

## سازوکار اثر تجویز گابا (GABA) در پیشگیری از اختلال عملکرد پانکراس به دنبال القای دیابت در موش نژاد CD1

نبتون سلطانی\*<sup>۱</sup>، منصور کشاورز<sup>۲</sup>، چینوا ونگ<sup>۳</sup>

### چکیده

**مقدمه:** در دیابت نوع ۱، لنفوسیت‌های T و سایر عوامل التهابی به داخل جزایر رسوخ کرده و سبب تخریب سلول‌های بتا می‌شوند. سلول‌های T رگولاتور<sup>+</sup> CD25/CD4، برای کنترل اتوایمیونیتی در دیابت نوع یک مفید هستند. برای تولید و فعال سازی این سلول‌ها، وجود FOXP3<sup>+</sup> لازم، اما ارتباط (Nrp1<sup>+</sup>) Notrophline1 با این سلول‌ها ناشناخته است. پرسش این مطالعه آنست که آیا تجویز گابا می‌تواند از القای دیابت به وسیله استرپتوزوتوسین (STZ) جلوگیری نماید و در صورت مثبت بودن پاسخ آیا سازوکار اثر آن از طریق سلول‌های CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> میانجی‌گری می‌شود و آیا واسطه عمل این سلول‌ها FOXP3<sup>+</sup> است و یا NRP1<sup>+</sup> در این رابطه دخیل می‌باشد؟

**روش‌ها:** در این مطالعه از ۲۰ عدد موش نژاد CD1 استفاده شد حیوانات به دو گروه تقسیم شدند. یک گروه روزانه ۲۰۰ μmol گابا که در Phosphate buffer solution (PBS) حل شده بود به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت نمودند و گروه دیگر از محلول PBS دریافت کردند پس از یک هفته تمامی حیوانات ۴۰ mg/kg STZ به صورت داخل صفاقی به مدت پنج روز متوالی دریافت نمودند و تا دو ماه حیوانات تحت کنترل قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** میزان قند خون و نسبت گلوکاگن به انسولین در گروه دریافت کننده گابا نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان داد، در حالی که نسبت انسولین به گلوکاگن افزایش معنی داری داشت. همچنین مورفولوژی سلول‌های بتا در گروه دریافت کننده گابا بیشتر به وضعیت طبیعی نزدیک بود. بیان FOXP3<sup>+</sup> در سلول‌های CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> و همچنین تعداد این سلول‌ها در دو گروه تفاوتی نشان نداد در حالی که بیان FOXP3<sup>+</sup> و NRP1<sup>+</sup> در سلول‌های CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> و همچنین تعداد سلول‌های حاوی Nrp1<sup>+</sup> در گروه دریافت کننده گابا افزایش معنی داری نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** گابا از القای دیابت به وسیله STZ جلوگیری کرده و سازوکار این اثر از طریق افزایش بیان FOXP3<sup>+</sup> در سلول‌های CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> میانجی‌گری نمی‌شود، بلکه این سازوکار از طریق افزایش بیان FOXP3<sup>+</sup> و Nrp1<sup>+</sup> در سلول‌های CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> و همین‌طور افزایش این سلول‌ها صورت می‌گیرد.

**واژگان کلیدی:** FOXP3<sup>+</sup>, Nrp1<sup>+</sup>, سلول‌های CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>، دیابت، گابا

۱- گروه فیزیولوژی و مرکز تحقیقات پیش‌گیری از عوامل خطر آفرین قلبی و عروقی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان

۲- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- گروه غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه تورنتو، کانادا

\* **نشانی:** بندر عباس، خ جمهوری اسلامی، بیمارستان شهید محمدی، معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه، تلفن: ۰۷۶۱-۳۳۳۶۸۹، نمابر: ۰۷۶۱-۳۳۳۰۶۱۲، پست الکترونیک: neptun.soltani@gmail.com

## مقدمه

مطالعات نشان داده اند که غلظت گابا و تعداد سلول‌های ترشح کننده آن در بافت پانکراس انسان و مدل‌های تجربی دیابت کاهش پیدا می‌کند [۱]. برخی از مطالعات حضور گیرنده‌های گابا نوع A را بر روی لنفوسیت‌های T نشان داده‌اند و علاوه بر این نشان داده‌اند که تجویز گابا می‌تواند با تاثیر بر این گیرنده‌ها، واکنش‌های التهابی که منجر به تخریب سلول‌های بتا می‌شوند را متوقف نماید [۲]. در دیابت نوع ۱ که یک بیماری اتوایمیون است، بدن بر علیه سلول‌های بتای پانکراس آنتی بادی می‌سازد. لنفوسیت‌های نوع T و سایر فاکتورهای التهابی به داخل جزایر رسوخ پیدا می‌کنند و سبب تخریب سلول‌های بتا و کاهش ترشح انسولین می‌شوند [۳]. ما در مطالعه قبلی [۴] نشان دادیم که تجویز داخل صفاقی گابا قادر است از ایجاد دیابت نوع ۱ پیشگیری نماید ولی سازوکار آن ناشناخته است.

یکی از انواع سلول‌های T رگولاتور، سلول‌های  $CD4^+/CD25^+$  هستند که در تیموس بالغ می‌شوند و در کنترل اتوایمیونیتی دیابت نوع ۱ موثر هستند [۵]. برای تولید و فعال سازی این سلول‌ها، وجود  $FOXP3^+$  لازم است که در مقیاس زیاد در سلول‌های T رگولاتور از نوع  $CD4^+/CD25^+$  تولید می‌شود [۶] و باعث تجمع لنفوسیت‌های پرولیفرة شده و همچنین باعث گسترش فیلتراسیون التهابی از بافت‌ها به سمت خارج می‌شود [۷]. از سوی دیگر مطالعات نشان داده اند که  $Nrp1^+$  که یک گلیکوپروتئین است که برای اولین بار در سطح اکسون‌ها شناسایی شد و در توسعه سیستم عصبی نقش دارد [۶]، می‌تواند به عنوان یک پروتئین در بیان  $FOXP3^+$  نیز نقش داشته باشد [۸].

همچنین به عنوان یک نشانگر غشایی برای شناسایی سلول‌های  $CD4^+/CD25^+$  نیز مطرح است [۸]. اما با این وجود ارتباط  $Nrp1$  با سلول‌های  $CD4^+/CD25^+$  کاملاً شناخته نشده است. با توجه به این که گابا یک واسطه عصبی مهارى است و اثرات مهارى آن در بافت پانکراس نیز نشان داده شده است [۹]، این مطالعه قصد دارد نشان دهد آیا تجویز گابا می‌تواند از القای دیابت به وسیله STZ جلوگیری نماید و در صورت مثبت بودن پاسخ آیا سازوکار اثر آن از طریق سلول‌های  $CD4^+/CD25^+$  میانجی‌گری می‌شود و آیا واسطه

عمل این سلول‌ها  $FOXP3^+$  است و یا  $NRP1^+$  در این رابطه دخیل می‌باشد.

## روش‌ها

### حیوانات

در این مطالعه از ۲۰ عدد موش نر نژاد CD1 با سن هفت هفته استفاده شد که از Charles River Laboratories تهیه شده بودند. حیوانات در شرایط دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و چرخه نوری ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. این مطالعه بر اساس معاهده Canadian Council of Animal Care صورت گرفت.

### القای دیابت

قبل از القای دیابت به کمک گلوکومتر (Ascensia ELITE XL metr) و استریپ (Ascensia ELIT)، قند خون غیر ناشتای حیوانات از طریق ورید دمی اندازه‌گیری شد و حیوانات بر اساس وزن و قندخون به دو گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. یک گروه از حیوانات روزانه  $200 \mu\text{mol}$  گابا که در PBS حل شده بود به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند و گروه دیگر به عنوان گروه کنترل تحت تزریق حلال قرار گرفتند. یک هفته بعد تمامی حیوانات با تجویز داخل صفاقی  $40 \text{ mg/kg}$  STZ به مدت پنج روز متوالی دیابتی شدند [۱۰]. پس از القای دیابت، هر سه روز یک بار قند خون و وزن حیوانات کنترل گردید. وزن حیوانات قبل از تزریق گابا و STZ در گروه دریافت کننده گابا و کنترل به ترتیب عبارت بود از  $38/1 \pm 0/4$  و  $38/2 \pm 0/9$  گرم و دو ماه پس از مطالعه، وزن حیوانات در دو گروه دریافت کننده گابا و کنترل به ترتیب عبارت بود از  $43 \pm 0/4$  و  $39/8 \pm 0/5$  گرم.

### بررسی‌های به فلوسیتومتری و پرولیفراسیون

#### لنفوسیت‌های T

در این روش پس از کشتن حیوانات، طحال ایزوله و خارج گردید و هموژنیزه شد و پس از تهیه سوسپانسیون گلوبول‌های قرمز با استفاده از محلول AKT لیز شده، باقیمانده سلول‌ها برای فلوسیتومتری و پرولیفراسیون لنفوسیت‌های T استفاده شد که کلیه مراحل کار به طور خلاصه به شرح زیر می‌باشد.

افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از Acidic isopropanol به هر خانه متوقف شد. اپتیمال دانسیته ۴۵۰ برای محاسبه نمایه Suppression که مطابق فرمول زیر محاسبه شده است استفاده گردید.  $Suppression\ Index = [1 - (T\ effector / (T\ effector + T\ regulatory))] * 100$

۳- تهیه سلول‌های Responder: یک موش نرمال (غیر دیابتی و بدون تجویز گابا) انتخاب و طحال آن ایزوله گردید و مطابق بالا و با استفاده از T cell enrichment column (R&D) لئوسیت‌های نوع T از سوپانسیون ایزوله شدند. پس از شمارش سلول‌ها، این سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه که با مخلوط آنتی CD3 و آنتی CD28 پوشش داده شده بودند، کشت داده شدند و یک سری از خانه‌ها بدون پوشش با آنتی بادی در نظر گرفته شدند. تعداد سلول‌ها در هر خانه  $1 \times 10^5$  بود.

#### روش اندازه‌گیری انسولین و گلوکاگن

دو ماه پس از تجویز گابا و PBS ۲۰۰، کلیه حیوانات با تزریق داخل صفاقی ۵۰ mg/kg کتامین بیهوش شده و سپس از قلب حیوانات به میزان یک میلی لیتر خون گرفته شد. به ازای هر ۲۰۰ میکرولیتر خون، ۲ میکرولیتر مهار کننده پروتئاز به خون اضافه شده، پس از سانتریفوژ کردن سرم آن جدا شده و در ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. انسولین به روش الیزا توسط کیت انسولین رت (Crystal chem., Chicago, USA) و گلوکاگن به روش رادیو ایمنواسی توسط کیت گلوکاگن رت [۱۱] اندازه‌گیری شد.

#### مطالعه مورفولوژی سلول‌های بتای پانکراس

برای این منظور از روش ایمنینو هیستو کیمیکال استفاده شد. پس از کشتن حیوانات بلافاصله بافت پانکراس ایزوله شد و در محلول فرمالدهاید به اضافه استیک اسید قرار داده شد و محلول به مدت یک شب در یخچال نگهداری شد. روز بعد، ابتدا پانکراس به ۱۰ الی ۱۲ قطعه تقسیم شد. برای اتفاقی کردن چیدمان نمونه‌ها و به کمک الکل و گزلیل از بافت، به ترتیب آبگیری و الکل‌گیری صورت گرفت و بعد بافت‌ها در پارافین قرار داده شد و بلوک‌های پارافینی ساخته شد و پس از آن به کمک میکروتوم (Leica Microsystems, Nussloch, Germany) برش‌های ۵ میکرومتر تهیه گردید.

۱- در نمونه‌هایی که برای فلوسیتومتری انتخاب شده بودند، برای جدا کردن سلول‌های  $CD4^+ / CD25^+$  از سوپانسیون سلولی از کیت مخصوص Negative sorting همراه با مگنت  $CD4^+$  (R&D system) استفاده شد و سلول‌های  $CD4^+$  جمع‌آوری شد. پس از سدیماناسیون با آنتی‌بادی Biotyilated anti  $CD25$  IgM (۱ میکرولیتر به ازای هر نیم میلی‌لیتر از سلول) به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس با ۲۰ میکرولیتر از Streptavidin-ferrofluid (R&D system) مخلوط شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه دیگر انکوبه شدند. سپس حجم سوپانسیون سلولی با افزودن Sorting buffer به ۱/۵ میلی‌لیتر رسید و سلول‌های نشان‌دار شده با استفاده از مگنت جدا و سلول‌ها مورد شمارش قرار گرفتند و برای فلوسیتومتری Multi-color، نیم میلیون از سلول‌های سوپانسیون طحال هر موش جدا گردید و در ظروف جداگانه‌ای با anti- $CD25$ -perp-cy5.5، anti- $CD4$ -PE و anti-Nrp1-Af647 IgG مخلوط شدند. بعد از Staining سطحی آنها برای fixation/permeabilization و Staining داخل سیتوپلاسمی با استفاده از گیت anti-FOXP3 (e-Bioscience) بر طبق روش شرکت سازنده جهت فلوسیتومتری استفاده شد.

۲- برای اندازه‌گیری توانایی لئوسیت‌های T رگولاتور در مهار پرولیفراسیون لئوسیت‌های T افکتور از نمایه Suppression استفاده شد. در این روش سلول‌های  $CD4^+ / CD25^+$  ایزوله شده از موش‌های مختلف به سلول‌های Responder (طرز تهیه آن بعداً توضیح داده خواهد شد)، به تعداد مساوی به نسبت ۱ به ۱ اضافه شدند. تعداد مساوی از سلول‌های دو مثبت در خانه‌های پوشش دار پلیت قرار داده شدند. خانه‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر از مدیوم AIMV پر شدند. بعد از ۴۸ ساعت Conditioned medium برای Cytokine ELISA جمع‌آوری شد و پرولیفراسیون با تست MTT تخمین زده شد. برای این تست MTT به هر خانه که محتوی ۵۰ میکرولیتر مدیوم بود اضافه شد تا غلظت نهایی به ۱ mg/ml برسد و پلیت به مدت ۴ ساعت انکوبه شد و واکنش با

## رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس

برش‌ها به وسیله گزینیل پارافین زدایی شدند و با قرار دادن در غلظت‌های مختلف الکل، آب دهی گردیدند. سپس برش‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در محلول آب اکسیژنه قرار داده شدند و بعد به مدت ۳۰ دقیقه بافت‌ها در محلول سدیم سیترات با pH ۶ و درجه حرارت ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و با استفاده از سرم بز، عمل بلاک کردن برش‌ها صورت گرفت. سپس به برش‌ها آنتی‌بادی آنتی‌انسولین خوکی (Dako; (Diagnostics, Mississauga, ON, Canada) با غلظت ۱:۸۰۰ افزوده شد و به مدت یک شب در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس به نمونه‌ها با غلظت Anti-guinea pig IgG biotinylated mouse ۱:۵۰۰ (Vector laboratories Inc- Burlingame, CA, USA) و به مدت ۲ ساعت در درجه حرارت محیط قرار داده شدند. سپس به مدت ۱ ساعت به نمونه‌ها از کیت ABC (Vector laboratories Inc Burlingame, CA USA) اضافه گردید که این عمل برای نشان دار کردن پروتئین‌ها صورت گرفت و سپس به مدت ۱۰ دقیقه به نمونه‌ها DAB (Vector laboratories Inc Burlingame, CA, USA) اضافه گردید که این عمل برای ردیابی پروتئین‌های نشان‌دار شده صورت گرفت. سپس برش‌ها شستشو داده شدند و به وسیله هماتوکسیلین رنگ آمیزی گردیدند. با افزایش تدریجی در غلظت الکل برش‌ها آب گیری شدند و با استفاده از permount، عمل ثابت کردن برش‌ها بر روی لام صورت گرفت.

## آنالیز آماری

تمام نتایج این تحقیق به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار گزارش شده است و جهت آنالیز داده‌ها از تی تست و

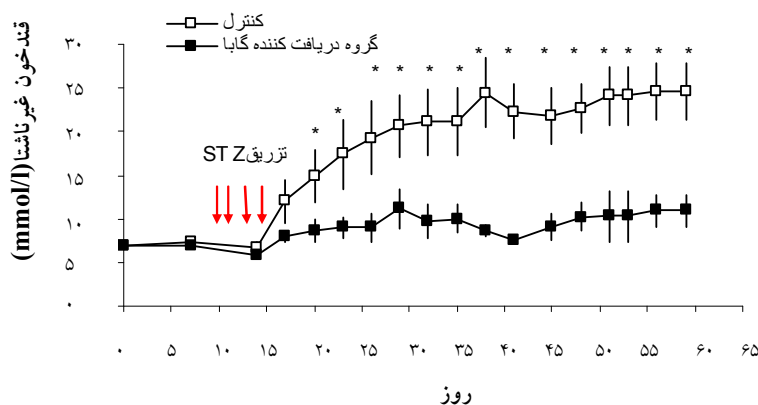
آنالیز واریانس دوطرفه استفاده شد و  $P < 0/05$  به عنوان سطح معنی دار بودن تلقی گردید.

## یافته‌ها

قبل و یک هفته پس از تجویز گابا، بین دو گروه از نظر وزن و قند خون غیر ناشتا تفاوت معنی داری وجود نداشت.

## تغییرات قند خون

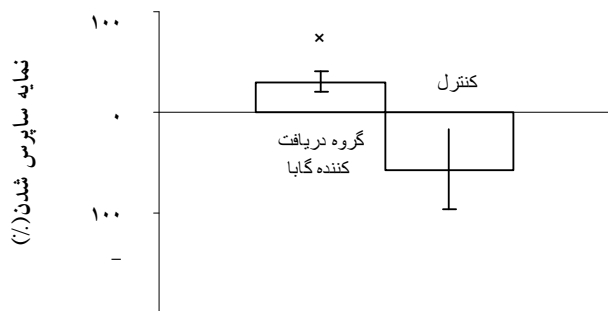
شکل ۱، تغییرات قند خون غیر ناشتا حیوانات دریافت کننده گابا و PBS را نشان می‌دهد. همان‌طور که در منحنی دیده می‌شود، در روز صفر قبل شروع تجویز گابا، بین دو گروه تفاوتی وجود ندارد به طوری که میانگین قند خون در گروه دریافت کننده گابا و کنترل به ترتیب  $7 \pm 0/17$  و  $7 \pm 0/17$   $\mu\text{mol/l}$  می‌باشد. علاوه بر آن تا یک هفته پس از تجویز گابا نیز بین دو گروه هیچ تفاوتی وجود ندارد. میانگین قند خون در گروه دریافت کننده گابا و کنترل به ترتیب  $7/3 \pm 0/42$  و  $7/3 \pm 0/42$   $\mu\text{mol/l}$  اما بیست روز پس از آخرین تزریق STZ، بین دو گروه تفاوت معنی داری مشاهده می‌شود ( $P < 0/001$ )؛ به طوری که غلظت گلوکز در گروه دریافت کننده گابا به صورت معنی داری کمتر از گروه دریافت کننده PBS می‌باشد. میانگین قند خون در گروه دریافت کننده گابا و کنترل به ترتیب  $1/29 \pm 1/66$  و  $2/99 \pm 14/96$   $\mu\text{mol/l}$  و این کاهش تا پایان هشت هفته ادامه داشته است به طوری که میانگین قند خون در گروه دریافت کننده گابا و کنترل به ترتیب  $1/81 \pm 10$  و  $24/58 \pm 3/27$   $\mu\text{mol/l}$  می‌باشد.



شکل ۱- تغییرات میزان قند خون بر حسب  $\text{mg/dl}$  در دو گروه دریافت کننده گابا و کنترل به مدت شصت روز.

نوع مطالعه تجربی بود و در هر گروه ده راس موش مورد بررسی قرار گرفت و مقایسه دو گروه با استفاده از آنالیز واریانس دوطرفه صورت گرفت.\* اختلاف معنی دار بین دو گروه را نشان می‌دهد ( $P < 0/001$ )

CD3<sup>+</sup>CD28 (که یک نوع القا کننده پرولیفراسیون لنفوسیت های نوع T است) شود (۳۰±۱۰) در حالی که در گروه کنترل، لنفوسیت های CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> نتوانسته اند سبب سرکوب پرولیفراسیون لنفوسیت های T شوند (۵۷±۴۰-). بلکه سبب پرولیفراسیون لنفوسیت های نوع T شده اند، به سبب آن که نمایه Suppression منفی می باشد و اختلاف معنی داری بین دو گروه مشاهده می شود (P<۰/۰۱).



شکل ۲- میزان مهار آنتی CD3<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> القا کننده پرولیفراسیون لنفوسیت های نوع T در گروه دریافت کننده گابا و گروه کنترل نوع مطالعه تجربی بود و در هر گروه ده راس موش مورد بررسی قرار گرفت و مقایسه دو گروه با استفاده از تی تست صورت گرفت. \* اختلاف معنی دار بین دو گروه را نشان می دهد (P<۰/۰۱)

### یافته های فلوسیتومتری

دو خ نشان می دهند که تجویز گابا سبب افزایش معنی در (P<۰/۰۱)، بیان FOXP3<sup>+</sup> و Nrp1<sup>+</sup> در سلول های CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> شده است به طوری که میانگین در گروه دریافت کننده گابا و کنترل به ترتیب ۸±۴۹ و ۲±۲۴ است و علاوه بر آن تعداد سلول های حاوی Nrp1<sup>+</sup>، تحت تاثیر گابا افزایش و تغییرات بین دو گروه از نظر تعداد سلول های حاوی Nrp1<sup>+</sup> (در گروه دریافت کننده گابا ۸±۴۸ و در گروه کنترل ۵±۲۴ است) و بیان FOXP3<sup>+</sup> و Nrp1<sup>+</sup> معنی دار می باشد (P<۰/۰۱).

### تغییرات میزان انسولین و گلوکاگن سرم

شکل ۴ الف، تغییرات گلوکاگن به انسولین را هشت هفته پس از تجویز گابا و PBS در دو گروه تحت مطالعه نشان می دهد. نتایج حاکی از آن است که تجویز گابا به صورت معنی داری (P<۰/۰۵) از افزایش گلوکاگن پلاسما در مقایسه با گروه کنترل جلوگیری کرده است، به طوری که میانگین غلظت گلوکاگن در گروه دریافت کننده گابا و کنترل به ترتیب ۴/۵±۹۰/۷ و ۱۸/۷±۱۳۰/۰۷ ug/ml است. بنابراین نسبت فوق به صورت

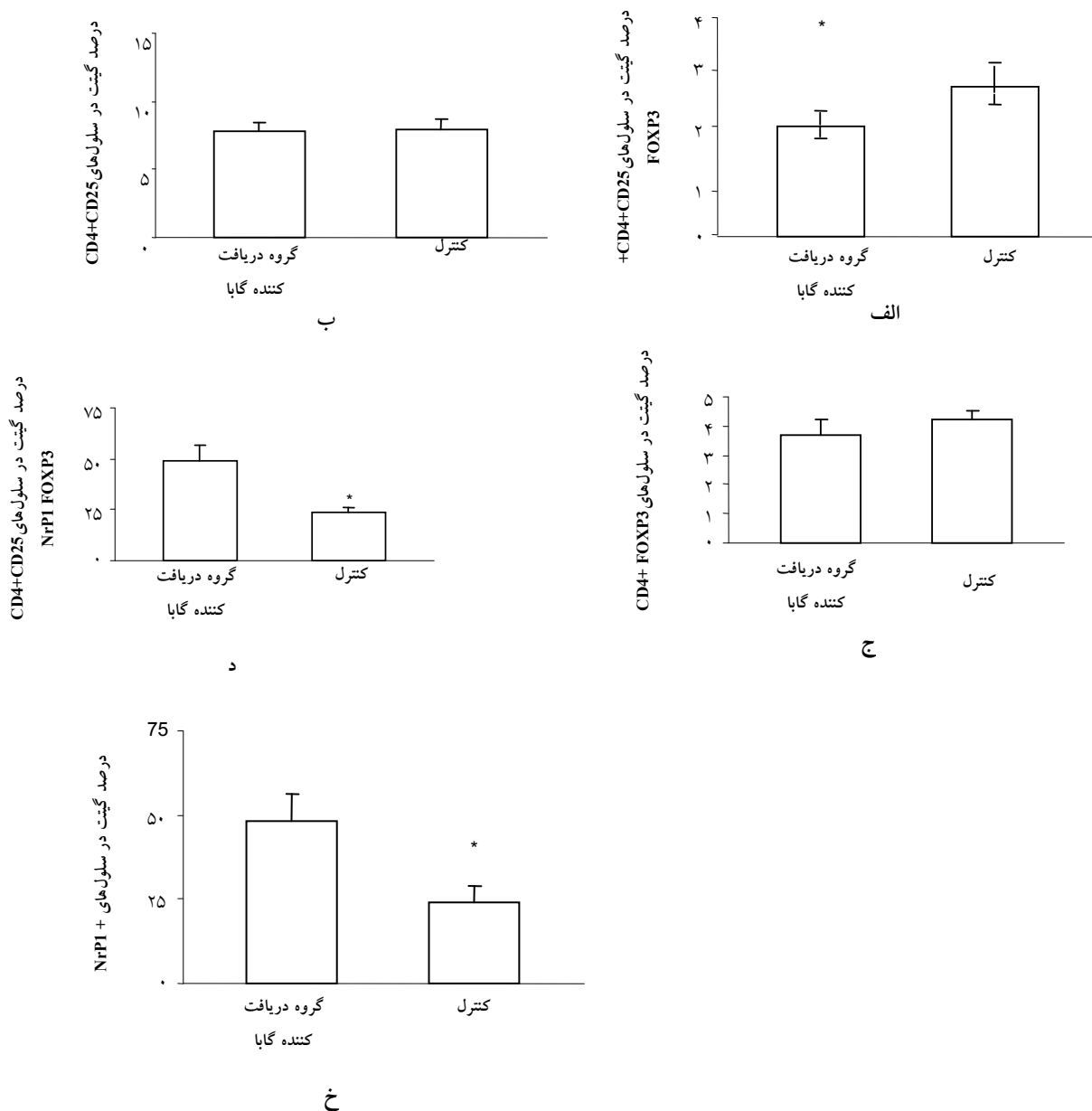
### نمایه ساپرس شدن

شکل ۲ میزان مهار آنتی CD3<sup>+</sup>/CD28<sup>+</sup> که یک نوع القا کننده پرولیفراسیون لنفوسیت های نوع T است را در گروه دریافت کننده گابا و گروه کنترل نشان می دهد. همان طور از نمودار مشخص است، لنفوسیت های CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> در گروه دریافت کننده گابا نتوانسته است باعث سرکوب آنتی

شکل ۳، تاثیر تزریق گابا و PBS بر تعداد لنفوسیت های CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (الف)، CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (ب)، CD4<sup>+</sup>POXP3<sup>+</sup> (ج)، Nrp1<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> در میان CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (د)، Nrp1<sup>+</sup> (خ) در طحال موش های گروه های مورد مطالعه را نشان می دهد. همانطور که نمودار ب نشان می دهد، تعداد لنفوسیت های CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> در طحال موش های دریافت کننده گابا کمتر از گروه کنترل است (۲/۰۴±۰/۲ در مقابل ۰/۵±۲/۵۷). همان طور که نمودارهای الف و ج نشان می دهند، میزان بیان FOXP3<sup>+</sup> در لنفوسیت های نوع CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> در دو گروه تفاوتی ندارد به طوری که میانگین تعداد لنفوسیت های CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> در گروه دریافت کننده گابا و کنترل به ترتیب ۷/۸±۰/۷ و ۷/۹±۰/۸ بوده و میانگین تعداد لنفوسیت های CD4<sup>+</sup>POXP3<sup>+</sup> در گروه دریافت کننده گابا و کنترل به ترتیب ۳/۷±۰/۵ و ۲/۴±۰/۳ بوده است. به عبارت دیگر تجویز گابا سبب بیان FOXP3<sup>+</sup> نشده و بنابراین تعداد لنفوسیت های تنظیم کننده افزایش نیافته است. اما نمودارهای

کاهش غلظت پلاسمایی انسولین در مقایسه با گروه کنترل جلوگیری نماید به طوری که میانگین غلظت گلوکز در گروه دریافت کننده گابا و کنترل به ترتیب  $0.98 \pm 0.01$  و  $0.77 \pm 0.01$  ng/dl است، بنابراین نسبت فوق در گروه دریافت کننده گابا در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری ( $P < 0.05$ ) بیشتر است ( $0.009 \pm 0.0005$  در مقابل  $0.005 \pm 0.0007$ ).

معنی داری ( $P < 0.05$ ) در گروه دریافت کننده گابا کمتر از گروه کنترل می باشد ( $97/2 \pm 7/8$  در مقایسه با  $167/8 \pm 26/5$ ). شکل ۴ ب میزان تغییرات انسولین به گلوکاگن را هشت هفته پس از تجویز گابا و PBS در دو گروه تحت مطالعه نشان می دهد. همانطور که ملاحظه می شود، تجویز گابا به مدت هشت هفته توانسته است به طور معنی داری ( $P < 0.05$ ) از

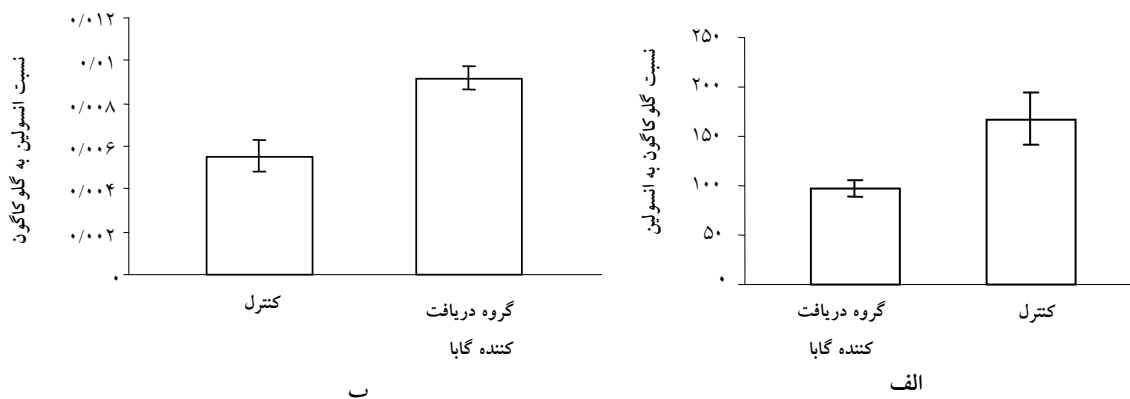


شکل ۳- تاثیر تزریق گابا و PBS بر تعداد لنفوسیت های  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  (الف)،  $CD4^+CD25^+$  (ب)،  $CD4^+FOXP3^+$  (ج)،  $Nrp1^+FOXP3^+$  (د)،  $Nrp1^+$  (خ) در طحال موشهای گروه های مورد مطالعه. نوع مطالعه تجربی بود و در هر گروه ده راس موش مورد بررسی قرار گرفت و مقایسه دو گروه با استفاده از تی تست صورت گرفت. \* اختلاف معنی دار بین دو گروه را نشان می دهد ( $P < 0.01$ )

دیابتی (الف) نشان می دهند، همانطور که تصاویر نشان می دهد تجویز STZ سبب تخریب پانکراس شده در حالیکه تجویز گابا تا حدودی توانسته است جلوی این تخریب را بگیرد.

### تغییرات مورفولوژیکی سلول های بتای پانکراس

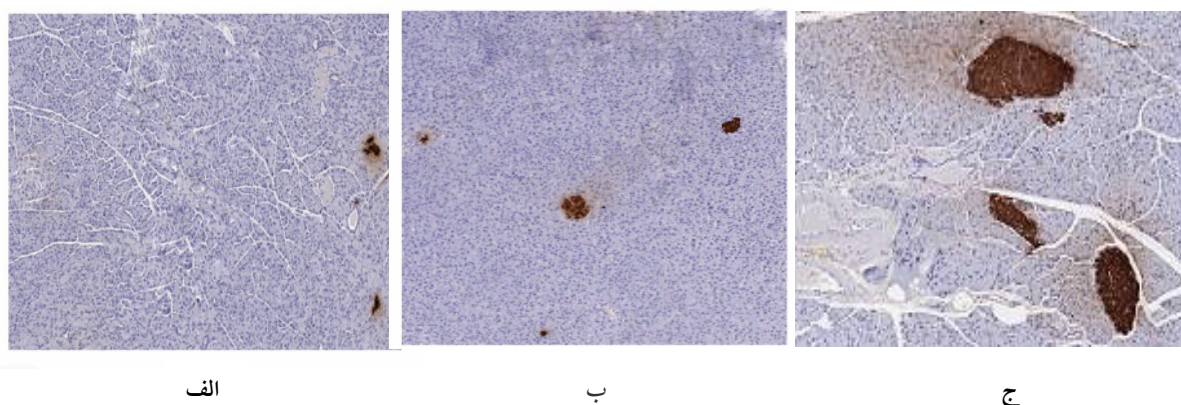
شکل ۵، تغییرات بافت شناسی سلول های بتای پانکراس را در نمونه سالم (ج) و نمونه دریافت کننده گابا (ب) و نمونه



شکل ۴- تغییرات غلظت گلوکاگون به انسولین (الف)، انسولین به گلوکاگون (ب) دو گروه دریافت کننده گابا و کنترل

نوع مطالعه تجربی بود و در هر گروه ده راس موش مورد بررسی قرار گرفت و مقایسه دو گروه با استفاده از تی تست صورت گرفت.

\* اختلاف معنی دار بین دو گروه را نشان می دهد ( $P < 0.05$ )



شکل ۵- تغییرات مورفولوژیکی سلول های بتای پانکراس در گروه کنترل (الف) دریافت کننده گابا (ب) سالم (ج)

نوع مطالعه تجربی بود و در هر گروه ده راس موش مورد بررسی قرار گرفت .

### بحث

سلول های  $CD4^+/CD25^+$  نوعی از سلول های T رگولاتوری هستند که از تیموس خارج می شوند و برای کنترل اتوایمیونیتی در دیابت نوع ۱ مفید هستند [۴]. برای تولید و فعال سازی این سلول ها، وجود  $FOXP3^+$  لازم است [۵] که در مقیاس زیاد در سلول های T رگولاتور از نوع  $CD4^+/CD25^+$  تولید می شود [۴]. اما ارتباط  $Nrp1$  با سلول های  $CD4^+CD25^+$  ناشناخته است.

دیابت نوع ۱، بیماری اتوایمیون است که بدن بر علیه سلول های بتای پانکراس آنتی بادی می سازد. در دیابت نوع ۱، لنفوسیت های نوع T و سایر فاکتورهای التهابی به داخل جزایر فیلتراسیون پیدا می کنند و سبب تخریب سلول های بتا و کاهش ترشح انسولین می شوند [۳].

شده دارد تا تعداد سلول‌های تنظیم کننده. ولی میزان بیان  $FOXP3^+$  در لنفوسیت‌های نوع  $CD4^+CD25^+$  در دو گروه تفاوتی ندارد. به عبارت دیگر تجویز گابا سبب بیان  $FOXP3^+$  نشده و بنابراین تعداد لنفوسیت‌های تنظیم کننده افزایش نیافته است. اما تجویز گابا سبب افزایش بیان  $FOXP3^+$  و  $Nrp1^+$  سلول‌های  $CD4^+CD25^+$  شده است و علاوه بر آن تعداد سلول‌های حاوی  $Nrp1^+$  تحت تاثیر گابا افزایش یافته است. بنابراین به نظر می رسد اثرات پیش گیری کننده گابا فقط از طریق افزایش بیان  $FOXP3^+$  در سلول‌های  $CD4^+CD25^+$  القا نمی شود بلکه افزایش بیان  $FOXP3^+$  و  $Nrp1^+$  در سلول‌های  $CD4^+CD25^+$  و همین طور افزایش تعداد این سلول‌ها می تواند اثرات پیشگیری کننده گابا را القا نماید.

به طور خلاصه نتایج مطالعه ما نشان داد که گابا از القای دیابت به وسیله STZ جلوگیری کرده و سازوکار این اثر از طریق افزایش بیان  $FOXP3^+$  در سلول‌های  $CD4^+CD25^+$  میانجیگری نمی شود، بلکه این سازوکار از طریق افزایش بیان  $FOXP3^+$  و  $Nrp1^+$  در سلول‌های  $CD4^+CD25^+$  و همین‌طور افزایش سلول‌های حاوی  $Nrp1^+$  صورت می گیرد.

### سپاسگزارای

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از کارکنان بخش تحقیقات بیمارستان سنت مایکل کانادا وابسته به دانشگاه تورنتو که از هر نظر ما را یاری نمودند اعلام می نمایند.

گابا آمی‌نو بوتریک اسید یکی از نوروترانسمی‌ترهای مهمی سیستم عصبی پستانداران می باشد که با غلظتی مشابه مغز در جزایر پانکراس وجود دارد و از سلول‌های بتا ترشح می شود [۱۲، ۱]. برخی از محققان نشان داده اند که در طی بیماری دیابت، غلظت گابا در پانکراس کاهش می یابد [۱].

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز گابا توانست از القای دیابت به وسیله STZ جلوگیری نماید به طوری که در گروه دریافت کننده گابا، تزریق STZ نتوانست قند خون را افزایش دهد در حالیکه در گروه کنترل قند خون به دنبال تزریق STZ افزایش یافت و کلیه حیوانات این گروه دیابتی شدند. علاوه بر این نتایج ما نشان داد که تجویز گابا توانسته است از سلول‌های بتای پانکراس محافظت نماید و از تخریب آنها توسط STZ جلوگیری نماید، به طوری که میزان انسولین پلاسما به طوری معنی دار بالاتر از گروه کنترل می باشد. همچنین مورفولوژی سلول‌های بتا در گروه دریافت کننده گابا اگر چه کاملاً شبیه نرمال نمی باشد، ولی به مراتب بهتر از گروه کنترل است. این مسأله حاکی از این حقیقت است که تزریق STZ سبب تخریب سلول‌های بتا می شود اما تجویز گابا از تخریب بیش از حد سلول‌های بتا جلوگیری می نماید. اما سوال اینجاست که سازوکار محافظتی از سلول‌های بتا توسط گابا از چه طریقی انجام می گیرد. نتایج ما نشان می‌دهد تعداد لنفوسیت‌های  $CD4^+/CD25^+$  درطحال موش‌های دریافت کننده گابا کمتر از گروه کنترل است، زیرا  $CD25$  در لنفوسیت‌های نوع T فعال شده بیان می شود و تعداد  $CD4^+CD25^+$  اشاره به تعداد سلول‌های فعال

### ماخذ

- 1- Adeghate E, Ponery AS. GABA in the endocrine pancreas: cellular localization and function in normal and diabetic rats. *Tissue Cell* 2002; 34(1):1-6.
- 2- Taniguchi H, Okada Y, Seguchi H, Shimada C, Seki M, Tsutou A, et al. High concentration of gamma-aminobutyric acid in pancreatic beta cells. *Diabetes* 1979; 28(7):629-33.
- 3- Okada Y, Taniguchi H, Shimada C. High concentration of GABA and high glutamate decarboxylase activity in rat pancreatic islets and human insulinoma. *Science* 1976; 194(4265):620-2.
- 4- Soltani N, Keshavarz M, Wang Q. Prevention effect of GABA on type one diabetes in NOD mice. *Iranian J of Diabetes and Lipid Disorder*. 2008;7(3):267-274.
- 5- Li W, Ji F, Zhang Y, Wang Y, Yang N, Wang F. Cooperation of invariant NKT cells and  $CD4^+CD25^+$  T regulatory cells in prevention of autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice treated with alpha-galactosylceramide.



- Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008; 40(5):381-90.
- 6- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nature Immunol* 2003; 4:330 – 336.
  - 7- Bourbié-Vaudaine S, Blanchard N, Hivroz C, Roméo PH. Dendritic cells can turn CD4<sup>+</sup> T lymphocytes into vascular endothelial growth factor-carrying cells by intercellular neuropilin-1 transfer. *J Immunol* 2006; 177(3):1460-9.
  - 8- Battaglia A, Buzzonetti A, Monego G, Peri L, Ferrandina G, Fanfani F, Scambia G, Fattorossi A. Neuropilin-1 expression identifies a subset of regulatory T cells in human lymph nodes that is modulated by preoperative chemoradiation therapy in cervical cancer. *Immunol* 2008; 123(1):129-38.
  - 9- Shi Y, Kanaani J, Menard-Rose V, Ma YH, Chang PY, Hanahan D, et al. Increased expression of GAD65 and GABA in pancreatic beta-cells impairs first-phase insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279 (3):E684-94.
  - 10- Soltani N, Kumar M, Glinka Y, Prud'homme GJ, Wang Q. Gene therapy of diabetes using a novel GLP-1/IgG1-Fc fusion construct normalizes glucose levels in db/db mice. *Gene Ther* 2007; 14(2):162-72.
  - 11- Xu E, Kumar M, Zhang Y, Ju W, Obata T, Zhang N, et al. Intra-islet insulin suppresses glucagon release via GABA-GABAA receptor system. *Cell Metab* 2006; 3(1):47-58.
  - 12- Ligon B, Yang J, Morin SB, Ruberti MF, Steer ML. Regulation of pancreatic islet cell survival and replication by gamma-aminobutyric acid. *Diabetologia* 2007; 50(4):764-73.

