

## بررسی اثر بیان ژن IL23 در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران دیابتی

سعید پیرمرادی<sup>۱</sup>، فرزانه عباسی<sup>۲\*</sup>، پروین امیری<sup>۲</sup>، روشنگر عباسی<sup>۲</sup>، اکرم عیدی<sup>۱</sup>، باقر لاریجانی<sup>۱</sup>، جواد توکلی‌بزاز<sup>۲</sup>، مهسا محمدآملی<sup>۲</sup>

### 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 مختلف دیابت در مقایسه با افراد گروه کنترل بود.

**روش‌ها:** بیماران مبتلا به T1DM 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 T2DM 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 T1DM (juvenile-onset) با سن کمتر از ۱۸ سال افزایش بیشتری پیدا کرده بود. افزایش محسوس و معنی‌دار بیان ژن IL23 در هر دو گروه بیماران T1DM (juvenile-onset) با سن بالای ۱۸ سال و بیماران T1DM (adult-onset) با سن پائین ۱۸ سال در مقایسه با گروه افراد کنترل و افراد بیمار گروه T2DM مشاهده شد. تفاوت محسوس و معنی‌داری در بیان ژن IL23 در بیماران مبتلا به T2DM و افراد سالم کنترل وجود داشت.

**نتیجه‌گیری:** مطالعه ما نشان دهنده up-regulation بیان IL23 در بیماران 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 زیر ۱۸ سال 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، اینترلوکین ۲۳

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات 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

## مقدمه

سایتوکاین‌های التهابی نقش مرکزی و مهمی در ایجاد بیماری‌های اتوایمن که دیابت نوع یک (T1DM) یکی از آنها می‌باشد دارند [۱]. IL23 اینترلوکین ۲۳ یکی از سایتوکاین‌های مهم بدن و عضوی از سایتوکاین‌های هتروداایمر IL12 می‌باشد که به نظر می‌رسد در ایجاد پاسخ‌های Th1 نقش دارد. IL23 از سلول‌های تولیدکننده اینترلوکین ۱۷ (IL17) که آنها را Th17 می‌نامند ترشح می‌شوند. این سایتوکاین‌ها در بسط و گسترش و پیدایش سلول‌های تولیدکننده IL17 نقش دارند [۲،۳]. IL23 در القاء بیش از ۱۶۰ ژن از جمله پروتئین‌های متصل‌شونده به DNA و نیز القاء برخی ژن‌های مرتبط با سیستم دفاعی میزبان و نیز نفوذ نوتروفیل‌ها به محل عفونت نقش ایفا می‌کند [۴،۵].

در انسان، پلی‌مورفیسم ژن IL12B که در به رمز در آوردن زیر واحد P40 از IL23 نقش دارد، به نظر می‌رسد که با علائم دیررس دیابت نوع یک در ارتباط می‌باشد [۶]. همچنین در محیط‌های *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 از طریق القا و تحریک سنتز NO باعث افزایش ارتشاح سلول‌های ایمنی در جزایر پانکراسی و تحریک موش‌های MLD-STZ به سمت دیابتی شدن می‌شود [۷،۴]. گروهی دیگر از محققین طی مطالعه‌ای دیگر ثابت کردند که IL23 نقش اساسی و ثابت شده‌ای در ایجاد التهابات در ارگان‌های خاص ایفا می‌کند [۸]. شواهد زیادی نیز وجود دارد که بیانگر این است که سلول‌های Th17 در پاتولوژی بسیاری از بیماری‌های اتوایمن نقش دارند. این سلول‌ها با ترشح یک سری فاکتورها در ایجاد دیابت نوع یک نقش دارند، بدین گونه که با خالص سازی مقدار زیادی از سلول‌های Th17 از موش‌های BDC25 و انتقال آن به موش‌های ترانس ژنیک، مشاهده شد که در این سری از موش‌ها مثل SCID, NOD عوارض دیابت ایجاد شد [۹، ۱۰]. IL23 به همراه IL6, STAT3 در ایجاد

التهابات به واسطه سلول‌های Th نقش دارند [۸]. STATS باعث القای فاکتورهای رونویسی IL17, ROR<sup>γ</sup> می‌شوند که کاهش این فاکتور، منجر به افزایش foxp3, T-bet که از فاکتورهای موثر در رونویسی مرتبط با ایجاد پاسخ‌های التهابی ایجاد شده به واسطه سلول‌های Th1 هستند، می‌شوند [۱۱].

از آنجایی که سازوکار موثر در پاتوژنز انواع مختلف دیابت مشخص نمی‌باشد بررسی بیان ژن IL23 می‌تواند به عنوان یک فاکتور تشخیصی در افراد مبتلا به T1DM با سن کمتر از ۱۸ سال 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 در سلول‌های تک هسته‌ای تحریک نشده محیطی (PBMCs) بیماران مبتلا به انواع مختلف دیابت در مقایسه با افراد گروه کنترل یا سالم می‌باشد.

## 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 سه‌گانه‌ای (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 کتون<sup>۲</sup> 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.

استفاده از نرم افزار SPSS بررسی و براساس significance  $P < 0/05$  تعیین شد ( $P < 0/05$ ).

### یافته‌ها

بیماران مبتلا به T<sub>1</sub>DM 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)  $1/6 \pm 1/4$  سال و در گروه adult onset  $1/9 \pm 1/7$  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 ژن IL23 در انواع گروه‌های بیماران با انواع دیابت در مقایسه با افراد گروه‌های کنترل**

کاهش مشخصی از بیان ژن IL23 در گروه بیماران دیابتی نوع یک T1DM در مقایسه با افراد گروه کنترل مشاهده شد ( $P=0/004$ ). هم چنین بیان ژن IL23 دارای کاهش مشخصی در گروه بیماران دیابتی نوع یک T1DM در مقایسه با افراد گروه بیماران دیابتی نوع دو T2DM بود ( $P=0/02$ ). اما قابل مقایسه با گروه کنترل نبود ( $P=0/1$ ). تفاوت بیان ژن IL23 در گروه بیماران دیابتی نوع یک early onset T1DM در مقایسه با گروه افراد دیابتی نوع دو T2DM late onset در گروه بیماران دیابتی نوع یک T1DM در مقایسه با افراد بیمار دیابتی نوع دو T2DM دارای درصد معناداری کمتری بود ( $P=0/05$ ). 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 یک juvenile onset T1DM مشاهده نکردیم ( $P=0/4$ ) (شکل ۲).

۱- از همه بیماران رضایت نامه کتبی تهیه شد. بعد از جمع‌آوری خون وریدی در محیط هیارین، جداسازی لئوسیت‌ها 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 IL23 و HPRT (House-keeping) به عنوان ژن کنترل بیان ژن IL23 بررسی گردید:

**Forward(HPRT)** 5'CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT3'  
**Revers(HPRT):** 5'AGACGTTTCAGTCTGTCCATAA3'  
**Forward(IL23)** 5'GGACAACAGTCAGTCTGTGCTT3'  
**Revers(IL23):** 5'CACAGGGCTATCAGGGAGC3'

### PCR کمی

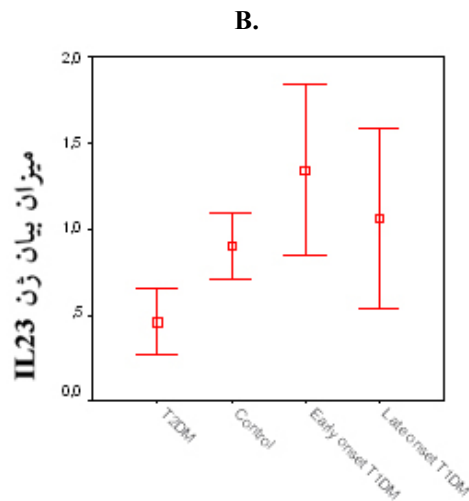
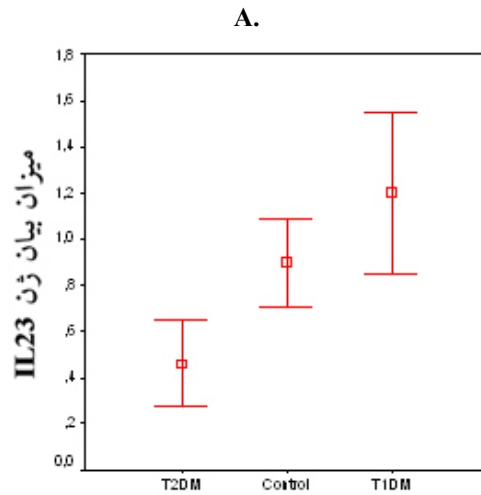
تمام واکنش‌های PCR کمی در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲۵۰ نانوگرم cDNA و ده میلی گرم Real time SYBR Green/Rox PCR Master (برطبق پروتکل پرایمرها و آب nuclease Free به حجم کل ۲۰ میکرولیتر انجام می‌گیرد. هر Replicate دوبار، در دستگاه ABI stepone quantitative PCR system با این تکنیک مورد بررسی قرار گرفت. دمایی متشکل از دمای ابتدایی برای فعال‌سازی آنزیم پلی‌مراز به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵°C بود. که به دنبال آن ۴۰ سیکل متشکل از ۵ ثانیه در دماهای ۹۵°C، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰°C بود سپس Melting curve جهت شناسایی و تعیین پیک مربوط به یک ژن خاص و هم چنین شناسایی تشکیل Primer dimers 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-test) T و با

جدول ۱- مشخصات کلی بیماران دیابتی و گروه کنترل مورد مطالعه

متغیرها	افراد دیابتی نوع ۱ زیر ۱۸ سال	افراد دیابتی نوع ۱ بالای ۱۸ سال	افراد دیابتی نوع ۲	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 <sup>2</sup>	-	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 ملاحظه‌ای از بیان ژن IL23 در بیماران مبتلا به دیابت نوع یک در مقایسه با بیماران مبتلا به دیابت نوع دو مشاهده شد ( $P=0/01$ ). بیان ژن IL23 در بیماران دیابتی نوع دو در مقایسه با گروه کنترل دارای تفاوت معنی‌دار کمتری بود ( $P=0/004$ ). بیان ژن IL23 در بیماران دیابتی نوع یک (early onset) T1DM در مقایسه با (late onset) T1DM دارای تفاوت معنی‌داری نبود.

شکل ۲- بیان ژن IL23 در خون تحریک نشده PBMCs بیماران دارای انواع دیابت

## بحث

concordance در مطالعاتی که بر روی 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 می کند. هرچند در کنار نرخ پائین در بیماران از نظر ژنتیکی هر دو نوع دیابت همبستگی با ژن های ناحیه HLA را نشان می دهد [۲] که این اشاره به اثر ناهنجاری های سیستم ایمنی در استعداد ابتلای افراد بالغ به T1DM را تأیید می کند. در این مطالعه اطلاعات قبلی در مورد نقش IL23 در بیماری زایی، در بیماران T1DM را اثبات می کند. بررسی پروفایل بیان سایتوکاین های ترشحی از Th17 در میزان استعداد ابتلای افراد به T1DM در سنین مختلف ضروری می نماید. همچنین بررسی همبستگی بیان IL23 و اتوآنتی بادی مرتبط با دیابت بیماران T1DM گروه adult onset, juvenile onset می تواند مفید باشد. IL23 و دیگر سایتوکاین ها که در مسیر Th17 نقش دارند می توانند در ارتباط با ظهور علائم بالینی بیماری دیابت مرتبط به سن باشد و همچنین می تواند به عنوان مارکرهای تشخیصی برای شناسایی انواع دیابت مدنظر قرار گیرند. هرچند مطالعات بیشتری برای تأیید اطلاعات مشاهده شده در مطالعه ما مورد نیاز می باشد.

## سپاسگزاری

نویسندگان از راهنمایی های ارزنده سرکارخانم مهسا محمدآملی تشکر و قدردانی می نمایند. این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

در این مطالعه مشاهده گردید که میزان بیان ژن IL23 به طور قابل 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 و کاملاً 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 می کند. مونوسیت های فعال شده التهابی نقش مهمی در بیماری زایی دیابت نوع یک بازی می کنند. مونوسیت های التهابی نیز در بیماری زایی دیابت نوع دو دخیل هستند [۱۲،۱۳]. اخیراً توجهات به سمت ایمونوترابی 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 ضد التهابی 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 سلول های Th17cd4+ اشاره دارد که از تمایز لنفوسیت های بکر، در نتیجه فرایندهای سیگنالینگ تولید شده به واسطه فاکتورهای IL23, IL6, IL21 ایجاد شده اند [۱۵]. لنفوسیت های تولید کننده IL17 مسئول بسیاری از بیماری های اتوایمن هستند [۱۶،۱۷] گزارشات قبلی اشاره به هتروژنی در ژنتیک ایمنی و ویژگی های متابولیک گروه های juvenile onset, adult onset در بیماران مبتلا به دیابت نوع یک دارد [۱۲،۲]. نرخ پایین

## 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-Grujicic, 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

- 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 3'UTR 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 Penã, 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, Ilendo E, Kos J, Kretowski A, Górka 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.