

## مقاله پژوهشی

## اثر آل ترانس رتینوئیک اسید بر هیستوپاتولوژی پانکراس موش‌های C57BL/6 دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

فرین ملکی فرد<sup>۱</sup>، نوروز دلیرز<sup>۱\*</sup>، رحیم حب نقی<sup>۲</sup>، حسن ملکی نژاد<sup>۳</sup>

۱- گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، ارومیه، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۹/۱۸

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۲/۱۰

## چکیده

**زمینه و هدف:** دیابت نوع ۱ یک بیماری خودایمن است و در اثر تولید ناکافی انسولین در بدن ایجاد می‌شود. آل ترانس رتینوئیک اسید (ATRA) آنتی‌اکسیدان، ضد سرطان و ضدالتهاب است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات آل ترانس رتینوئیک اسید بر هیستوپاتولوژی پانکراس در موش‌های دیابتی شده بود.

**مواد و روش‌ها:** دیابت به‌وسیله چندین دوز متوالی و کم استرپتوزوتوسین (STZ) در موش‌های نر C57BL/6 القا شد (روزانه ۴۰ mg/kg/day، ۵ روز متوالی). بعد از القاء دیابت، موش‌ها تحت درمان با آل ترانس رتینوئیک اسید به مدت ۲۱ روز (روزانه ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، داخل پریتونن) قرار گرفتند. در روز آخر، پانکراس جداسازی شده و به روش هماتوکسیلین انوزین (H&E) و گوموری آلدئید فوشین (GAF) برای بررسی‌های پاتولوژی پانکراس (تعداد جزایر، تعداد سلول‌های بتا و قطر جزایر) رنگ‌آمیزی گردید.

**نتایج:** درمان با ATRA در موش‌های دیابتی شده سبب افزایش میانگین تعداد جزایر، قطر جزایر و تعداد سلول‌های بتا در مقایسه با گروه کنترل دیابتی گردید ( $P < 0.05$ )

**نتیجه‌گیری:** این یافته‌ها نشان می‌دهد که ATRA سبب بهبود بافت پانکراس در طی تخریب سلول‌های بتا پانکراس در دیابت نوع ۱ ناشی از القاء توسط STZ در موش می‌گردد.

**کلمات کلیدی:** دیابت نوع ۱، آل ترانس رتینوئیک، پانکراس، استرپتوزوتوسین

## مقدمه

دیابت تیپ ۱ بیماری خودایمن ویژه اندام است که به‌صورت خودبه‌خودی اتفاق می‌افتد و با تخریب انتخابی سلول‌های بتا تولیدکننده انسولین در جزایر لانگرهانس پانکراس توسط حمله سلول‌های ایمنی به‌ویژه لنفوسیت‌های T اتوراکتیو و سایتوکاین‌های تولیدشده توسط این سلول‌ها به وجود می‌آید مشخص می‌شود (۱). عوارض بیماری دیابت شامل حمله قلبی، نارسایی کلیوی، کوری، سکتة مغزی است (۲). Insulinitis از ویژگی‌های هیستوپاتولوژیک دیابت تیپ ۱ یا دیابت وابسته به انسولین است. مشخصه Insulinitis ارتشاح سلول‌های تک‌هسته‌ای در جزایر لانگرهانس است. اکثر سلول‌های ارتشاح یافته معلوم شده است که سلول‌های CD8+ T هستند، پس‌از آن ماکروفاژها، سلول‌های CD4+ T و لنفوسیت‌های B می‌باشند. تظاهر بالینی دیابت نوع ۱ زمانی است که مرحله نهایی Insulinitis وقوع یافته است و تخمین زده می‌شود که در زمان تشخیص، تنها ۱۰ تا ۲۰ درصد از سلول‌های β هنوز عملکرد خود را حفظ کرده باشند (۳). (۴) استرپتوزوتوسین در ابتدا به‌عنوان یک آنتی‌بیوتیک و عامل

دیابت تیپ ۱ بیماری خودایمن ویژه اندام است که به‌صورت خودبه‌خودی اتفاق می‌افتد و با تخریب انتخابی سلول‌های بتا تولیدکننده انسولین در جزایر لانگرهانس پانکراس توسط حمله سلول‌های ایمنی به‌ویژه لنفوسیت‌های T اتوراکتیو و سایتوکاین‌های تولیدشده توسط این سلول‌ها به وجود می‌آید مشخص می‌شود (۱). عوارض بیماری دیابت شامل حمله قلبی، نارسایی کلیوی، کوری، سکتة مغزی است (۲). Insulinitis از

\*نویسنده مسئول: نوروز دلیرز، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران  
Email: n.delirez@urmia.ac.ir



نور کافی نگهداری شدند. کلیه مراحل این تحقیق در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه ارومیه بررسی و بر اساس مصوبه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مورد تأیید قرار گرفت. موش‌ها بعد از اطمینان از القاء دیابت در آن‌ها به صورت 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 شد. 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 (روزانه ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) برای ۲۱ روز متوالی به صورت داخل صفاقی قرار گرفتند (گروه تحت درمان).

#### -القاء دیابت

قبل از تجویز هر دوز STZ (streptozotocin) موش‌ها به مدت چهار ساعت ناشتا بوده و حتی پوشال بستر آن‌ها نیز جمع‌آوری شد سپس STZ (Sigma, Germany) را به صورت داخل صفاقی تا پنج روز متوالی دریافت کردند (۴۰ mg/kg/day) در ۲۰۰ میکرولیتر سیترات بافر با pH=4.5 که ۱۰ دقیقه قبل از تجویز حل شد. موش‌ها دیابتی شده زمانی ارزیابی شدند که میزان قند خون ناشتا آن‌ها بیشتر از ۲۵۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر بود.

#### -ارزیابی قند خون ناشتا:

بدین منظور توسط سرنگ‌های انسولینی بعد از مقید کردن موش‌ها از ورید دمی آن‌ها اقدام به خون‌گیری کرده و سپس توسط دستگاه خودکار گلوکومتر (Accu-Chech Compact plus, Irland) میزان گلوکز خون آن‌ها اندازه‌گیری شد.

#### - بررسی تغییرات پاتولوژیکی پانکراس

بدین منظور ۲۱ روز پس از آخرین دوز تجویزی STZ موش‌ها نخاعی شدند؛ و اقدام به جمع‌آوری پانکراس آن‌ها (تمامی گروه‌ها) شد و بلافاصله پانکراس‌ها در فرمالین بافری ۱۰ درصد خنک قرار گرفتند. بعد از تهیه بلوک‌های پارافینی، مقاطع تهیه و سپس لام‌ها به دو روش رنگ‌آمیزی شدند: هماتوکسیلین و ائوزین (۱۴) و رنگ‌آمیزی آلدئید فوشین برای بررسی سلول‌های بتا جزایر به روش Gomori با استفاده از کیت رنگ‌آمیزی گوموری آلدئید فوشین (GAF) (Gomori Aldehyde-fuchsin) (شرکت شیمی پژوهش آسیا-ایران) (۱۵). سپس لام‌ها با میکروسکوپ نوری توسط یک نفر پاتولوژیست و به صورت کور از نظر تعداد جزایر، تعداد سلول‌های بتا و اندازه جزایر

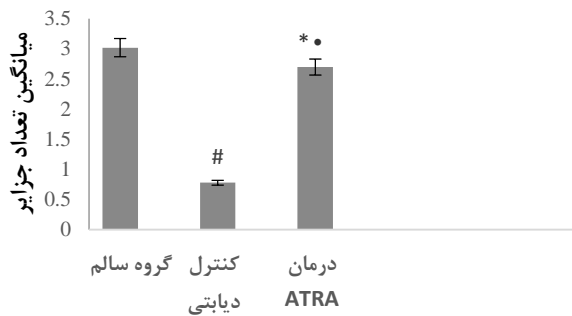
ضد تومور استفاده می‌شد ولی در حال حاضر معمولاً برای القاء دیابت وابسته به انسولین در جوندگان به دلیل آثار سمی آن بر سلول‌های  $\beta$  جزایر لانگرهانس استفاده می‌گردد (۵).

آل ترانس رتینوئیک اسید (ATRA) از جمله متابولیت‌های فعال ویتامین A است که نسبت به سایر متابولیت‌های آن پایدارتر بوده و قدرت نفوذ بیشتری به داخل سلول دارد. ATRA دارای تأثیرات ضد سرطانی (antineoplastic)، تعدیل‌گر ایمنی و آنتی‌اکسیدانی است (۶) و اثرات مختلفی بر روی سلول‌های سیستم ایمنی دارد. برای مثال موجب مهار تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی از جمله اینترفرون گاما شده و افزایش تولید مدیاتورهای ضدالتهابی در سلول‌های ایمنی، سلول‌های CD4+ را سبب می‌گردد (۷). علاوه بر این، با توجه به اثرات متنوع آن بر سیستم ایمنی، ATRA در جلوگیری از پیشرفت مدل جانوری برخی از بیماری‌های خودایمن از جمله آنسفالومیلیت خودایمن تجربی (۸)، نفریت خودایمن (۹) و آرتریت خودایمن (۱۰) مؤثراند.

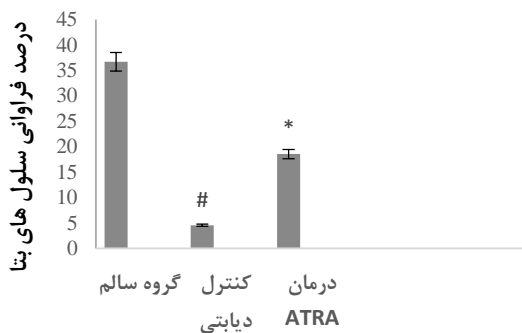
در دیابت نوع ۱، هیپر گلیسمی باعث القاء استرس اکسیداتیو و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن می‌گردد و در نتیجه سبب تخریب سلول‌های بتا پانکراس می‌شود (۱۱). تحقیقات مختلف نشان دادند که برخی از عوامل فارماکولوژیکی قادرند سلول‌های بتا را محافظت کرده و موجب بهبود موقت یا دائمی دیابت گردند (۱۲). با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی و تعدیل‌کنندگی ایمنی ATRA و نظر به اینکه بیماری دیابت نوع ۱ ماهیت خود التهابی دارد و رادیکال‌های آزاد از جمله نیتریک اکساید و سایتوکاین‌های پیش التهابی از جمله  $\text{IFN-}\gamma$ ، IL-17 و IL-12 در ایجاد آسیب‌های بسیار در دیابت خودایمن نقش به‌سزایی دارد (۱۳)، لذا 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 تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت پانکراس در موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین گردید.

#### مواد و روش‌ها

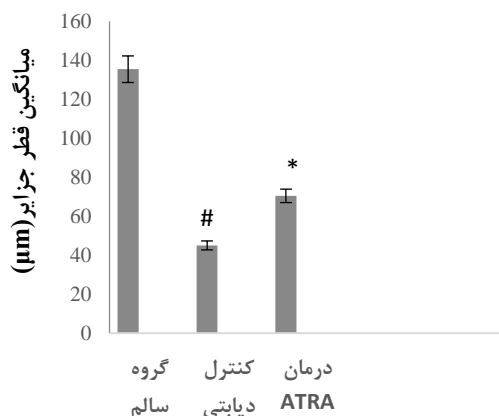
در این مطالعه که به صورت تجربی انجام شد، جامعه مورد مطالعه شامل موش‌های نر نژاد خالص C57BL/6 با محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته (وزن: ۲۰-۱۵) گرم که از انیستیتو پاستور ایران خریداری شده بودند. این موش‌ها در حیوان خانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه در شرایط استاندارد آب، غذا، دما و



**نمودار ۱-** میانگین تعداد جزایر (\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  بین گروه دریافت‌کننده دارو و گروه کنترل دیابتی) (# نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  بین گروه کنترل دیابتی و گروه سالم) (عدم وجود اختلاف معنی‌دار با گروه سالم  $P > 0.05$ )



**نمودار ۲-** درصد فراوانی سلول‌های بتا به تفکیک هر گروه (\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  بین گروه‌های دریافت‌کننده دارو و گروه کنترل دیابتی) (# نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  بین گروه کنترل دیابتی و گروه سالم)



**نمودار ۳-** میانگین قطر جزایر (\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  بین گروه‌های دریافت‌کننده دارو و گروه کنترل دیابتی) (# نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  بین گروه کنترل دیابتی و گروه سالم)

میانگین جزیره) مورد بررسی قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری متوسط تعداد جزایر ۵ فیلد در بزرگ‌نمایی 100X میکروسکوپ به‌طور تصادفی انتخاب گردید و پس از شمارش تعداد جزایر در هر فیلد متوسط آن به دست آمد (۱۶). درصد سلول‌های بتا جزایر از طریق شمارش تعداد سلول‌های به رنگ بنفش ارغوانی در رنگ‌آمیزی آلدئید فوشین در جزایر تعیین گردید. جهت اندازه‌گیری قطر جزایر، از هر لام ۵ جزیره به‌طور تصادفی انتخاب گردید و سپس با استفاده از عدسی چشمی خاصی که میکرومتر چشمی یا گراتیکول نام دارد، با بزرگ‌نمایی 400X قطر کوچک و بزرگ هر جزیره برحسب میکرومتر تعیین گردید و با قرار دادن اندازه‌ها در فرمول زیر قطر میانگین هر جزیره محاسبه و سپس قطر متوسط جزایر محاسبه گردید (۱۶).

$$MD: \sqrt{L \times S} \times \text{magnification}$$

MD: قطر میانگین

L: قطر بزرگ جزیره

S: قطر کوچک جزیره

Magnificant: بزرگ‌نمایی عدسی

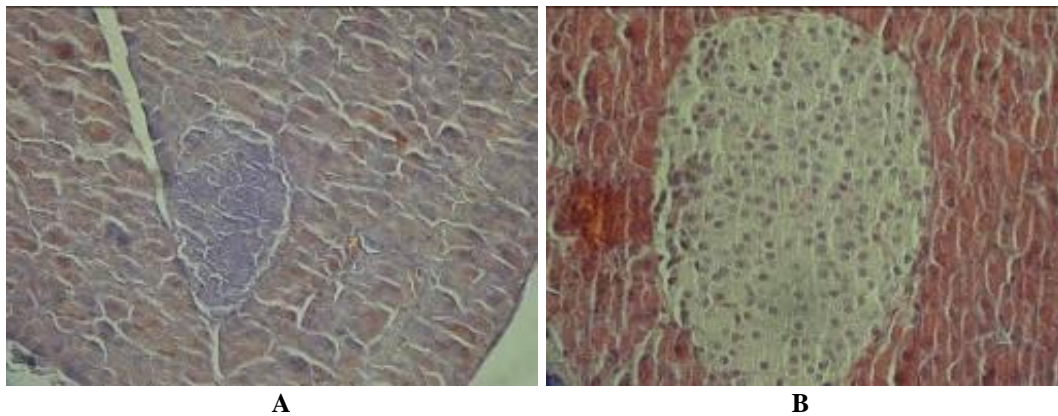
### آنالیز آماری:

از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و Tukey s test برای مقایسه بین گروه‌ها استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها  $P < 0.05$  به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel (۲۰۰۷) استفاده شد. داده‌ها به‌صورت  $\text{Means} \pm \text{SD}$  گزارش گردید.

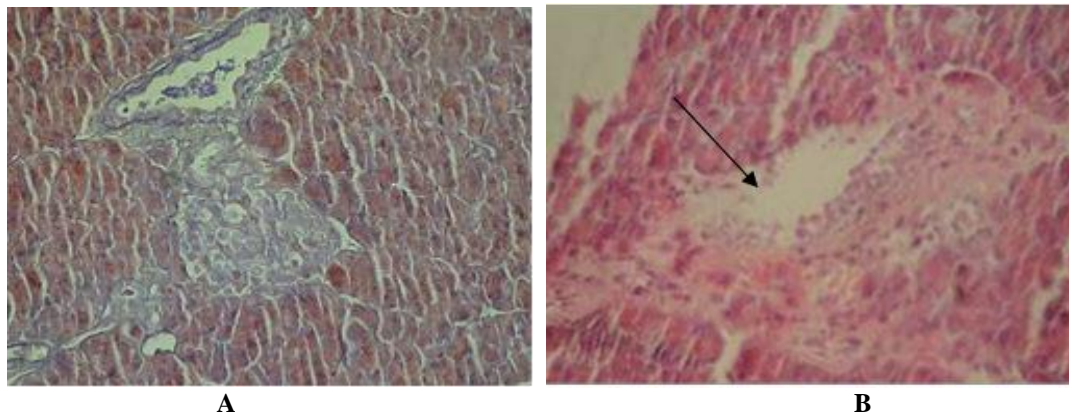
## نتایج

### نتایج بررسی تغییرات پاتولوژیکی پانکراس

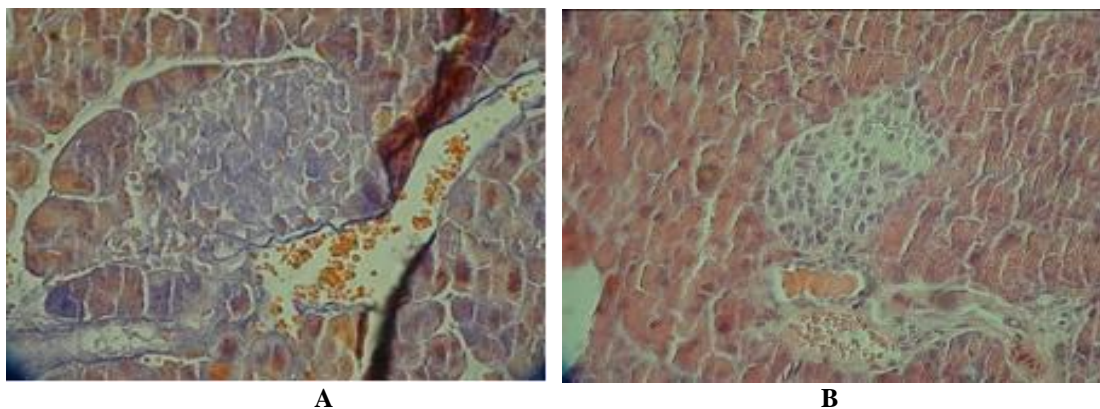
استرپتوزوتوسین در گروه کنترل دیابتی سبب تغییرات شدید در سطح وسیعی از جزایر پانکراس، کاهش تعداد جزایر، کاهش تعداد سلول‌های بتا (درصد سلول‌های فوشین مثبت جزایر) و کاهش اندازه جزایر (میانگین قطر جزایر) در مقایسه با گروه سالم در مقاطع رنگ‌آمیزی شده به روش H&E و آلدئید فوشین گردید. درحالی‌که درمان با ATRA سبب بهبود این تغییرات گردید، به این صورت که از کاهش تعداد جزایر، تعداد سلول‌های بتا و میانگین قطر جزایر در مقایسه با گروه کنترل دیابتی جلوگیری نمود. به‌طوری‌که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌درمانی و گروه سالم مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ) (نمودارها و اشکال زیر).



شکل ۱- پانکراس موش - A- گروه سالم -رنگ آمیزی آلدهید فوشین (X400). B- گروه سالم رنگ آمیزی H&E (X400). هیچ نوع ضایعاتی دیده نمی شود.



شکل ۲- پانکراس موش - A- گروه کنترل دیابتی -رنگ آمیزی آلدهید فوشین (X400). B- گروه کنترل دیابتی رنگ آمیزی H&E (X400). نکروز گسترده در جزیره (Massive Necrosis) (اشاره شده با فلش) و از هم پاشیدگی بافتی، نفوذ سلول های تک هسته ای التهابی و کاهش تعداد جزایر، اندازه آنها و تعداد سلول های بتا دیده می شود.



شکل ۳- پانکراس موش - A- گروه درمان شده با ATRA -رنگ آمیزی آلدهید فوشین (X400). B- گروه درمان شده با هر ATRA - رنگ آمیزی H&E (X400). پانکراس موش های درمان شده با ATRA ضایعات بسیار کمتری در مقایسه با گروه کنترل دیابتی داشته است. همچنین تعداد سلول های تک هسته ای التهابی اندکی در جزیره مشاهده می شود



## بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر بررسی‌های پاتولوژیک نشان دادند سلول‌های جزایر لانگرهانس در گروه کنترل سالم، تغییراتی نداشته و کاملاً سالم بودند. در صورتی که در گروه موش‌های کنترل دیابتی نکرورز گسترده در جزایر، کاهش تعداد و اندازه جزایر و کاهش سلول‌های بتا بود و تغییرات عمومی هم شامل پرخونی، ادم، ضخیم شدن دیواره‌ی عروق، نفوذ سلول‌های تک‌هسته‌ای التهابی نیز در بافت پانکراس موش‌های کنترل دیابتی ملاحظه شد. درمان با ATRA سبب افزایش تعداد جزایر، میانگین قطر جزایر و تعداد سلول‌های بتا در مقایسه با گروه دیابتی گردید.

مطالعات گذشته نشان می‌دهد استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی (۱۷، ۱۸) و یا برخی داروها (۱۴، ۱۹، ۲۰) سبب رژنراسیون سلول‌های بتا و افزایش سلول‌های بتا و بهبود قطر جزایر لانگرهانس گردیده و عوارض دیابت نوع ۱ در بافت پانکراس بهبود می‌بخشد.

در جوندگان دیابت تجربی وابسته به انسولین را می‌توان با دوز متعدد کم استرپتوزوتوسین (MLDS: Multiple low doses of streptozotocin) القا کرد. این مدل حیوانی معمولاً به دلیل مشابهت‌های بسیار به دیابت نوع ۱ در انسان از نظر ویژگی‌های بافت‌شناسی و بالینی و مشارکت ماکروفاژها و سلول‌های T در ایجاد دیابت استفاده می‌شود. استرپتوزوتوسین (STZ) یک سم سلول‌های  $\beta$  پانکراس است و زمانی که در دوزهای پایین متعدد تجویز گردد باعث التهاب جزایر توسط سلول‌های ایمنی می‌شود (۲۱). موش‌های C57BL/6 که «C57 سیاه ۶» و یا «سیاه ۶» نیز نامیده می‌شود، دارای برخی مزایا مانند ظهور هم‌زمان دیابت در تمام حیوانات و نداشتن اختلالات سیستم ایمنی که ممکن است در مطالعات مشابه در دیابت خود به خودی در موش‌های (NOD: Non-obese diabetic) و یا پرورش رت‌های بیو بریدینگ (BB: Bio Breeding) مشاهده گردد و همچنین مقاومت نژادی و پرورش آسان آن در تحقیقات استفاده می‌گردد؛ بنابراین، این مدل به‌عنوان یک مدل ایده‌آل به‌طور گسترده به‌منظور بررسی دیابت نوع ۱، به‌خصوص مطالعه مسیرهای ایمنی و ایجاد insulinitis خودایمنی و مرگ سلول‌های  $\beta$  استفاده شده است (۲۲). به همین دلیل القاء دیابت در دوزهای متوالی و پایین (MLDS)، در موش‌های C57BL/6J جهت بررسی تأثیرات دارو ATRA بر سیمای هیستوپاتولوژیک پانکراس در T1D انتخاب شدند.

تحقیقات گذشته نشان می‌دهد استرپتوزوتوسین از طریق تولید گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن باعث شکست DNA و تخریب سلول‌های بتا می‌گردد (۲۱). در این مطالعه نیز تیمار موش‌های دیابتی شده با ATRA از طریق کاهش استرس اکسیداتیو سبب بهبود آسیب سلول‌های بتا پانکراس ناشی از STZ می‌گردد.

تحقیقات گذشته نشان می‌دهد سلول‌های Th1 با تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی از جمله  $\text{TNF-}\beta$ ،  $\text{IFN-}\gamma$  و IL-12 و سلول‌های Th1 با تولید سایتوکاین‌هایی از جمله IL-17 باعث فعال‌سازی ماکروفاژ و T سل‌های سایتوتوکسیک شده که مسبب تخریب سلول‌های  $\beta$  پانکراس می‌باشند. در حالی که سلول‌های Th2 فعال شده با ترشح سایتوکاین IL-4 و IL-10 مانع تخریب سلول‌های  $\beta$  از طریق القاء پولاریزاسیون Th0 به سمت Th2 می‌شوند (۲۳). در پاسخ به تحریک سایتوکاین، سلول‌های  $\beta$  گونه‌های راکتیو اکسیژن (ROS) و گونه‌های راکتیو نیتروژن مانند اکسید نیتریک (NO) را تولید می‌کند که از این طریق نابودی خود را سبب می‌شوند. همچنین NO در ماکروفاژهای فعال شده توسط سایتوکاین به‌وسیله نیتریک اکساید سنتاز قابل القاء (iNOS) تولید می‌شود (۲۴).

آل ترانس رتینوئیک اسید (All trans retinoic acid (ATRA)) یا ترتینوئین به همراه ۹-سیس رتینوئیک اسید و ۱۳-سیس رتینوئیک اسید متابولیت‌های فعال ویتامین A می‌باشند. این متابولیت‌های فعال ویتامین A در تنظیم فعالیت‌های مختلف سلولی از جمله پرولیفراسیون، تمایز و مرگ سلولی در سلول‌های مختلف نقش دارند. رسپتور متابولیت‌های ویتامین A شامل رتینوئیک اسید رسپتور ( $\text{RAR}\alpha, \beta, \gamma$ ) و رتینوئیک X رسپتور ( $\text{RXR}\alpha, \beta, \gamma$ ) است که آل ترانس رتینوئیک اسید به‌عنوان لیگاند بیولوژیک برای فعال‌سازی رسپتور RXR است و سایر متابولیت‌ها به‌عنوان لیگاند برای هر دو نوع رسپتور RAR و RXR است (۲۵).

ATRA در درمان بیماری‌های پوستی از جمله آکنه و کراتوزیس پیلاریس و همچنین در درمان لوسمی پرومیلوسیتی حاد کاربرد دارد. در سیستم ایمنی رتینوئیک اسید نقش مهمی در تنظیم عملکرد سلول‌های مختلف ایمنی دارد. از جمله مانع پاسخ‌های Th-1 می‌گردد و پاسخ‌های Th-2 را تقویت می‌کند (۲۶).



است. در نتیجه یک استراتژی درمانی استفاده از پاک‌کننده‌های رادیکال‌های آزاد (Free radical scavengers) و آنتی‌اکسیدان‌ها برای جلوگیری از وقوع مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی مطرح می‌شود (۳۴).

تحقیقات محققان نشان دادند در موش‌های دیابتی تعداد و قطر جزایر کاهش یافته و سلول‌های جزایر دچار آتروفی می‌گردند. به‌طور کلی عوامل اصلی تخریب جزایر پانکراس ورود سلول‌های تک‌هسته‌ای التهابی از جمله لنفوسیت‌ها، سایتوکاین‌های پیش التهابی و رادیکال‌های آزاد از جمله نیتریک اکساید است (۱۴). نویسندگان این مقاله در راستای این تحقیق دریافتند که ATRA سبب کاهش میزان سایتوکاین‌های پیش التهابی IL-17 و IFN- $\gamma$ ، کاهش سطح نیتریک اکساید و افزایش سایتوکاین ضد التهابی IL-10 و TGF- $\beta$  و کاهش تکثیر لنفوسیتی می‌گردد (۳۵).

مشابه تحقیقات هیستوپاتولوژیک متعدد بر روی پانکراس که نشان می‌دهد امکان ترمیم و بازسازی جزایر آسیب‌دیده نزدیک به حالت اولیه و افزایش تعداد سلول‌های بتا با استفاده از تیمارهای مختلف وجود دارد (۲۰-۱۶)، استنباط نویسندگان این مقاله این است که ATRA قادر است سبب کاهش استرس اکسیداتیو از طریق کاهش سطح نیتریک اکساید و کاهش میزان سایتوکاین‌های پیش التهابی و اثرات مخرب این سایتوکاین‌ها گردد و در نتیجه جزایر پانکراس را بازسازی کرده و تعداد سلول‌های بتا در مقایسه با کنترل دیابتی افزایش می‌یابد. به‌طور کلی نتایج این تحقیق و تحقیقات گذشته ما نشان داد که با کاهش عوامل اصلی مخرب سلول‌های بتا سبب بهبود و بازسازی جزایر گردید.

### تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه دکتری تخصصی ایمنی‌شناسی خانم دکتر فرین ملکی فرد به شماره پایان‌نامه ۵۱-۲ د بوده است. نگارندگان از زحمات کارکنان دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه کمال تشکر و تقدیر را دارند.

### تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

رادیکال‌های آزاد سبب آسیب‌های بسیاری در دیابت خودایمن می‌گردد (۲۷، ۲۸). همان‌طور که ثابت شده است در دیابت خود ایمن نوع ۱ مرگ سلول‌های  $\beta$  جزایر لانگرهانس پانکراس رخ می‌دهد که ممکن است تحت القاء سایتوکاین‌هایی مثل IFN- $\gamma$  باشد پس در این بیماری آپوپتوز سلول‌های  $\beta$  روی می‌دهد که ممکن است به علت برخورد مستقیم سلول‌های التهابی و ایمنی فیلتر شده به جزایر و یا برخورد مدیاتورهای توکسیکی باشد که از این سلول‌ها ترشح می‌شود مثل سایتوکاین‌های پیش التهابی (TNF- $\alpha$ ، IFN- $\gamma$ )، رادیکال‌های آزاد از جمله نیتریک اکساید، fas لیگاند و پرفورین (۲۹).

نیتریک اکساید به‌عنوان یک مولکول سیگنال دهنده دارای اثرات بیولوژیکی متفاوتی بوده و در مقادیر زیاد می‌تواند دارای اثرات استرس اکسیداتیو باشد (۳۰). سایتوکاین‌ها از طریق تحریک آنزیم iNOS و تولید سطح بالایی از نیتریک اکساید باعث اختلال در عملکرد و کاهش زنده‌بودن سلول‌های بتا که تولیدکننده انسولین هستند می‌شود. محرک‌هایی که سبب افزایش بیان آنزیم نیتریک اکساید سنتاز ۲ می‌گردند عبارت‌اند از TNF- $\alpha$ ، IL-1 $\beta$  و IFN- $\gamma$ . این سایتوکاین‌ها در سلول‌های جزایر انسان و جوندگان باعث تحریک رونویسی iNOS می‌شود. این آنزیم باعث تولید NO از ال-آرژنین می‌شود و تولید NO باعث مهار ترشح انسولین می‌گردد (۳۱). ماکروفاژها نقش اساسی در تنظیم بیان آنزیم نیتریک اکساید سنتاز ۲ (iNOS) در جزایر از طریق آزادسازی سایتوکاین‌هایی مانند TNF- $\alpha$  و IL-1 $\beta$  ایفا می‌کند. سلول‌های آندوتلیال جزایر لانگرهانس به‌عنوان منبع اصلی نیتریک اکساید هستند و در طی گسترش دیابت خودایمن باعث تخریب سلول‌های بتا می‌گردند (۳۲). از مکانیسم‌های دیگر در تخریب سلول‌های بتا القاء مرگ برنامه‌ریزی شده به‌وسیله گیرنده سطحی Fas (CD95/APO-1) و لیگاند اختصاصی آن یعنی FasL گیرنده Fas بر روی سلول‌های بسیاری بیان می‌شود ولی FasL بر روی تعداد محدودی سلول از جمله سلول‌های T فعال شده و سلول‌های NK بیان می‌گردد. در سلول‌های بتا در حالت نرمال گیرنده Fas را بیان نمی‌کنند ولی مواجهه با سایتوکاین IL-1 $\beta$  باعث بیان آن بر روی سطح سلول‌های بتا می‌گردد (۳۳). علاوه بر این تولید NO نیز در این امر دخیل

## References

1. Roep BO. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia*. 2003; 46(3): 305-21.
2. Rossini AA, Like AA, Chick WL, Appel MC, Cahill Jr GF. Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; 74(6): 2485–89.
3. Edward HL. Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and insulinitis in C57BL mice: Influence of inbred background, sex, and thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982; 79(2): 630–
4. Crume TL, Hamman RF, Isom S, Talton J, Divers J, Mayer-Davis EJ, et al. Factors influencing time to case registration for youth with type 1 and type 2 diabetes: SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Ann Epidemiol*. 2016; 26(9):631-7.
5. Honjo K, Doi K, Doi C, Mitsuoka T. Histopathology of streptozotocin-induced diabetic DBA/2N and CD-1 mice. *Lab Anim*. 1986; 20(4): 298-303.
6. Elias, KM. Laurence, A. Davidson, TS. Stephens, G. Kanno, Y. Shevach, EM. et al. 2008. Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway. *Blood*. 2012; 111(3): 1013-20.
7. Xiao S, Jin H, Korn T, Liu SM, Oukka M, Lim B, et al. Retinoic Acid Increases Foxp3+ Regulatory T Cells and Inhibits Development of Th17 Cells by Enhancing TGF- $\beta$ -Driven Smad3 Signaling and Inhibiting IL-6 and IL-23 Receptor Expression. *J Immunol*. 2008; 181(4): 2277-2284.
8. 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(4): 1331–1337.
9. 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(1): 3.
10. Brinckerhoff CE, Coffey JW, Sullivan AC. Inflammation and collagenase production in rats with adjuvant arthritis reduced with 13-cis-retinoic acid. *Science*. 1983; 221(4612): 756–758.
11. Hernandez-Perez M, Chopra G, Fine J, Conteh AM, Anderson RM, Linnemann AK, et al. Inhibition of 12/15-Lipoxygenase Protects Against  $\beta$  Cell Oxidative Stress and Glycemic Deterioration in Mouse Models of Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2017; 22(11):170-215.
12. Cheng ST, Chen L, Li SY, Mayoux E, Leung PS. The effects of empagliflozin, an SGLT2 inhibitor, on pancreatic  $\beta$ -cell mass and glucose homeostasis in type 1 diabetes. *PloS one*. 2016; 25; 11(1):e0147391.
13. Serzeze DV, Chapman HD, Post CM, Johnson EA, Suarez-pinzon WL, Rabinovitch A. Th1 to Th2 cytokine shifts in nonobese diabetic mice: sometimes an outcome, rather than The cause of diabetes resistance elicited by immunostimulation. *J Immunol*. 2001; 166(2):1352-1359.
14. Xiu LM, Miura AB, Yamamoto K, Kobayashi T, Song QH, Kitamura H, et al. Pancreatic islet regeneration by ephedrine in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Am J Chin Med* 2001; 29(03n04):493-500.
15. Gomori G. Aldehyde-fuchsin, A new staining for elastic tissue. *Am J Path* 1950; 17(20):395-406
16. Jelodar j, Maleki M, Motadayen H, Sirus SH. Effect of fenugreek, onion and garlic on blood glucose and histopathology of pancreas of alloxan in duced diabetic rats. *Trad CAM*. 2007; 4 (3):299 - 305
17. Yazdanparast R, Eslami MA, Ashrafi HJ. Teucrium polium extract effects pancreatic function of streptozotocin diabetic rats: A histological examination. *Iran Biomed J*. 2005; 9(2): 81-5
18. Asgary S, Parkhideh S, Solhpour A, Madani H, Mahzouni P, Rahimi P. Effect of ethanolic extract of *Juglans regia* L. on blood sugar in diabetes-induced rats. *J Med Food*. 2008; 11(3): 533-8
19. Khorsandi LS, Bahramzadeh S, Hashemitabar M, Kalantar Mahdavi SR. Metformin Effect on the Mouse Pancreatic Langerhans Islet s Volume. *ZUMS Journal*. 2011; 19(74):9-19. [Article in Persian]
20. Kuznetsova A, Yu Y, Hollister-Lock J, Opare-Addo L, Rozzo A, Sadagurski M, et al. Trimeprazine increases IRS2 in human islets and promotes pancreatic  $\beta$  cell growth and function in mice. *JCI insight*. 2016; 17;1(3).
21. Amirshahrokhi K, Dehpour AR, Hadjati J. Methadone ameliorates multiple-low-dose streptozotocin-induced type 1 diabetes in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008; 232(1):119–24.
22. Yang Z, Chen M, Fialkow LB. The novel anti-inflammatory compound, lisofylline, prevents diabetes in multiple low-dose streptozotocin-treated mice. *Pancreas*. 2003; 26(4): e99–104.
23. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Roles of cytokines in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes. *Cell Biochem Biophys*. 2007; 48(2-3): 159–163.
24. Brtko J, Thalhamer J. Renaissance of the biologically active vitamin A derivatives: established and novel directed therapies for cancer and chemoprevention. *Curr Pharm*. 2003; 9(25): 2067-2077
25. Lee HP, Casadesus G, Zhu X, Lee HG, Perry G, Smith MA, et al. All-trans retinoic acid as a novel therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*. 2009; 9(11):1615-21.
26. Kang SG, Lim HW, Andrisani OM, Broxmeyer HE, Kim CH. Vitamin A metabolites induce gut-homing FoxP3 +regulatory T cells. *J Immunol*. 2007; 179(6): 3724–3733.
27. Pitocco D, Zaccardi F, Stasio E, Romitelli F, Santini SA. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. The review of diabetic studies. 2010; 7(4):15-25.



28. Banner KH, Trevethick MA. PDE4 inhibition: a novel approach for the treatment of inflammatory bowel disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2004; 25(8): 430–436.
29. 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(3): 581–586.
30. Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol.* 2008; 21(1):172-88.
31. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992; 6(12): 3051-64.
32. Balon TW. Role of nitric oxide in contraction induced glucose transport. *Adv Exp Med Biol.* 1998; 441(13): 87-95.
33. Stassi G, Todaro M, Richiusa P, Giordano M, Mattina A, Sbriglia MS, et al. Expression of apoptosis-inducing CD95 (Fas/Apo-1) on human beta-cells sorted by flow-cytometry and cultured in vitro. *Transplant Proc.* 1995; 27(6):3271–3275.
34. Zumsteg U, Frigerio S, Holländer G. Nitric Oxide Production and Fas Surface Expression Mediate Two Independent Pathways of Cytokine-Induced Murine  $\beta$  - Cell Damage. *DIABETES.* 2000; 49(1): 39-47.
35. Malekifard F, Delirez N, Hobbenaghi R, Malekinejad H. Treatment of type 1 diabetic mice with all-trans retinoic acid by inhibition of proinflammatory cytokines. *URMIA MED J.* 2014; 25(9): 784-790. [Article in Persian]





Original Article

## Investigating the Effects of All-trans Retinoic Acid on Histopathology of Pancreas of Streptozotocin -Induced Diabetes in C57BL/6 Mice

Malekifard F<sup>1</sup>, Delirez N<sup>1\*</sup>, Hobbenaghi R<sup>2</sup>, Malekinejad H<sup>3</sup>

1. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
2. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
3. Department of Pharmacology, University of Medical Sciences, Urmia, Iran

Received: 30 Apr 2017

Accepted: 09 Dec 2017

### Abstract

**Backgrounds & Objectives:** Type 1 diabetes is an auto-immune disease and caused by insufficient insulin production by the body. All-trans Retinoic Acid (ATRA) is an antioxidant, anti-cancer and anti-inflammatory agent. The objective of the present study was to investigate the effects of ATRA on histopathology of pancreas in diabetic mice.

**Material & Methods:** Diabetes was induced by multiple low-dose of streptozotocin injection (40 mg/kg/day for 5 consecutive days) in male C57BL/6 mice. After induction of diabetes, mice were treated with ATRA (20 mg/kg/day i.p.) for 21 days. On the last day, pancreases were isolated and stained with hematoxylin & eosin (H&E) and Gomori aldehyde fuchsin (GAF) for histological analyses (the number of islets and  $\beta$  cells, diameter of islets) of pancreas.

**Results:** ATRA treatment in streptozotocin-induced diabetic mice was increased the mean diameter of islets and the number of islets and beta cells compared to the diabetic group. ( $p < 0/05$ ).

**Conclusion:** The administration of ATRA improved pancreas tissue during destruction of the pancreatic beta-cells in STZ-induced type 1 diabetes in mice.

**Keywords:** Type 1 diabetes, All-trans Retinoic Acid, Pancrease, Streptozotocin

\* **Corresponding Author:** Nowruz Delirez, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran  
Email: n.delirez@urmia.ac