

استفاده از مهار کننده فاکتور نسخه برداری NF-κB در جزایر پانکراس

مهسا محمدآملی^{۱*}، روح اله موسوی زاده^۱، پروین امیری^۱، باقر لاریجانی^۱

چکیده

مقدمه: پیوند جزایر پانکراس به عنوان روشی مناسب در درمان بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ شناخته شده است. هر چند فعال شدن سایتوکین‌های پیش‌التهابی مترشحه از خود جزایر پانکراس منجر به وقایع التهابی به هم پیوسته‌ای می‌گردد که باعث از دست رفتن پیوند به طور حاد و یا مزمن می‌گردد. مسیر سیگنالی NF-κB در پاسخ به استرسهای ناشی از جداسازی و تخلیص جزایر پانکراس فعال می‌گردد که ترشح و آزادسازی مدیاتورهای التهابی از جمله MCP-1 را به دنبال دارد. این امر نقش مهمی در فعال‌سازی سلولهای ایمنی و تجمع این سلولها در محل پیوند ایفا می‌نماید که باعث تشدید پروسه وازنش پیوند می‌گردد.

روش‌ها: در این مطالعه سعی بر این بوده تا اثر Curcumin به عنوان یک بازدارنده قوی NF-κB بر تولید MCP-1 از جزایر پانکراس و عملکرد جزایر در شرایط *in vitro* مورد مطالعه قرار گیرد.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده نشان داد که Curcumin در محیط کشت باعث کاهش ترشح MCP-1 از جزایر پانکراس در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد و در مقادیر مورد نظر باعث کاهش عملکرد جزایر پانکراس نگردید.

نتیجه‌گیری: تحقیقات بر روی محرک‌هایی که باعث القاء تولید و ترشح فاکتورهای التهابی از جزایر پانکراس می‌گردد و مکانیسم‌ها و مسیرهایی که در اثر این محرک‌ها فعال می‌گردد؛ سودمند خواهد بود و به یافتن روش‌هایی برای کاهش این محرک‌ها و غیر فعال نمودن این مسیرهای التهابی کمک خواهد نمود که در نهایت می‌تواند نتایج حاصل از پیوند جزایر پانکراس را بهبود بخشد.

واژگان کلیدی: پیوند جزایر پانکراس، MCP-1، Curcumin

۱- مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* **نشانی:** تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، کدپستی ۱۴۱۱۴؛ تلفن: ۳-۸۸۰۲۶۹۰۲؛ نمابر: ۸۸۰۲۹۳۹۹؛ پست الکترونیک: amolimm@tums.ac.ir

مقدمه

پیوند جزایر پانکراس به عنوان روشی مناسب در درمان بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ شناخته شده که در دستیابی به عدم وابستگی به انسولین، تنظیم قند خون و برقراری هموستاز طولانی مدت گلوکز روشی موفقیت آمیز ارزیابی شده است [۱]. هر چند موانعی نیز برای استفاده از این روش برشمرده شده از جمله شواهد قوی دال بر این مسئله وجود دارد که مقدار متناهی از بافت به سرعت توسط پروسه های التهابی پس از پیوند دستخوش تخریب و صدمه جدی می گردد و تنها درصد کمی از بافت پیوند شده از این تخریب در امان می ماند [۲].

مطالعاتی که در این زمینه صورت گرفته نشان دهنده آن است که حتی در موارد موفقیت آمیز بودن پیوند در فرد گیرنده کاهش قابل توجهی در عملکرد جزایر پیوند شده روی می دهد [۳].

تزریق جزایر پانکراس تخلیص شده از راه ورید پورت و تماس آنها با خون محیطی باعث فعال شدن پلاکت ها ، واکنش کوآگولاسیون و شروع واکنش های مربوط به آبشار کمپلمانی می گردد که این فرآیند

Instant blood mediated inflammatory IBMIR (response) نامیده می شود. در نتیجه آغاز این واکنش ها لکوسیت های خون در محل پیوند تجمع و به درون جزایر پانکراس نفوذ یافته و باعث تغییر در مورفولوژی جزایر و سپس از بین رفتن آنها می شوند [۴، ۵].

مطالعات *in vitro* و *in vivo* نشان می دهند که فعال شدن سایتوکین های پیش التهابی شامل $TNF-\alpha$ ، $IL-1\beta$ ، $IF-\gamma$ منجر به وقایع التهابی به هم پیوسته ای می گردند که از دست رفتن سریع پیوند را به دنبال دارد [۶]. سایتوکین ها و کموکین های مترشحه از خود جزایر پانکراس نقش مهمی در بروز این پروسه های التهابی ایفا می نمایند [۷] که منجر به وازنش پیوند به طور حاد و یا مزمن می گردند. مطالعه بر روی مدل های حیوانی پیوند جزایر پانکراس نشان داده که میزان سایتوکین ها و مدیاتورهای التهابی آزاد شده توسط جزایر پانکراس فرد دهنده با نتیجه پیوند آلوگرافت ارتباط مستقیم دارد [۸].

یکی از موانع اصلی صرف نظر از محدودیت منابع ، نیاز به استفاده از داروهای سرکوبگر ایمنی جهت جلوگیری از رد پیوند می باشد. هر دوی این مشکلات حاصل از تخریب و نقص در عملکرد بافت پیوندی در نتیجه واکنش های ایمنی علیه پیوند می باشند. بنابراین بلوک نمودن مدیاتورهای ایمنی آغاز کننده این واکنش های ایمنی با استفاده از روش های نوین در حل این مشکلات بسیار سودمند خواهد بود.

فاکتور هسته ای رونویسی Nuclear Factor (NF-kB) نقش کلیدی مهمی در بیان و تولید Kappa B سائتوکین های التهابی و کموکین ها از بافت های گوناگون ایفا می نماید. بنابراین این فاکتور به عنوان یکی از عوامل مهم در مطالعات فارماکولوژیک جهت یافتن شیوه های درمانی نوین در پروسه های گوناگون التهابی مورد توجه قرار گرفته لذا کنترل فعالیت NF - kB به عنوان استراتژی توانمندی جهت کاهش تخریب نسجی حاصل از فعالیت مدیاتورهای التهابی در نظر گرفته می شود [۹].

مسیر سیگنالی NF - kB در پاسخ به استرس های ناشی از جداسازی و تخلیص جزایر پانکراس فعال می گردد که ترشح و آزادسازی مدیاتورهای التهابی از جمله Machrophage Chemoattractant Protein-1 (MCP - 1) را به دنبال دارد. MCP - 1 آزاد شده از جزایر پانکراس نقش مهمی در فعال سازی مونوسیت ها، ماکروفاژها، لنفوسیت های T ، سلول های دندریتیک و سلول های Natural Killer Cells و تجمع این سلول ها در محل پیوند ایفا می نماید. مونوسیت های تجمع یافته در این محل تحت تأثیر MCP - 1 به ترشح کموکین های دیگری می پردازند که باعث تشدید پروسه وازنش پیوند می گردد [۱۰ و ۱۱].

در این مطالعه سعی بر این بوده تا اثر Curcumin که یک رنگدانه متعلق به گیاه *Curcuma longa linn* و دارای اثرات گوناگون ضد التهابی می باشد و همچنین اثر مهارى آن بر روی فعالیت NF - kB شناخته شده [۱۶-۱۲] بر تولید MCP-1 از جزایر پانکراس در شرایط *in vitro* مورد مطالعه قرار گیرد.

روش‌ها

استحصال و هضم آنزیمی پانکراس:

بعد از بیهوش نمودن موش‌های نر بالغ (n=۳۶)، شکم موش باز شده و مجرای اصلی پانکراس کانونه شده که با تزریق محلول Hank's Balance Salt (HBSS) Solution سرد به درون مجرای اصلی پانکراس تمام مجاری متسع گردیده و پانکراس از بافت‌های اطراف جدا گردید. پانکراس برداشت شده ۲-۳ مرتبه با محلول HBSS حاوی ۱۰۰ μ/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ μg/ml استرپتوماسین شستشو داده شد.

جهت هضم آنزیمی پانکراس جدا شده با محلول HBSS حاوی ۲ mg/ml کلاژناز P (Roche Diognosis, Mannheim, Germany) ، Hepes ۱۰ برای حدود ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ °C تحت انکوباسیون قرار گرفت که پس از صرف این مدت با افزودن HBSS سرد به هضم آنزیمی خاتمه داده شد.

خالص‌سازی، رنگ‌آمیزی و کشت جزایر پانکراس:

بافت پانکراس هضم شده با استفاده از صافی سیلندری شکل (6 cm diameter) استیل (0.5 mm mesh pore size) فیلتر شده و سپس با استفاده از دیتیزون آماده شده طبق پروتکل‌های قبلی [۱۷] رنگ‌آمیزی شد.

جزایر پانکراس سپس به ظروف مخصوص کشت سلولی منتقل شده و در RPMI 1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گوساله (Fetal Bovine Serum) (FBS) کشت داده شدند.

اضافه نمودن کورکومین و LPS بر محیط کشت:

کورکومین در DMSO حل شده سپس جزایر پانکراس کشت داده شده تحت تأثیر کورکومین با غلظت‌های مختلف 20، 10، 0 μ mol/L برای مدت ۱۸ ساعت قرار گرفتند. DMSO به محیط کشت جزایر پانکراس گروه کنترل به عنوان Vehicle کورکومین اضافه شد. بعد از اینکه جزایر پانکراس به مدت ۱۸ ساعت تحت تأثیر کورکومین بودند برای مدت ۲۴ ساعت دیگر تحت تأثیر ۱ μg/mL لیپولی ساکارید قرار گرفتند.

اندازه‌گیری سطح MCP-1 در محیط کشت جزایر

پانکراس:

محیط کشت جزایر پانکراس بعد از اضافه نمودن کورکومین و LPS برداشته شده و در دمای ۰C ۸۰- فریز شد. سطح MCP-1 در محیط کشت جزایر پانکراس با روش Elisa با استفاده از کیت mouse MCP-1 ELISA Bender Med Systems, Austria (kit) اندازه‌گیری شد. انجام آزمون Glucose challenge برای بررسی عملکرد جزایر پانکراس تخلص شده:

پس از دست چین نمودن، تعداد ۱۰ عدد از جزایر پانکراس را به پلیت ۹۶ خانه انتقال داده و سپس به آن محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۲ mM گلوکز اضافه شد. جزایر پانکراس در این محیط به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C و ۵٪ CO₂ قرار می‌گیرند. پس از انکوباسیون محیط کشت برداشت شده و مقدار ۲۰۰ μl از محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۲ mM گلوکز به آن اضافه گردید. پس از یک ساعت انکوباسیون در انکوباتور ۳۷ °C و ۵٪ CO₂، محیط کشت را به میکروتیوب‌هایی انتقال داده که "1st low Glc" نامیده می‌شوند. جزایر پانکراس را ۳ تا ۵ بار با RPMI 1640 حاوی ۱۶ mM گلوکز شستشو داده؛ سپس ۲۰۰ μl از همین محیط کشت را به آن اضافه نمودیم. پس از یک ساعت انکوباسیون در انکوباتور ۳۷ °C و ۵٪ CO₂، محیط کشت را میکروتیوب‌ها انتقال داده "High Glc" نامیده می‌شوند. جزایر پانکراس را ۳ تا ۵ بار شستشو داده و بار دیگر محیط کشت حاوی ۲ mM گلوکز اضافه گردید. پس از طی یک ساعت انکوباسیون در انکوباتور ۳۷ °C و ۵٪ CO₂، محیط کشت را به میکروتیوب‌ها انتقال داده و "2nd low Glc" (برای دومین تست گلوکز بالا) نامیده می‌شوند. میکروتیوب‌ها را تا زمان اندازه‌گیری مقادیر انسولین در فریزر ۰C ۸۰- نگهداری می‌شوند. برای اندازه‌گیری مقادیر انسولین از کیت ELIZA استفاده گردید. جهت محاسبه Insulin stimulation index از فرمول ذیل استفاده گردید.

$$SI = \frac{\text{High Glc}}{\text{1st low Glc} + \text{2nd low Glc}}$$

مقادیر MCP-1 مترشحه از جزایر پانکراس در محیط کشت تحت تاثیر غلظت های مختلف Curcumin در مقایسه با کنترل پس از ۱۸ ساعت:

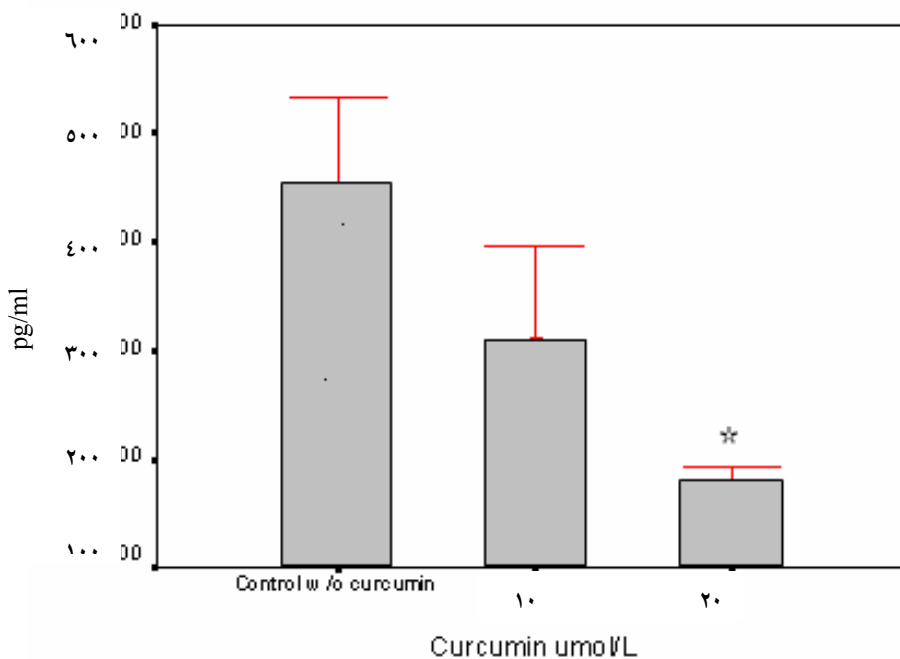
مقادیر MCP-1 مترشحه از جزایر پانکراس در محیط کشت جزایر پانکراس انکوبه شده با مقادیر 10 umol/L و 20 umol/L کورکومین با استفاده از تست ELISA اندازه گیری و با گروه کنترل مقایسه گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که Curcumin در هر دو غلظت 10 و 20 umol/L در محیط کشت باعث کاهش ترشح MCP-1 از جزایر پانکراس در مقایسه با گروه کنترل می گردد (نمودار ۱) و این کاهش در میزان ترشح MCP-1 برای غلظت 20 umol/L در مقایسه با گروه کنترل به حدمعنی داری می رسد ($P=0/005$).

سپس برای نمونه های تحت اثر Curcumin در غلظت های مختلف به طور جداگانه میانگین گرفته شد.

آنالیز آماری:

اطلاعات به صورت $\text{mean} \pm \text{standard deviation}$ نشان داده شده اند. آزمون آماری one-way ANOVA و Dunnett post hoc multiple comparison tests برای بررسی اختلاف بین گروه شاهد و گروه کنترل مورد استفاده قرار گرفت. تمام آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS v 11.5 انجام شد.

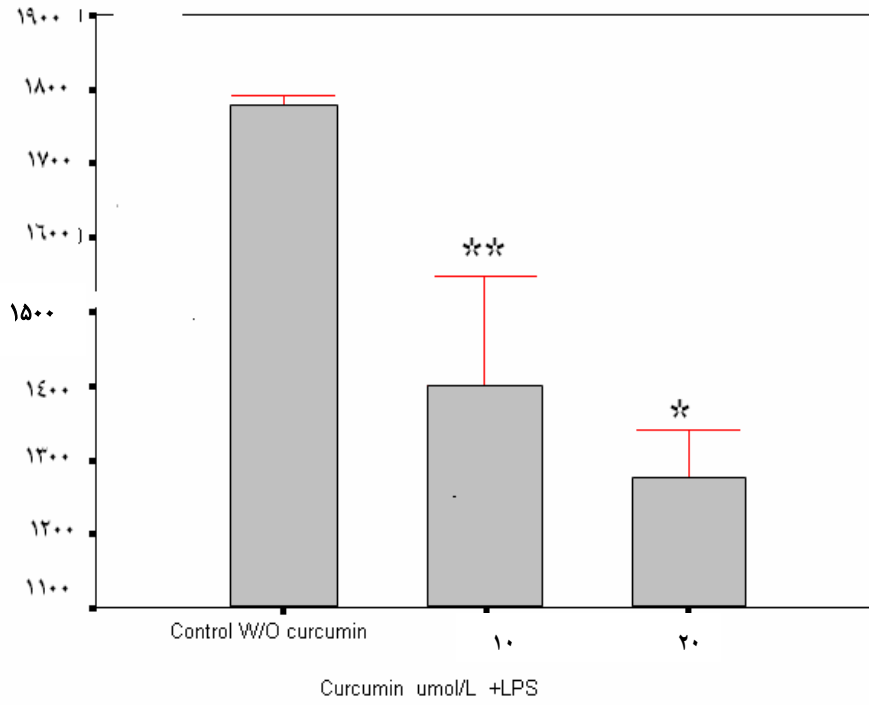
یافته ها



نمودار ۱- Curcumin 20 umol/L به طور معنی داری تولید MCP-1 در جزایر پانکراس ۳۶ سر

موش در مقایسه با گروه کنترل مهار می کند ($*P=0/005$).

Barchartها نمایانگر Mean±SD می باشند.

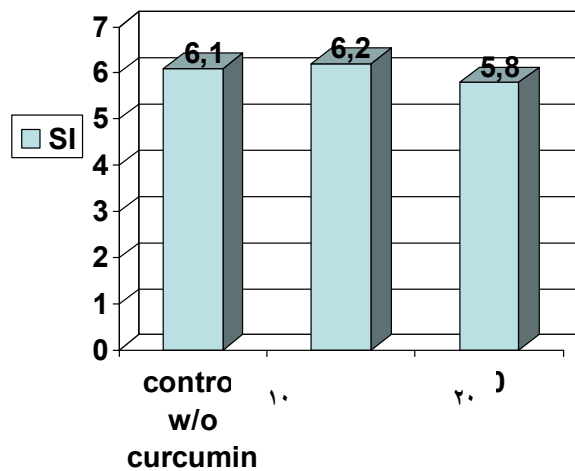


نمودار ۲: Curcumin به طور معنی داری مقدار MCP-1 ترشح شده در جزایر پانکراس ۳۶ سر

موش که با LPS القاء شده بودند؛ کاهش می دهد. برای ۲۰ umol/L and 10 umol/L Curcumin

به ترتیب * P = ۰/۰۱ و ** P = ۰/۰۲

Barchartها نمایانگر Mean±SD می باشند.



نمودار ۳- اثر غلظت ۱۰ و ۲۰ میکرومولار Curcumin بر SI جزایر پانکراس ۳۶ سر

موش

مقادیر MCP-1 در محیط کشت جزایر پانکراس تحت تاثیر غلظت های مختلف Curcumin ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون با LPS در مقایسه با کنترل:

جزایر پانکراس پس از ۱۸ ساعت که تحت تاثیر کورکومین قرار داشتند و همچنین گروه کنترل به مدت ۲۴ ساعت تحت انکوباسیون با LPS قرار گرفتند. مقادیر MCP-1 آزاد شده از جزایر پانکراس در دو گروه مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت (نمودار ۲). نتایج حاصل نشان داد که کورکومین با هر دو غلظت 10 و 20 umol/L به طور معنی داری مقدار MCP-1 مترشحه از جزایر پانکراس را پس از تحریک با LPS در مقایسه با گروه کنترل کاهش می دهد ($P = 0.01$ و $P = 0.02$). به ترتیب برای Curcumin 10 umol/L, 20 umol/L.

مقایسه SI حاصل از اندازه گیری مقادیر انسولین پس از انجام آزمون Glucose challenge:

پس از اندازه گیری مقادیر انسولین مترشحه از جزایر و محاسبه Stimulation index مربوط به نمونه هایی که تحت تاثیر غلظت های مختلف Curcumin قرار داشتند و همچنین گروه کنترل نشان داده شد که Curcumin تاثیر منفی بر عملکرد جزایر پانکراس نداشته (نمودار ۳).

بحث و نتیجه گیری

کموکین ها و یا سایتوکین های تولید و ترشح شده توسط خود جزایر پیوند شده عامل مهمی در وازنش پیوند جزایر پانکراس با واسطه سلولی و غیر سلولی در مراحل مختلف پس از پیوند به شمار می آیند. بسیاری از ژن ها با ظرفیت قوی پیش التهابی در جزایر جدا شده از پانکراس انسان بیان می شوند. به احتمال زیاد، بیان این ژن ها در سطح پروتئین در زمان پیوند مشکلات قابل ملاحظه ای در روند پیوند ایجاد می نماید. به نظر می رسد؛ کشت جزایر قبل از پیوند برای کاهش بیان این واسطه های قوی التهابی، سودمند باشد. در پیوند تجربی به طور مکرر اثبات شده است که جزایر کشت داده شده مزیت های مشخصی از لحاظ ایمنولوژیکی در مقایسه با جزایر تازه جدا شده دارند [۱۸].

MCP-1 متعلق به خانواده C-C از کموکین ها است؛ که به شکل فعال از لحاظ بیولوژیکی، توسط جزایر پانکراس و سلولهای بتای جزایر پانکراس انسان تولید می گردد [۱۸-۲۰]. MCP-1 در پاسخ به فعالیت لیپوپلی ساکارید (LPS)، LDL اکسید شده و سایتوکین هایی مثل $IL-1\beta$ ، $TNF-\alpha$ و $IFN-\gamma$ تولید می شود [۲۱]. سلولهای بتای جزایر پانکراس انسانی، MCP-1 را به طور پایدار، در غیاب عوامل التهابی نیز بیان می کنند. گزارش شده است بیماران مبتلا به دیابت نوع I پیوند شده با جزایر پانکراس انسان که مقادیر کم MCP-1 را ترشح می کنند؛ پس از پیوند دوره های طولانی عدم وابستگی به انسولین را نشان می دهند [۱۹ و ۲۰ و ۲۲]. Lee و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که مسیر MCP-1/CCR2 در طول وازنش جزایر آلوگرافت القاء می گردد [۲۲]. مطالعات مختلف، نشان داده که میزان رهاسازی MCP-1 در فرد دهنده، با نتیجه حاصل از پیوند آلوگرافت جزایر پانکراس در بیماران دیابت نوع ۱، ارتباط دارد؛ به این ترتیب که افزایش سطح MCP-1 آزاد شده از جزایر پانکراس فرد دهنده، منجر به قبول پیوند، به صورت ضعیف توسط فرد گیرنده می شود؛ که این امر به خصوص در عملکرد اولیه پیوند، تأثیر بسزایی داشته است [۲۰ و ۲۳]. آسیب ایجاد شده با سایتوکین های التهابی و دیگر عوامل ایمنی به عنوان یک مکانیسم مسئول ایجاد آپوپتوزیس و از دست رفتن عملکرد در طول دوره پیوند جزایر پانکراس پیشنهاد شده است. توسعه مداخله هایی که آپوپتوزیس و نکروز و آسیب به عملکرد سلول های بتا را کاهش می دهد؛ یا از آنها جلوگیری می کند؛ در جلوگیری از دست رفتن جزایر پانکراس که به عنوان یک مانع اصلی برای موفقیت پیوند جزایر پانکراس به شمار می رود مفید خواهد بود [۲۴]. بیان hMCP-1 در انواع مختلف سلول وجود دارد و با انواع وسیعی از محرک ها افزایش می یابد [۲۵].

Mozareti و همکاران کاهش معنی داری را در مقدار ترشح MCP-1 از جزایر پانکراس به دنبال کشت در محیط کشت CMRL و پس از اضافه کردن سیکلوسپورین به محیط کشت گزارش دادند. بررسی روش های متنوع برای

معنی داری مقدار ترشح MCP-1 که توسط LPS القا شده بود را در مقایسه با گروه کنترل کاهش دهد.

Curcumin ترکیبی دارویی است که از نظر بیولوژیکی بی خطر و استفاده آن در انسان حتی تا ۸ گرم در روز بلا مانع می باشد [۳۰ و ۳۱]. **Curcumin** یک diferuloylmethane استخراج شده از زرد چوبه است که تکثیر انواع وسیعی از سلول های توموری را مهار می کند [۳۰] نشان داده شده که **Curcumin** واکنش های بسیاری را که در آن NF-κB نقش اصلی دارد؛ مهار می نماید [۳۲]. **Curcumin** به طور قابل ملاحظه ای فعالیت NF-κB و AP-1 را با مهار متصل شدن آنها به DNA و مهار تجزیه پروتئین های IκB مهار می نماید و القاء بیان mRNA برای سایتوکین های IL-6 و TNF-α، کموکین KC و iNOS را در پانکراس مهار می نماید [۳۳].

به خاطر سمیت بسیار پایین **Curcumin** از لحاظ دارویی و توانایی آن در تنظیم فعالیت NF-κB توسط عوامل مختلف، **Curcumin** پتانسیل بسیار بالایی برای تعدیل بیان ژن های تنظیم کننده با NF-κB دارد [۳۲].

تحقیقات بر روی محرک هایی که باعث القاء تولید و ترشح فاکتور های التهابی از جزایر پانکراس می گردد و مکانیسم ها و مسیریابی که در اثر این محرک ها فعال می گردد؛ سودمند خواهد بود و به یافتن روش هایی برای کاهش این محرک ها و غیر فعال نمودن این مسیرهای التهابی کمک خواهد نمود که در نهایت می تواند نتایج حاصل از پیوند جزایر پانکراس را بهبود بخشد.

کاهش ترشح MCP-1 توسط جزایر پانکراس در شرایط آزمایشگاهی می تواند به بهبود نتیجه پیوند جزایر پانکراس کمک کند و احتمال وازنش را کاهش دهد [۲۶].

NF-κB بیان بسیاری از ژن های درگیر در پاسخ های ایمنی و التهابی را تنظیم می کند. نقش اساسی NF-κB به عنوان "کلید تنظیم کننده" شبکه ای از ژن های کنترل کننده فعالیت سایتوکین های التهابی در دست رفتن عملکرد و مرگ سلول های بتا مورد تاکید قرار گرفته است [۲۷]. در ناحیه پروموتور ژن MCP-1 جایگاه اتصال برای NF-κB وجود دارد (۲۸). مطالعه اثر فاکتورهای مختلف مهارکننده NF-κB در سلول های مختلف بر روی تولید و ترشح MCP-1 نشان داده که بسیاری از این فاکتورها، قادر به مهار تولید و ترشح MCP-1 می باشند. بیشتر مهارکننده های بیولوژیک و بیوشیمیایی NF-κB که در حال حاضر در دسترس می باشند؛ از طریق مسدود کردن مسیر سیگنال فعال کننده NF-κB یا از طریق رقابت با اتصال این مولکول به محل اتصال آن به DNA عمل می کنند [۲۹].

در این مطالعه، ما تاثیر **Curcumin** را بر روی ترشح MCP-1 از جزایر پانکراس موش در محیط کشت مورد ارزیابی قرار دادیم. اطلاعات بدست آمده نشان می دهد که **Curcumin** با غلظت ۲۰ μmol/L باعث کاهش مقدار ترشح MCP-1 از جزایر پانکراس طور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل می گردد. همچنین مشاهده شد که ۱۸ ساعت تیمار اولیه با **Curcumin** در هر دو غلظت ۱۰ و ۲۰ میکرومولار بر لیتر در محیط کشت قادر می باشد به طور

مآخذ

- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230-8.
- Johansson H, Lukinius A, Moberg L, et al. Tissue factor produced by the endocrine cells of the islets of Langerhans is associated with a negative outcome of clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005; 54: 1755-62.
- Ryan EA, Lakey JR, Shapiro AM. Clinical results after islet transplantation. *J Invest Med* 2001; 49: 559-62.
- Bennet W, Sundberg B, Groth CG, et al. Incompatibility between human blood and isolated islets of Langerhans: a finding with implications for clinical intraportal islet transplantation? *Diabetes* 1999; 48: 1907-14.
- Badet L, Titus T, Metzén E, et al. The interaction between primate blood and mouse islets induces accelerated clotting with islet destruction. *Xenotransplantation* 2002; 9: 91-6.

6. Contreras JL, Eckstein C, Smyth CA, et al. Activated protein C preserves functional islet mass after intraportal transplantation: a novel link between endothelial cell activation, thrombosis, inflammation, and islet cell death. *Diabetes* 2004; 53: 2804–14.
7. Ehrnfelt C, Kumagai- raeschM, UzunelM, Holgersson J. Adult porcine islets produce MCP-1 and recruit human monocytes in vitro. *Xenotransplantation* 2004; 11: 184–94.
8. Schroppe B, Zhang N, Chen P, Chen D, Bromberg JS, Murphy B. Role of donor-derived monocyte chemoattractant protein-1 in murine islet transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 444–51.
9. Baldwin AS Jr: The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14:649, 1996 4. Ehrnfelt C, Kumagai-Braesch M, Uzunel M, et al: Adult porcine islets produce MCP-1 and recruit human monocytes in vitro. *Xenotransplantation* 2004; 11: 184.
10. Johansson U, Olsson A, Gabrielsson S, et al: Inflammatory mediators expressed in human islets of Langerhans: implications for islet transplantation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 474.
11. Zhu YG, Chen XC, Chen ZZ, et al: Curcumin protects mitochondria from oxidative damage and attenuates apoptosis in cortical neurons. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25: 1606.
12. Jan TR, Yeh SF: Inhibitory effect of curcumin, an inflammatory agent, on vascular smooth muscle proliferation. *Eur J Pharmacol* 1992; 221: 381.
13. Huang MT, Smart RC, Wong CW, et al: Inhibitory effect of curcumin, hlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanyl-phorb-13-acetate. *Cancer Res* 1988; 48: 5941.
14. Rao CV, Riverson A, Simi B, et al: Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer Res* 1995; 55: 259.
15. Joe B, Lokesh BR: Role of capsaicin, curcumin and dietary n-3 fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in rat peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1994; 124: 255.
16. Pulla Reddy AC, Lokesh BR: Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. *Mol Cell Biochem* 1994; 37: 1.
17. Latif ZA, Noel J, Alejandro R: A simple method of staining fresh and cultured islets. *Transplantation* 1988; 45: 827.
18. Johansson U, Olsson A, Gabrielsson S, Nilsson B, Korsgren O. Inflammatory mediators expressed in human islets of Langerhans: implications for islet transplantation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 474-9.
19. Ehrnfelt C, Kumagai-Braesch M, Uzunel M, Holgersson J. Adult porcine islets produce MCP-1 and recruit human monocytes in vitro. *Xenotransplantation* 2004; 11: 184-94.
20. Amoli MM, Larijani B. Would blockage of cytokines improve the outcome of pancreatic islet transplantation? *Med Hypotheses*. 2006; 66: 816-9.
21. Kowalski J, Samojedny A, Paul M, Pietsz G, Wilczok T. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha genes in J774.2 macrophages. *Pharmacol Rep*. 2005; 57: 390-4.
22. Lee I, Wang L, Wells AD, Ye Q, Han R, Dorf ME, Kuziel WA, Rollins BJ, Chen L, Hancock WW. Blocking the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 chemokine pathway induces permanent survival of islet allografts through a programmed death-1 ligand-1-dependent mechanism. *J Immunol*. 2003; 171: 6929-35.
23. Schroppe B, Zhang N, Chen P, Chen D, Bromberg JS, Murphy B. Role of Donor-Derived Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Murine Islet Transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2004.
24. Choi SE, Choi KM, Yoon IH, et al, IL-6 protects pancreatic islet beta cells from pro-inflammatory cytokines-induced cell death and functional impairment in vitro and in vivo. *Transpl Immuno*. 2004; 13: 43-53.
25. Ueda A, Okuda K, Ohno S, Shirai A, Igarashi T, Matsunaga K, Fukushima J, Kawamoto S, Ishigatsubo Y, Okubo T. NF-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *J Immunol*. 1994 Sep 1; 153: 2052-63.
26. Marzorati S, Melzi R, Nano R, Antonioli B, Di Carlo V, Piemonti L, Bertuzzi F. In vitro modulation of monocyte chemoattractant protein-1 release in human pancreatic islets. *Transplant Proc*. 2004 ; 36: 607-8.
27. Cardozo AK, Heimberg H, Heremans Y, Leeman R, Kutlu B, Kruhoffer M, Orntoft T, Eizirik DL. A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*. 2001; 276: 48879-86.
28. Dorai T, Aggarwal BB. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett*. 2004; 215: 129-40.
29. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM, New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem*. 1999; 45: 7-17.

30. Bharti AC, Takada Y, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits receptor activator of NF-kappa B ligand-induced NF-kappa B activation in osteoclast precursors and suppresses osteoclastogenesis. *J Immunol.* 2004; 172: 5940-7.
31. Pendurthi UR, Williams JT, Rao LV. Inhibition of tissue factor gene activation in cultured endothelial cells by curcumin. Suppression of activation of transcription factors Egr-1, AP-1, and NF-kappa B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 3406-13.
32. Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) *J Biol Chem.* 1995; 270: 24995-5000.
33. Ali S, Mann DA. Signal transduction via the NF-kappaB pathway: a targeted treatment modality for infection, inflammation and repair. *Cell Biochem Funct.* 2004; 22: 67-79. Review.