

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

فرین ملکی فرد^۱، نوروز دلیرز^{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 پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۱۰

تاریخ وصول: ۱۳۹۳/۸/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: پنتوکسی فیلین تعدیل گر ایمنی و ضد التهاب می باشد. پنتوکسی فیلین تولید سایتوکاین های پیش التهابی را مهار می کند. 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 القای دیابت در موش های نر نژاد خالص C57BL/6، موش ها تحت درمان با پنتوکسی فیلین به مدت ۲۱ روز (روزانه ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) قرار گرفتند. سطح قند خون در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از ابتلا به دیابت اندازه گیری شد. سلول های طحالی از نظر میزان تولید سایتوکاین ها 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. داده های آماری با استفاده از آزمون های تی دانشجویی و آنالیز واریانس تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: درمان به وسیله پنتوکسی فیلین مانع از افزایش قند خون در موش های دیابتی شد. درمان با پنتوکسی فیلین به طور قابل توجهی باعث مهار تولید سایتوکاین های پیش التهابی IL-17 و IFN- γ گردید، در حالی که باعث افزایش سطح سایتوکاین ضد التهابی IL-10 و افزایش بیان ژن PPAR γ در طحال در مقایسه با گروه کنترل دیابتی شد ($P < 0.05$).

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

واژه های کلیدی: دیابت نوع ۱، پنتوکسی فیلین، سایتوکاین، PPAR γ

* نویسنده مسئول: نوروز دلیرز، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروب شناسی

Email: n.delirez@urmia.ac.ir

مقدمه

می‌باشد. پنتوکسی فیلین سالها در درمان بیماری های عروقی استفاده می‌شود (۵). فسفو دی استرازاها 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 استرازاها در سلول‌های ایمنی سبب افزایش تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی و کاهش سایتوکاین‌های ضدالتهابی می‌گردد. داروهای مهارکننده فسفودی استراز باعث کاهش تولید مدياتوره‌های پیش‌التهابی و افزایش تولید مدياتوره‌های 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 (۷ و ۸). 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) مؤثر است.

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

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 (insulinitis) و تخریب سلول‌های بتا به وسیله سلول‌های ایمنی به ویژه لنفوسیت‌های T توراکتیو CD4⁺ و CD8⁺ B سل‌ها، 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 IL-1، TNF- α ، IFN- α 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 مدل‌های 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). پنتوکسی فیلین (pentoxifylline) از مشتقات متیل گزانتین، مهارکننده فسفودی استراز (Phosphodiesterase, PDE) است که دارای خواص تعدیل‌گر ایمنی و ضد التهابی

ایمنی از جمله تنظیم تمایز و گسترش سلول‌های ایمنی از جمله مونوسیت، ماکروفاژ، سلول‌های کشنده طبیعی و همچنین در تنظیم تغییر پاسخ‌های Th1/Th2 مؤثر می‌باشد (۱۲).

هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر درمانی پنتوکسی فیلین بر میزان بیان ژن PPAR- γ در موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین و ارتباط آن با میزان بیان سایتوکاین‌های IL-10, IFN- γ و IL-17 می‌باشد.

روش بررسی

این یک مطالعه تجربی می‌باشد که بر روی موش‌های نر نژاد خالص C57BL/6 با محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته (۲۰-۱۵ گرم) که از انیستیتو پاستور ایران خریداری شده بودند، انجام شد. 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 به صورت تصادفی به سه گروه ۵ تایی تقسیم شدند. گروه اول شامل موش‌های سالمی بودند که تحت هیچ تیماری قرار نگرفتند و فقط بافر سیترات با $\text{pH} = 4/5$ به آن‌ها تجویز می‌شد. گروه دوم شامل موش‌های دیابتی بودند که تنها دیابت در آنها القاء شده بود (گروه کنترل دیابتی). گروه سوم شامل موش‌هایی بودند که بعد از القاء دیابت تحت درمان با پنتوکسی فیلین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه)

برای ۲۱ روز متوالی به صورت داخل صفاقی قرار گرفتند (گروه تحت درمان).

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 به صورت داخل صفاقی تا پنج روز متوالی دریافت می‌کردند (۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در ۲۰۰ میکرولیتر سیترات بافر با $\text{pH} = 4/5$ که ۱۰ دقیقه قبل از تجویز حل می‌شد). موش‌ها زمانی دیابتی شده ارزیابی می‌شدند که میزان قندخون ناشتا آن‌ها بیشتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود (۱۳).

به منظور بررسی قندخون ناشتا بدین منظور با استفاده از سرنگ‌های انسولینی بعد از مقید کردن موش‌ها از ورید دمی آن‌ها اقدام به خون‌گیری کرده و سپس به وسیله دستگاه خودکار گلوکومتر (Accu-Chek Compact plus, Irland) میزان گلوکز خون آن‌ها در روز صفر، روز ۷، روز ۱۴ و روز ۲۱ پس از القاء دیابت و شروع درمان بررسی شد.

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. به منظور حذف گلبول‌های قرمز پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۲۰۰، ۵ گرم بر میلی‌لیتر بافر لیزکننده (۵/۱۵-مول)

میکرولیتر از هر dNTP از هر ۲/۵ میلی‌مول در لیتر، ۱ واحد از Ex Taq DNA polymerase (Takara, Japan)، ۱ میکرولیتر از DNA مکمل، ۱ میکرولیتر از هر پیکومول پرایمر؛ PPAR γ , sense 5'-GAG ATG CCA TTC TGG CCC ACC (TAT CAT AAA TAA GCA TCA - antisense 5' و AAC TTC GGA-3' TGG AAT CCT GTG - β -actin, sense 5'; ATC GGA TGG TTC-3' TAAAAC GCA GCT CAG - antisense 5' و GCA TCC ATG AAA C-3' TAA CAG TCC G-3')

شرایط ترمال سایکلر بعد از بهینه سازی شامل: ۱: سیکل در ۷۰°C سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل برای ژن PPAR- γ (و ۲۶ سیکل برای β -actin control fragment) در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ژن PPAR γ (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 برمایند رنگ‌آمیزی شده و با دستگاه electrophoresis gel imaging system (UVP) مشاهده 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.

کلرید آمونیوم، ۱۰ میلی‌مول بی‌کربنات 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 ۲۰۰ g سانتی‌فیوژ 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 2×10^6 سلول در میلی‌لیتر از آن تهیه شد. این سلول‌ها در پلیت‌های 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 IL-17، IFN- γ 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 ۸۰°C- 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 $10 \times$ ، ۱

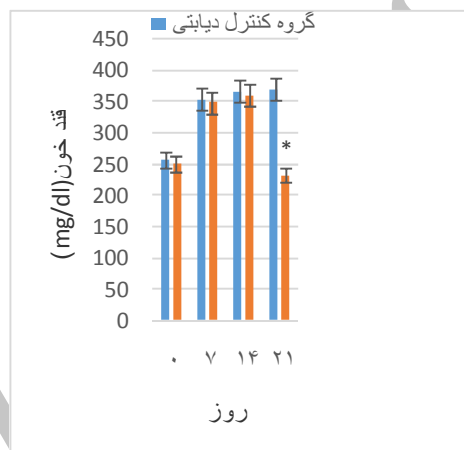
یافته‌ها

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 ($p < 0.05$) پایین‌تر بوده است (نمودار ۱)

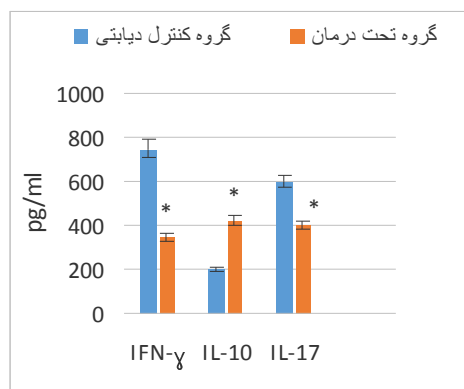
میزان سایتوکین‌های پیش‌التهابی IFN- γ و IL-17 تولید شده در مایع رویی کشت سلول‌های طحالی در گروه درمانی کاهش و در عوض سطح سایتوکین

ضد التهابی IL-10 افزایش معنی‌داری را نشان داد (نمودار ۲).

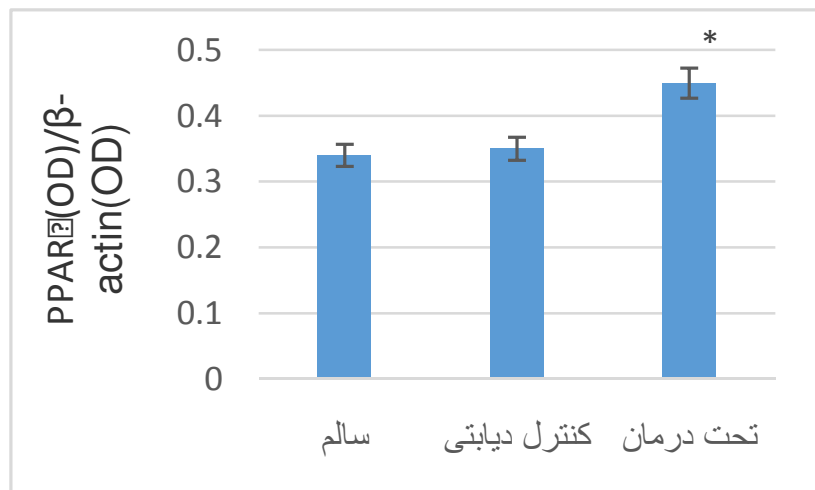
برای بررسی میزان بیان ژن PPAR- γ در طحال موش‌های دیابتی شده پس از طی ۲۱ روز از آغاز درمان از Semi-quantitative RT-PCR استفاده شد. نتایج ما نشان می‌دهد که بعد از ۲۱ روز از آغاز درمان میزان بیان mRNA ژن PPAR- γ به طور معنی‌داری در طحال موش‌های تحت درمان افزایش یافته است و هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل دیابتی و سالم وجود نداشت (نمودار ۳).



نمودار ۱: تأثیر پنتوکسی فیلین 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 دریافت‌کننده دارو و گروه کنترل دیابتی) میزان سایتوکین‌های پیش‌التهابی IFN- γ و IL-17 تولید شده در مایع رویی کشت سلول‌های طحالی در گروه درمانی کاهش و در عوض سطح سایتوکین ضد التهابی IL-10 افزایش معنی‌داری را نشان داد (نمودار ۲).



نمودار ۲: 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 $p < 0.05$ بین گروه دریافت‌کننده دارو و گروه کنترل دیابتی)



نمودار ۲: بیان ژن PPAR- γ در طحال موش های دیابتی شده تحت درمان با پنتوکسی فیلین. آنالیز RT-PCR mRNA ژن PPAR γ * سطح معنی داری در مقایسه با گروه کنترل دیابتی و گروه سالم

بحث

نقش مهمی در تخریب سلول های بتا پانکراس ایفا می کنند (۱۴). پنتوکسی فیلین مشابه سایر داروهای افزایش دهنده سطح cAMP باعث مهار سلول های Th1 و ممانعت از تولید سایتوکاین های پیش التهابی IL-2 و IFN- γ می شود، ولی بر Th2 اثر مهاری ندارد (۱۵).

IL-10 از جمله سایتوکاین های ضد التهابی مهمی است که نقش اصلی را در محدود کردن پاسخ های التهابی و ممانعت از ایجاد آسیب های بافتی را ایفا می کند (۱۶). این سایتوکاین به عنوان فاکتور مهار کننده ساخت سایتوکاین شناخته شده است (۱۷). مطالعات نشان داده اند که IL-10 به صورت اگزوزنوس یا با استفاده از القاء آن به وسیله پروبیوتیک های خوراکی در موش باعث جلوگیری از دیابت نوع ۱ در موش ها می شود (۱۸).

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

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

تحقیقات گذشته نشان می دهد عامل مهاری در جلوگیری از تخریب سلول های β سلول های Th2 می باشند که تولید سایتوکاین های IL-4 و IL-10 می کند. در حالی که سلول های Th1 با تولید سایتوکاین های پیش التهابی از جمله IFN- γ ، TNF- α و IL-12 باعث فعال سازی ماکروفاژ و T سل های سایتوتوکسیک شده که مسبب تخریب سلول های β پانکراس می باشند و از این طریق

سایتوکاین IFN- γ در ماکروفاژ می‌باشد (۲۲). PPAR γ و لیگاند هایش در درمان آنسفالومیلیت باعث کاهش تولید سایتوکاین‌های Th1 شده است (۲۴ و ۲۳). 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 γ 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 IFN γ بوده 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 PPAR γ باعث فعال‌سازی GATA-3 شده و از این طریق در درمان کولیت مؤثر بوده است (۲۶)، ولی تأثیر PPAR γ بر پاسخ Th17 مورد بررسی قرار نگرفته است.

نتیجه‌گیری

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

دارا می‌باشد. IL-17 سایتوکاین 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 (۲۰-۱۹) 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 γ می‌دهد که از جمله عوامل مهم در کنترل و درمان موش‌های دیابتی مورد مطالعه می‌باشد.

برای بررسی چگونگی روند مولکولی این اثر مهاری در کنترل بیماری دیابت خود ایمنی، میزان بیان mRNA ژن PPAR γ 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 در واکنش‌های ایمنی و التهابی مؤثر هستند (۱۲). مطالعه‌های گذشته نشان داده که PPAR γ در تنظیم بیان سایتوکاین‌های التهابی نقش دارد. PPAR γ به طور منفی تنظیم کننده بیان ژن

با انجام تحقیقات بیشتر احتمالاً 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.

Archive of SID

REFERENCES

1. Atkinson MA, McLaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl 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 synthase-dependent 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. PPAR γ and PPAR δ negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN γ 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, DiCampi 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.

Archive of SID

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

Malekifar F¹, Delirezh N^{1*}, Hobbenaghi R², Malekinejad H³, Soleimanzadeh A⁴

¹Department of Microbiology, Urmia University, Urmia, Iran, ²Department of Pathobiology, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran, ³Department of Pharmacology, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran, ⁴Department 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 (PPAR γ).

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 PPAR γ 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 PPAR γ 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 (PPAR γ) gene. *Armaghane-danesh* 2015; 20 (2): 103-113.