مجله دیابت و لیپید ایران. مهر- آبان ۱۳۹۰؛ دوره ۱۱ (شماره ۱) ۱۲۰-۱۱۵

مقایسه بیان ژن TGF-β در سلول‌های تحریک نشده PBMCs بیماران دیابتی و افراد سالم

سعید پیرمرادی[۱]، فرزانه عباسی*[۲]، مهسا محمدآملی[۲]

چکیده

مقدمه: اثرات محافظتی فاکتور رشد TGF-β در انواع مختلفی از بیماری‌های خودایمنی به خصوص بیماری‌هایی که در آنها اندام خاصی درگیر می‌شود مورد بررسی قرارگرفته که بیماری دیابت نوع ۱ از آن جمله است. TGF-β همچنین با تحریک تولید سایتوکاین‌هایی از Th17، به عنوان یک واسطه پیش التهابی مطرح است. هدف از انجام این مطالعه بررسی و مقایسه تفاوت در میزان بیان ژن TGF-β در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی تحریک نشده (PBMCS) بیماران مبتلا به انواع مختلف دیابت در مقایسه با گروه کنترل بود.

روش‌ها: بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ 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 تقسیم شدند. همچنین ۱۸ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ و بیست فرد سالم به عنوان کنترل در همان منطقه جغرافیایی انتخاب شدند. بیان ژن TGF-β 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 TGF-β در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ با سن کمتر از ۱۸سال کاهش بیشتری پیدا کرده بود. کاهش معنی‌دار بیان ژن TGF-β در هر دو گروه بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ با سن بالای ۱۸ سال و بیماران با سن پائیین ۱۸ سال در مقایسه با گروه افراد کنترل و افراد گروه مبتلا به دیابت نوع ۲ مشاهده شد. هیچ تفاوت معنی‌داری در بیان ژن TGF-β میان بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و افراد سالم کنترل وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه یافته‌های قبلی درباره تنظیم بیان ژن TGF-β در دیابت نوع یک را تقویت می‌کند، همچنین در این مطالعه هیچ تفاوت معنی‌داری بین افراد زیر۱۸سال دیابتی و افراد بالای ۱۸ سال دیابتی مشاهده نشد که این نشان می‌دهد سازوکار یکسانی می‌تواند در بیماری‌زایی هر دو نوع دخیل باشد. انجام مطالعات بیشتر در مورد انواع دیگری از سایتوکاین‌های ترشحی از Th17 برای تأیید یافته‌های بررسی کنونی ضروری است.

واژگان کلیدی: سایتوکین Th17، دیابت، بیان، فاکتور رشد بتا

۱- گروه زیست شناسی، واحد علوم وتحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

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

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

تاریخ دریافت:۸۹/۰۹/۱۳ **تاریخ درخواست اصلاح: ۸۹/۱۲/۱۹** **تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۲۶**

مقدمه

TGF-β یکی از سایتوکاین‌های چند عملکردی است که بر روی محدوده وسیعی از انواع سلول‌ها و در بسیاری از فرایندهای زیستی نظیر تنظیم ایمنی (از طریق افزایش مولکول‌های چسبندگی و تأمین شیب‌های کموتاکتیکی)، تعمیرات ضایعات بافتی (از راه تنظیم ECM، ماتریکس خارج سلولی و وارونه کردن) و تومورزایی اثر می‌کند [۱]. TGF- β توسط بخشی ژنی واقع بر روی بازوی بزرگ کروموزم ۱۹ (19q13) کد می‌شود [۲]. اثرات محافظتی TGF-β در انواع مختلفی از واکنش‌های ایمنی به خصوص در مواردی که بافت خاصی درگیر می‌شود به اثبات رسیده است که دیابت نوع ۱ (T_1DM) از آن جمله است. تزریق درون ماهیچه‌ای DNA پلاسمیدی که حاوی ژن کد کننده TGF-β است (pCMV-TG-β_1) آثار و شواهد این نوع دیابت را در موش‌های NOD تیمار شده با سیکلوفسفامید (CVP-Treated) و موش‌های تیمار نشده با این ماده کاهش می‌دهد [۳]. نقش محافظتی مشابهی برای TGF-β علیه دیابت با توجه به بیان TGF-β در سلول‌های جزایری موش‌های NOD مشاهده شده است [۴،۵] و یا در نتیجه تزریق سلول‌های T تولیدکننده TGF-β اثر مشابهی مشاهده گردید [۶]. غیر فعال‌سازی TGF-β توسط ترکیبات ضد TGF-β، ابتلا به دیابت را تسریع می‌کند [۷،۸]. بیان ژن TGF-β در سلول‌های T رگولاتوری (Treg cells) و در خون محیطی کودکان مبتلا به دیابت نوع ۱ مشاهده شده است. کاهش میزان بیان ژن TGF-β در مطالعات گذشته در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCS) کودکان مبتلا به دیابت نوع ۱ گزارش شده است [۹،۱۰]. TGF-β به عنوان یک واسطه پیش التهابی از طریق تحریک تمایز سلول‌های Th17 و Th9 عمل می‌کند [۸] که این سلول‌ها با فراخوانی شیمیایی لکوسیت‌ها، باعث این پاسخ‌های التهابی می‌شوند اما به هر حال در فاز انتهایی پاسخ ایمنی، TGF-β مسیرهای التهابی را سرکوب می‌کند [۱۱]. به نظر می‌رسد اثر TGF-β بر روی لنفوسیت‌های memory CD8+ T cells برخورد نکرده در مقایسه با memory CD8+ T cells برخورد کرده به آنتی‌ژن متفاوت باشد که این اثر، وابسته به وضعیت تمایز و فعال‌سازی آنهاست و اشاره به نقش دوگانه TGF-β در خودایمنی دارد [۱۲]. مطالعات اخیر که اشاره به تغییرات وابسته به سن در علت‌شناسی بیماری T_1DM دارد، احتمال درگیری سازوکارهای متفاوتی را در القا و پیشرفت بیماری مدّ نظرقرار می‌دهد [۱۳]. بیان ژن TGF-β می‌تواند به عنوان یک عامل افتراق بین افراد مبتلا به دیابت نوع ۱ با سن کمتر از۱۸ سال و افراد دیابتی بالاتر از ۱۸سال و افراد سالم کنترل و افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ مطرح باشد. هدف این تحقیق مقایسه تفاوت در میزان بیان ژن TGF-β در سلول‌های تک هسته‌ای تحریک نشده خون محیطی (PBMCS) بیماران مبتلا به انواع مختلف دیابت در مقایسه با افراد سالم است.

روش‌ها

در شروع بررسی از بیماران دیابتی مراجعه کننده به کلینیک دیابت بیمارستان شریعتی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت شرکت در مطالعه دعوت به همکاری شد. جمعیت مورد مطالعه شامل بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ با سن زیر ۱۸ سال (N= ۲۰) و بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ بالای ۱۸ سال (N= ۲۰) و بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ (N= ۲۰) و یک گروه کنترل سالم (N=۲۰) بودند. بیماران دیابتی براساس معیارهای تشخیصی انجمن دیابت آمریکا (ADA) انتخاب شدند، سپس بیمارانی که حداقل دارای یکی از معیارهای سه گانه‌ای (ADA) بودند و پس از بررسی معیارهای خروج از مطالعه که شامل ابتلا به دیگر بیمای‌ها که سبب درگیری اعصاب وعروق می‌شود مانند ادم محیطی، نارسایی کلیه، سرطان، مصرف داروهایی که بر علائم عروقی یا عصبی موثرند مثل داروهای ضد تشنج وآنتی اریتمی، وجود زخم در پا، سابقه مصرف تنباکو، سابقه اعتیاد به مواد مخدر و الکل، افزایش خون‌ریزی، سابقه بیماری‌های قلبی، مصرف داروهای متسع کننده عروق، 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 (Ketonemia) در خون را به همراه داشت و درمان توسط انسولین در اولین سال تشخیص بیماری شروع و ادامه یافته بود به عنوان دیابت

نوع ۱ در نظر گرفته شد. در بیشتر بیمارانی که در این مطالعه به عنوان دیابت نوع ۱ تشخیص داده شده‌اند، DKA اولین عارضه و شروع درمان با انسولین در زمان تشخیص بیماری اتفاق افتاده بود. همچنین افراد سالم نیز از مراجعه کنندگان به بیمارستان شریعتی انتخاب شدند.

۱- قبل از شروع بررسی از همه بیماران رضایت‌نامه کتبی اخذ گردید و 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 (بر طبق پروتکل کیت، Roche Applied Science)، سپس با روش Real time PCR با استفاده از پرایمرهای ذیل برای ژن TGF-βو HPRT (House-keeping) به عنوان ژن کنترل بیان ژن TGF-β بررسی گردید:

Forward (HPRT):5′CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT3′
Revers (HPRT):5′AGACGTTCAGTCCTGTCCATAA3′
Forward (TGF- β):5′CGACTACTACGCCAAGGA3′
Revers (TGF-β):5′GAGAGCAACACGGGTTCA3′

تمام واکنش‌های PCR کمی درحجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲۵۰ نانوگرم cDNA و ده میلی‌گرم Real time SYBR Green/Rox PCR Master و جفت پرایمرها و آب nuclease Free به حجم کل ۲۰ میکرولیتر انجام می‌گیرد. هر Replicate دو بار در دستگاه ABI stepone quantitative PCR system با این تکنیک مورد بررسی قرار گرفت. دمای ابتدایی برای فعال‌سازی آنزیم پلی‌مراز به مدت ۱۰ دقیقه دمای ۳۵°C بود که به دنبال آن ۴۰ سیکل متشکل از ۵ ثانیه در دماهای ۹۵°C، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۷°C انجام شد، سپس Melting curve جهت شناسایی و تعیین پیک مربوط به یک ژن خاص و همچنین شناسایی تشکیل Primer dimrers شکل گرفت. داده‌های حاصل از بیان ژن HPRT به عنوان ژن مرجع، نرمال‌سازی شد. سپس تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از روش $۲^{-\Delta\Delta ct}$ انجام شد. معنی‌داری و اختلاف بین دو گروه کنترل و مطالعه با استفاده از آزمون T و با استفاده از نرم‌افزار SPSS بررسی و تعیین شد (P<۰/۰۵).

یافته‌ها

بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ 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 اول ۱/۴±۱/۶ سال و در گروه دوم ۱/۹±۱/۷ سال بود. ویژگی‌های بیماران در جدول ۱ ارائه شده است. میزان تغییرات بیان ژن به صورت Fold change در گروه‌های مختلف در نمودار ۱ مشخص شده است. کاهش محسوس و معنی‌داری در میزان بیان ژن TGF-β در هر دو گروه جوانان دیابتی زیر ۱۸ سال [(۰/۷-۳/۰۶) ٪۹۵ CI، P=۰/۰۰۲ ۰/۲۶ fold change] و گروه جوانان دیابتی بالغ بالای ۱۸ سال [(۱/۲-۳/۸) ٪۹۵ CI، P<۰/۰۰۱ ۰/۱۷ fold change] در مقایسه با افراد گروه کنترل مشاهده شد. بیان ژن TGF-β در بیماران بالای ۱۸ سال کمتر از بیماران زیر ۱۸ سال بود اما این مقدار به میزان قابل توجهی نرسید (P=۰/۲). میزان بیان ژن TGF-β به طور قابل توجهی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ در مقایسه با بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ کاهش یافت [(۱/۲-۳/۰۳) ٪۹۵ CI، P<۰/۰۰۱، ۰/۱۴- fold change]. هیچ تفاوت محسوسی در بیان ژن TGF-β در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و افراد گروه کنترل وجود نداشت.

جدول ۱- ویژگی‌های کلی بیماران دیابتی و افراد گروه کنترل

متغیر	گروه کنترل (تعداد=۲۰)	گروه دیابتی نوع ۲ (تعداد=۲۰)	گروه دیابتی بالغ بالای۱۸ سال، (تعداد=۲۰)	گروه دیابتی نوع ۱ جوان زیر ۱۸ سال، (تعداد=۲۰)
سن(سال)	۱۲±۵۵	۹±۵۸	۴±۲۴	۲±۱۱
نوع جنسیت: مرد/زن	۶/۱۴	۱۲/۶	۱۵/۵	۱۲/۱۱
نمایه توده بدنی (kg/m^2)	۲/۶±۲۷/۱	۳/۲±۲۷/۷	۲/۷±۲۱/۳	-
نیاز روزانه به تزریق انسولین	-	-	۴۹/۵±۱۹	۳۱/۱±۲۰/۴

جدول ۲- آنالیز کمی Real time بیان ژن TGF-β در بیماران دارای انواع دیابت

نوع دیابت	سطح معناداری	میزان بیان (CI ۹۵٪)
گروه دیابتی نوع ۱ جوان زیر۱۸سال درمقایسه با گروه کنترل*	۰/۰۰۲	۰/۲۶ (۰/۷-۳/۰۶)
گروه دیابتی نوع ۱ بالغ بالای ۱۸سال درمقایسه با گروه کنترل	۰/۰۰۱	۰/۱۷ (۱/۲-۳/۸)
گروه دیابتی نوع ۲ در مقایسه با گروه کنترل	۰/۸	۱/۰۶ (-۱/۸-۱/۳)

* آزمون t به دست آمده درسطح ۰/۰۵ معنی دار است

نمودار ۱- میزان بیان ژن TGF-β در گروه‌های مختلف بیماران دیابتی

بحث

در این مطالعه مشاهده گردید که میزان بیان ژن TGF-β به طور قابل توجهی در سلول‌های تک هسته‌ای تحریک نشده خون محیطی تازه (PBMCS) در هر دو گروه بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ زیر ۱۸ سال و بالای ۱۸ سال در مقایسه با بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و افراد سالم کمتر است. میزان کاهش یافته بیان ژن TGF-β در افراد گروه بالای ۱۸ سال بیشتر آشکار بود. مونوسیت‌های فعال شده نقش مهمی در بیماری‌زایی دیابت نوع ۱ بازی می‌کنند. مونوسیت‌های التهابی نیز در بیماری‌زایی دیابت نوع ۲ دخیل هستند[۱۴،۱۵]. اخیراً توجهات به سمت ایمونوتراپی دیابت نوع ۱ و سرکوب واکنش‌های ایمنی با هدف قرار دادن سلول‌های T خود فعال شده و سلول‌های T (تنظیمی (Treg cells) جلب شده است. بیان چندین سایتوکاین پیش التهابی و ضد التهابی از جمله TGF-β در Tregs بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ مشاهده شده است [۹]. عدم تعادل بیان بین Th1/Th2 در پاسخ ایمنی به عنوان سازوکاری در گسترش اختلالات خود ایمنی شناخته شده است اما شواهد اخیر به دخالت سلول‌های +Th17 CD4 اشاره دارد که از تمایز لنفوسیت‌های بکر در نتیجه سیگنال‌های تولید شده از ترکیب TGF-β و IL6 و IL21 و IL-1 beta و IL23 ایجاد شده‌اند [۱۶]. لنفوسیت‌های تولید کننده IL17 مسؤول بسیاری از پاسخ‌های التهابی و خودایمنی هستند [۱۷]. گزارشات قبلی به هتروژنی در ژنتیک ایمنی و ویژگی‌های متابولیک گروه‌های جوانان زیر ۱۸ سال و بالای ۱۸ سال در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ اشاره دارد [۱۳،۱۴]. مطالعات اخیر الگوی متفاوتی از بیان ژن‌های التهابی در مونوسیت‌های خون محیطی بیماران مبتلا به دیابت بالینی که وابسته به تظاهرات بالینی وهمچنین سن تشخیص بیماری می باشد نشان داده‌اند[۱۴]. نرخ پایین هماهنگی در مطالعاتی که برروی دوقلوها انجام شده برای بیماران دیابتی بالای ۱۸ سال اشاره به اثر ناچیز عوامل خطرزای ژنتیکی در استعداد ابتلای افراد به شروع دیابت بعد از ۱۸ سالگی و دیابت خود ایمنی بالقوه بزرگسالان [latent autoimmune diabetes of adults (LADA)] دارد که بیشتر به صورت بدون نیاز به انسولین (nonInsulin reguiring diabeteg)

تظاهرمی یابد. در کنار نرخ پایین هماهنگی در دوقلوها، از نظر ژنتیکی هر دو نوع دیابت هم بستگی با ژن‌های HLA را نشان می‌دهند [۱۳]، که اثر ناهنجاری‌های سیستم ایمنی در استعداد ابتلای افراد بالغ به دیابت نوع ۱ را تایید می‌کند. یافته‌های مطالعه کنونی با یافته های مطالعات قبلی درمورد نقشTGF-β در بیماری زایی، در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ همخوانی دارد. همچنین کاهش محسوسی در میزان بیان ژنTGF-β در گروه افراد دیابتی بالای ۱۸ سال مشاهده شده است. بررسی پروفایل بیان سایتوکاین‌های ترشحی از Th17 بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ در سنین مختلف شروع بیماری به منظور فهم نقش دقیق مسیرهای Th17 در میزان استعداد ابتلای افراد به دیابت نوع ۱ در سنین مختلف را ضروری می‌نماید. همچنین بررسی همبستگی بین بیان TGF-β و اتوآنتی بادی‌های مرتبط با دیابت در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ گروه بالای ۱۸ سال و زیر ۱۸ سال و بیماران مبتلا به LADA می‌تواند مفید باشد. TGF-β و دیگر سایتوکاین‌ها که در مسیر Th17 تولید می‌شوند می‌توانند با ظهور علائم بالینی بیماری دیابت مرتبط به سن در ارتباط باشند و همچنین می‌توانند به عنوان مارکرهای تشخیصی برای شناسایی انواع مختلف دیابت مدنظر قرار گیرند. لازم به ذکر است ضروری است مطالعات بیشتری برای تأیید اطلاعات مشاهده شده در مطالعه حاضر انجام شود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از راهنمایی‌های ارزنده سرکارخانم مهسا محمدآملی تشکر و قدردانی می‌نمایند. این مطالعه با حمایت مالی پژوهشکده علوم غدد 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- Fujii D, Brissenden JE, Derynck R, Francke U. Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7. *Somat Cell Mol Genet* 1986; 12:281-8.
3- Piccirillo CA, Chang Y, Prud'homme GJ. TGF-beta1 somatic gene therapy prevents autoimmune disease in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 1998; 161:3950-6.
4- King C, Davies J, Mueller R, Lee MS, Krahl T, Yeung B, O'Connor E, Sarvetnick N. TGF-beta1 alters APC preference, polarizing islet antigen responses toward a Th2 phenotype. *Immunity* 1998; 8:601-13.
5- Moritani M, Yoshimoto K, Wong SF, Tanaka C, Yamaoka T, Sano T, Komagata Y, Miyazaki J, Kikutani H, Itakura M. Abrogation of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice and protection against effector lymphocytes by transgenic paracrine TGF-beta1. *J Clin Invest* 1998; 102:499-506.
6- Han HS, Jun HS, Utsugi T, Yoon JW. A new type of CD4+ suppressor T cell completely prevents spontaneous autoimmune diabetes and recurrent diabetes in syngeneic islet-transplanted NOD mice. *J Autoimmun* 1996; 9: 331-9.
7- You, S, Alyanakian, M, Segovia, B, Damotte, D, Bluestone, J, Bach, J, and Chatenoud, L. (2008) Immunoregulatory pathways controlling progression of autoimmunity in NOD mice. *Ann N Y Acad Sci* 1150, 300–10.
8- Mantel PY, Schmidt-Weber CB. Transforming growth factor-beta: recent advances on its role in immune tolerance. *Methods Mol Biol* 2011; 677:303-38.
9- 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; 48(1):93-100.
10- Halminen M, Simell O, Knip M, Ilonen J. Cytokine expression in unstimulated PBMC of children with type 1 diabetes and subjects positive for diabetes-associated autoantibodies. *Scand J Immunol* 2001; 53(5):510-3.
11- Wahl SM. Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly. *J Exp Med* 1994; 180:1587-90.
12- Filippi CM, Juedes AE, Oldham JE, Ling E, Togher L, Peng Y, Flavell RA, von Herrath MG. Transforming growth factor-beta suppresses the activation of CD8+ T-cells when naive but promotes their survival and function once antigen experienced: a two-faced impact on autoimmunity. *Diabetes* 2008; 57(10):2684-92.
13- Leslie RD, Delli Castelli M.Age-dependent influences on the origins of autoimmune diabetes: evidence and implications *Diabetes* 2004; 53(12):3033-40.

14- 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(10):2768-73.
15- Pickup JC. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27(3):813-23.
16- Costa VS, Mattana TC, da Silva ME. Unregulated IL-23/IL-17 immune response in autoimmune diseases. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010; 88(3):222-6.
17- Kunz M, Ibrahim SM. Cytokines and cytokine profiles in human autoimmune diseases and animal models of autoimmunity. *Mediators Inflamm* 2009; 97:92-98.