با افراد گروه کنترل یا سالم می باشد.

روش‌ها

بیماران

بیماران مبتلا به دیابت از کلینیک دیابت بیمارستان شریعتی وابسته به علوم پزشکی دانشگاه تهران دعوت به همکاری شدند. بیماران براساس معیارهای انجمن دیابت آمریکا (ADA) وارد مطالعه شدند. بیمارانی که حداقل دارای یکی از معیارهای سه گانه‌ای (ADA) بودند، وارد مطالعه شدند. در مواردی که بیماری در سن قبل از سی سالگی تشخیص داده شده بود و پیشرف حاد و حضور مقادیر زیاد اجسام کتونی[2] در خون را به همراه داشت و درمان توسط انسولین در اولین سال تشخیص بیماری شروع و ادامه یافته بود، به عنوان دیابت نوع یک در نظر گرفته شد در بیشتر بیمارانی که در مطالعه ما به عنوان دیابت نوع یک تشخیص داده شدند، DKA اولین عارضه و شروع درمان با انسولین در زمان تشخیص بیماری اتفاق افتاده بود. جمعیت نرمال نیز از همان منطقه جغرافیایی انتخاب شدند.

1- Infiltration

2- Ketonemia

Archive of SID

www.SID.ir

۱- از همه بیماران رضایت نامه کتبی تهیه شد. بعد از جمع‌آوری خون وریدی در محیط هپارین، جداسازی لنفوسیت‌ها با استفاده از شیب غلظتی فایکول(۱/۰۷۷) انجام شد و پس از استخراج Total RNA با استفاده از Tripure (RocheAppliedScience)، سنتز cDNA انجام شد (برطبق پروتکل کیت، RocheAppliedScience)، سپس با روش Real time PCR با استفاده از پرایمرهای ذیل برای ژن IL23و HPRT (House-kepping) به عنوان ژن کنترل بیان ژن IL23 بررسی گردید:

Forward(HPRT) 5´CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT3´
Revers(HPRT): 5´AGACGTTCAGTCCTGTCCATAA3´
Forward(IL23) 5´GGACAACAGTCAGTTCTGCTT3´
Revers(IL23): 5´CACAGGGCTATCAGGGAGC3´

PCR کمی

تمام واکنش‌های PCR کمی درحجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲۵۰ نانوگرم cDNA و ده میلی گرم Real time SYBR Green/Rox PCR Master و جفت پرایمرها و آب nuclease Free به حجم کل ۲۰ میکرولیترانجام می گیرد. هر Replicate دوبار، در دستگاه ABI stepone quantitative PCR system با این تکنیک مورد بررسی قرار گرفت. دمایی متشکل از دمای ابتدایی برای فعال‌سازی آنزیم پلی‌مراز به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 95^oC بود. که به دنبال آن ۴۰ سیکل متشکل از ۵ ثانیه در دماهای 95^oC، ۳۰ ثانیه در دمای 60^oC بود سپس Melting curve جهت شناسایی و تعیین پیک مربوط به یک ژن خاص و هم چنین شناسایی تشکیل Primer dimrers شکل گرفت.

آنالیز آماری

داده‌های حاصل از بیان یا بیان ژن HPRT به عنوان ژن مرجع، نرمال‌سازی شد. سپس آنالیز اطلاعات با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ انجام شدند. significance و اختلاف بین دو گروه کنترل و مطالعه با استفاده از آزمون T(T-test) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS بررسی و براساس significance P< ۰/۰۵ تعیین شد (P<۰/۰۵).

یافته‌ها

بیماران مبتلا به T_1DM به یک گروه ۲۰ نفره با سن کمتر از ۱۸ سال در زمان تشخیص بیماری و یک گروه ۲۰ نفره با سن بیشتر از ۱۸ سال در زمان تشخیص بیماری تقسیم‌بندی شدند. مدت زمان بیماری در گروه (juvenile onset) ۱/۶ ± ۱/۴ سال و در گروه adult onset ۱/۷ ± ۱/۹ سال بود. مختصات بیماران در جدول یک داده شده است میزان تغییرات بیان ژن به صورت Fold change در گروه‌های مختلف در شکل یک داده شده است.

بررسی بیان ژنIL23 در انواع گروه‌های بیماران با انواع دیابت در مقایسه با افرادگروه‌های کنترل

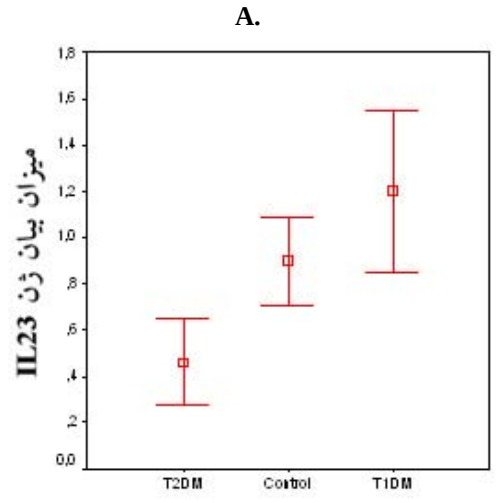
کاهش مشخصی از بیان ژن IL23 در گروه بیماران دیابتی نوع یک T1DM در مقایسه با افراد گروه کنترل مشاهده شد (P=۰/۰۰۴). هم چنین بیان ژن IL23 دارای کاهش مشخصی در گروه بیماران دیابتی نوع یک T1DM در مقایسه با افرادگروه بیماران دیابتی نوع دو T2DM بود (P=۰/۰۲) اماقابل مقایسه با گروه کنترل نبود (P=۰/۱). تفاوت بیان ژن IL23 در گروه بیماران دیابتی نوع یک early onset T1DM در مقایسه با گروه افراد دیابتی نوع دو T2DM معنی دار بود (P=۰/۰۰۴) اما در مقایسه با تفاوت بیان ژن IL23 در گروه بیماران دیابتی نوع یک late onset T1DM در مقایسه با افراد بیمار دیابتی نوع دو T2DM دارای درصد معناداری کمتری بود (P=۰/۰۵). همچنین تفاوت معناداری در بیان ژن IL23 در افراد گروه بیماران دیابتی نوع یک adult onset T1DM در مقایسه با افراد گروه بیماران دیابتی نوع یکjuvenile onset T1DM مشاهده نکردیم (P=۰/۴) (شکل۲).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- مشخصات کلی بیماران دیابتی وگروه کنترل مورد مطالعه

متغیرها	افراد دیابتی نوع۱ زیر ۱۸ سال	افراد دیابتی نوع۱ بالای ۱۸ سال	افراد دیابتی نوع۲	گروه کنترل
سن افراد (سال)	۱۱/۶±۲/۹	۲۴/۲±۴/۶	۵۸/۶±۹/۳	۵۵/۳±۱۲
جنسیت(مرد/زن)	۱۱/۱۲	۵/۱۵	۶/۱۲	۱۴/۶
نمایه توده بدنی (BMI) kg/m^2	–	۲۱/۳±۲/۷	۲۷/۷±۳/۲	۲۷/۱±۲/۶
نیاز روزانه به انسولین(واحد/روز)	۳۱/۱±۲۰/۴	۴۹/۰۵±۱۹		



تفاوت قابل ملاحظه ای از بیان ژن IL23 در بیماران مبتلا به دیابت نوع یک در مقایسه با بیماران مبیلا به دیابت نوع دو مشاهده شد (P=۰/۰۱). بیان ژن IL23 در بیماران دیابتی نوع دو در مقایسه با گروه کنترل دارای تفاوت معنی دار کمتری بود (P=۰/۰۰۴). بیان ژن IL23 در بیماران دیابتی نوع یک T1DM (early onset) در مقایسه باT1DM (late onset) دارای تفاوت معنی داری نبود.

شکل۲- بیان ژن IL23 در خون تحریک نشده PBMCs بیماران دارای انواع دیابت

www.SID.ir

بحث

در این مطالعه مشاهده گردید که میزان بیان ژنIL23 به طورقابل توجهی در سلول های تک هسته ای تحریک نشده خون محیطی تازه (PBMCs) در هر دو گروه بیماران دیابتی نوع یک در مقایسه با بیماران T2DM و گروه کنترل معنی دار وکاملا مشخص بود. همچنین میزان افزایش یافته بیان ژن IL23 در افراد گروه juvenile onset در مقایسه با افراد adult onset آشکار بود. بنابراین به نظر می رسد که IL23 نقش بسیار مهمی در ایجاد دیابت نوع یک ایفا می‌کند. مونوسیت های فعال شده التهابی نقش مهمی دربیماری زایی دیابت نوع یک بازی می کنند. مونوسیت های التهابی نیز در بیماری زایی دیابت نوع دو دخیل هستند [۱۲،۱۳]. اخیرا توجهات به سمت ایمونوتراپی T1DM و سرکوب واکنش های ایمنی با هدف قراردادن سلول های T خود فعال شده و سلول های T تنظیمی (Treg) جلب شده است. بیان چندین سایتوکاین پیش التهابی و ضدالتهابی از جمله IL23 در Tregs بیماران مبتلا به دیابت نوع یک مشاهده شده است [۱۴] عدم تعادل بیان بین Th1,Th2 در پاسخ ایمنی به عنوان سازوکاری در گسترش اختلالات اتوایمنی شناخته شده است. اما شواهد اخیر به دخالت سلول‌های +Th17cd4 اشاره دارد که از تمایز لنفوسیت‌های بکر، در نتیجه فرایندهای سیگنالینگی تولید شده به واسطه فاکتورهای IL23,IL6,IL21 ایجاد شده‌اند [۱۵]. لنفوسیت‌های تولید کننده IL17 مسئول بسیاری از بیماری های اتوایمن هستند [۱۷،۱۶] گزارشات قبلی اشاره به هتروژنی در ژنتیک ایمنی و ویژگی های متابولیک گروه‌های juvenile onset، adult onset در بیماران مبتلا به دیابت نوع یک دارد [۱۲،۲]. نرخ پایین concordance در مطالعاتی که برروی بیماران دیابتی انجام شد، برای بیماران T1DM adult onset اشاره به اثرناچیز ریسک های ژنتیکی در استعداد ابتلای افراد adult onset T1DM و دیابت خودایمنی بالقوه بزرگسالان (LADA) دارد که بیشتر به صورت بدون نیاز به انسولین تظاهر پیدا می‌کند. هرچند در کنار نرخ پائین در بیماران از نظر ژنتیکی هر دو نوع دیابت همبستگی با ژن‌های ناحیه HLA را نشان می‌دهد [۲] که این اشاره به اثر ناهنجاری های سیستم ایمنی در استعداد ابتلای افرادبالغ به T1DM را تائید می‌کند. در این مطالعه اطلاعات قبلی درمورد نقش IL23 در بیماری زایی، در بیماران T1DM را اثبات می‌کند. بررسی پروفایل بیان سایتوکاین‌های ترشحی از Th17 در میزان استعداد ابتلای افراد به T1DM در سنین مختلف ضروری می‌نماید. همچنین بررسی همبستگی بیان IL23 و اتوآنتی بادی مرتبط با دیابت بیماران T1DMگروه adult onset،juvenile onset می‌تواند مفید باشد. IL23 و دیگر سایتوکاین‌ها که در مسیرTh17 نقش دارند می‌توانند در ارتباط با ظهور علائم بالینی بیماری دیابت مرتبط به سن باشد و همچنین می‌تواند به عنوان مارکرهای تشخیصی برای شناسایی انواع دیابت مدنظر قرار گیرند. هرچند مطالعات بیشتری برای تائید اطلاعات مشاهده شده در مطالعه ما موردنیاز می باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از راهنمایی‌های ارزنده سرکارخانم مهسا محمدآملی تشکروقدردانی می‌نمایند. این مطالعه با حمایت مالی مرکزتحقیقات غدد درون‌ریز ومتابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

مأخذ

1. Border WA, Noble NA. Targeting TGF-beta for treatment of disease: *Nat Med* 1995; 1:1000-1
2. Leslie RD, Delli Castelli M.Age-dependent influences on the origins of autoimmune diabetes: evidence and implications. *Diabetes:* 2004; 53:3033-40.
3. Xiaogang Gao, Guoshan Ding, Zhengxin Wang, Hong Fu, Zhijia Ni, Jun Ma, Shaohua Song, Fang Liu, Zhiren Fu, Adjuvant treatment suppresses IL-17 production by T cell-independent myeloid sources in nonobese diabetic micet.*Nat.Immunol.*, 2010;20:514-20
4. Lukic, M. L., Stosic-Grujucic, S., Ostojic, N., Chan, W. L. and Liew, F. Y.,Inhibition of nitric oxide generation affects the induction of diabetes by streptozotocin in mice. Biochem. Biophys. *Res. Commun.*1991. 178: 913–920
5. Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., Dong, C., 2005. A distinct

Archive of SID

www.SID.ir

lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 6, 1133–1141

6. Windsor, L., Morahan, G., Huang, D., McCann, V., Jones, T., James, I.,Christiansen, T. and Price, P., Alleles of the IL12B 30UTR Associate with late onset of type-1 diabetes. *Hum. Immunol.* 2004. 65: 1432–1436.16.
7. Mensah-Brown, E. P., Stosic-Grujicic, S., Maksimovic, D., Jasima, A.,Shahin, A. and Lukic, M. L., Downregulation of apoptosis in the target tissue prevents low-dose streptozotocin-induced autoimmune diabetes. *Mol.Immunol.* 2002. 38: 941–946
8. Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basahm, B.,Sedgwick, D., McClanahan, T. et al., IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 2005; 201: 233–240.
9. Bending, D., H. De La Pen˜a, M. Veldhoen, J. M. Phillips, C. Uyttenhove,B. Stockinger, and A. Cooke. 2009. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *J.Clin. Invest.* 119: 565–572
10. Martin-Orozco, N., Y. Chung, S. H. Chang, Y. H.Wang, and C. Dong. 2009. Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells. *Eur. J. Immunol.* 39: 216–224
11. Yang, X. O., A. D. Panopoulos, et al. (2007). "STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells." *J Biol Chem* 282(13): 9358-63.
12. Padmos RC, Schloot NC, Beyan H, Ruwhof C, Staal FJ, de Ridder D, Aanstoot HJ, Lam-Tse WK, de Wit H, de Herder C, Drexhage RC, Menart B, Leslie RD, Drexhage HA; LADA Consortium. Distinct monocyte gene-expression profiles in autoimmune diabetes. *Diabetes:* 2008;57:2768-73
13. Pickup JC. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes.*Diabetes Care:*2004;27:813-23
14. Łuczyński W, Stasiak-Barmuta A, Juchniewicz A, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Iłendo E, Kos J, Kretowski A, Górska M, Chyczewski L, Bossowski A.The mRNA expression of pro- and anti-inflammatory cytokines in T regulatory cells in children with type 1 diabetes. *Folia Histochem Cytobiol:* 2010 Jan 1;48:93-100
15. Costa VS, Mattana TC, da Silva ME. Unregulated IL-23/IL-17 immune response in autoimmune diseases. *Diabetes Res Clin Pract:* 2010; 88:222-6.
16. Krakowski, M: and Owens, T., Inteferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 1996. 26:1641–1646
17. Yang, X. O., A. D. Panopoulos, et al. (2007). "STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells." *J Biol Chem* 282(13): 9358-63.

Archive of SID

www.SID.ir