

**Kanabidiol zastavuje nástup autoimunitného
diabetu u NOD myši
(Voľný preklad)**

Autori:

Lola Weiss, Michael Zeira, Shoshana Reich, Shimon Slavin, Itamar Raz, Raphael Mechoulam,
Ruth Gallily

Publikované:

Online 17.7.2007

Originálny článok dostupný na:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2270485/>

Kanabidiol zastavuje nástup autoimunitného diabetu u NOD myší

Abstrakt

Už sme predtým uviedli, že kanabidiol (CBD) znižuje výskyt cukrovky u mladých neobéznych samíc myší náchylných na cukrovku (NOD). V tejto štúdii ukazujeme, že podávanie CBD samiciam NOD myší vo veku 11–14 týždňov, ktoré sú buď v štádiu latentného diabetu alebo s počiatočnými príznakmi diabetu, zmierňuje prejavy ochorenia. Diabetes bol diagnostikovaný iba u 32 % myší v skupine liečenej CBD, v porovnaní s 86 % a 100 % v skupine liečenej emulgátorom a neliečenej skupine. Okrem toho hladina prozápalového cytokínu IL-12 produkovaného splenocytmi bola významne znížená, zatiaľ čo hladina protizápalového IL-10 bola významne zvýšená po liečbe CBD. Histologické vyšetrenie pankreasu myší liečených CBD odhalilo viac neporušených ostrovčekov ako u kontrol.

Kľúčové slová: Kanabinoidy, Kanabidiol, Diabetes, NOD myši, Cytokíny

Úvod

Diabetes mellitus 1. typu (T1DM - inzulín-dependentný diabetes) je autoimunitné ochorenie, ktoré vedie k deštrukcii pankreatických P-buniek produkujúcich inzulín, čo je proces, o ktorom sa predpokladá, že je sprostredkovaný hlavne CD4 Th1 a CD8 T lymfocytmi (Atkinson a Leiter, 1999 ; Mundrup-Poulsen a kol., 2003). NOD myš je zvierka, ktorá sa najčastejšie používa na predklinické hodnotenie profylaktických a terapeutických terapií cukrovky. Keď sa NOD myš nelieči, vyvinie sa u nej ochorenie s charakteristikami podobnými autoimunitnej inzultíde u človeka (Anderson a Bluestone, 2005).

Inzultída je zápal Langerhansových ostrovov a je počiatočnou léziou inzulín-dependentného diabetes mellitus, počas ktorej leukocyty, najmä lymfocyty, obklopujú a infiltrujú ostrovčeky.

Zatiaľ čo mnohé prístupy boli úspešne použité na prevenciu diabetu u mladých NOD myší, je oveľa ťažšie dosiahnuť zlepšenie diabetu po jeho nástupe alebo približne v čase jeho nástupu. Dôležité je, že niektoré terapie, o ktorých sa zistilo, že sú účinné v tomto myšom modeli, následne preukázali účinnosť v klinických štúdiách. Raz a kol. opísali imunomoduláciu s DiaPep277 vo fáze 2 klinickej štúdie (Raz et al., 2001) a Keymeulen et al. úspešne použili anti CD3 protilátky (Keymeulen et al., 2005).

Kanabidiol (CBD) je silné protizápalové činidlo. Je účinný pri potláčaní produkcie IFN- γ a TNF- α a progresie autoimunitnej reumatoidnej artritídy sprostredkovanej Th1 inhibíciou proliferácie T buniek (Malfait et al., 2000). Toto pozorovanie nás viedlo k skúmaniu možných účinkov CBD na ďalšie autoimunitné ochorenia. Nedávno sme preukázali, že CBD znižuje výskyt cukrovky u mladých NOD myší. Tiež významne znižuje plazmatické hladiny prozápalových cytokínov IFN- γ a TNF- α , znižuje produkciu cytokínov spojených s Th1 in vitro a zvyšuje cytokíny spojené s Th2 IL-4 a IL-10 (Weiss et al.,

2006). Po tomto pozorovaní, ktoré ukazuje, že CBD čiastočne bráni iniciácii cukrovky, sme sa rozhodli preskúmať možnosť, že CBD môže zabrániť aj rozvoju zjavného alebo latentného cukrovky.

V našej súčasnej správe sme zistili, že CBD významne inhibovalo inzulinotitu u samíc NOD myši vo veku 11 až 14 týždňov.

Materiály a metódy

2.1 Myši

Neobézne samice diabetických myši NOD/LtJ, vo veku 11–14 týždňov, boli získané z Harlan, Izrael. U samíc myši NOD sa diabetes rozvinie po 12–18 týždňoch. Samice myši BALB/c (vo veku 11 až 14 týždňov) boli tiež získané od rovnakého dodávateľa. Myši boli kŕmené štandardnou potravou pre laboratórne zvieratá ad libitum a boli držané v zariadení bez patogénov (SPF). Štúdia bola vykonaná v súlade s medzinárodnými zákonmi o pokusoch na zvieratách a schválená etickou komisiou Lekárskej fakulty Hebrejskej univerzity.

2.2 Kanabidiol (CBD)

CBD bolo extrahované z kanabisovej živice (hašiš) a purifikované, ako už bolo uvedené (Gaoni a Mechoulam, 1971). Kryštalický CBD s teplotou topenia 66–67 °C predstavoval pri analýze plynovou chromatografiou jediný vrchol. CBD sa najskôr rozpustilo v etanole a potom sa pridalo rovnaké množstvo Cremophoru EL (Sigma). Tento roztok sa potom ďalej zriedil fyziologickým roztokom, takže konečným roztokom bol etanol/cremofor/fyziologický roztok (1:1:18).

2.3 Experimentálny dizajn

Samice myši NOD, vo veku 11 až 14 týždňov, so zhoršenou toleranciou glukózy a myši vo veku 14 týždňov s normálnou toleranciou glukózy, boli zaradené do troch skupín (Gross et al., 1998). Jedna skupina dostala CBD, druhá skupina dostala Cremophor/etanol/fyziologický roztok (vehikulum) a tretia skupina zostala neliečená. CBD sa podávalo ip v dávke 5 mg/kg/deň v 0,1 ml. Experiment pokračoval počas 4 týždňov, pričom každá myš dostala 5 podaní týždenne. Myši boli pozorované do veku 24 týždňov.

Hladina glukózy v moči sa stanovovala raz alebo dvakrát týždenne testovacími prúžkami (Medi-Test Combi 9 Macherey-Nagel, Duren) a považovala sa za pozitívnu po objavení sa glukozúrie (>1000 mg/dl) najmenej v dvoch stanoveniach, podľa informácie výrobcu.. Zistilo sa, že hladina glukózy 1000 mg/dl v moči koreluje s >200 mg/dl. glukózy v krvi.

2.4 Kultivácia peritoneálnych makrofágov

Peritoneálne výplachy z každej myši, obsahujúce približne 40 % makrofágov (PMO), sa zhromaždili vo fyziologickom roztoku s fosfátovým pufróm (PBS), odstredili sa a pelety sa potom resuspendovali a umiestnili sa na dve hodiny do 24-jamkových doštičiek s peritoneálnymi bunkami. Jamky sa premyli, aby sa odstránili neadherentné bunky a k bunkám, väčšinou makrofágom > 90 %, sa pridalo čerstvé

DMEM s 10 % fetálnym teľacím sérom (FCS) na ďalšiu inkubáciu cez noc. Zobierané supernatanty sa centrifugovali, aby sa odstránili všetky bunky a skladovali sa pri -80 °C, kým sa netestovali na cytokíny.

2.5 Kultivácia lymfocytov v slezine

Bunky sleziny z každej myši boli asepticky odstránené, bunky boli uvoľnené, premyté v PBS, resuspendované v kompletnom médiu RPMI doplnenom 10 % FCS, 100 U/ml penicilínu, 100 ug/ml streptomycínu a 2 mM L-glutamínu (Beith Haemek, Izrael) počítané s vylúčením farbiva trypanovou modrou na rozlíšenie živých buniek (nezafarbené) a rozdelené do 24-jamkových doštičiek (Greiner Labs, Nemecko) v koncentrácii 2 x 10⁶ buniek /ml média na jamku. Bunky boli stimulované 2,5 ug/ml Concanavalin A (ConA) (Sigma St. Louis, MI, USA) a kultivované pri 37 °C vo zvlhčovanom inkubátore s 5 % CO₂. Supernatanty boli zobierané po 48 hodinách inkubácie, vyčistené centrifugáciou a uskladnené pri -80 °C, kým neboli testované na cytokíny.

2.6 Cytokínový test

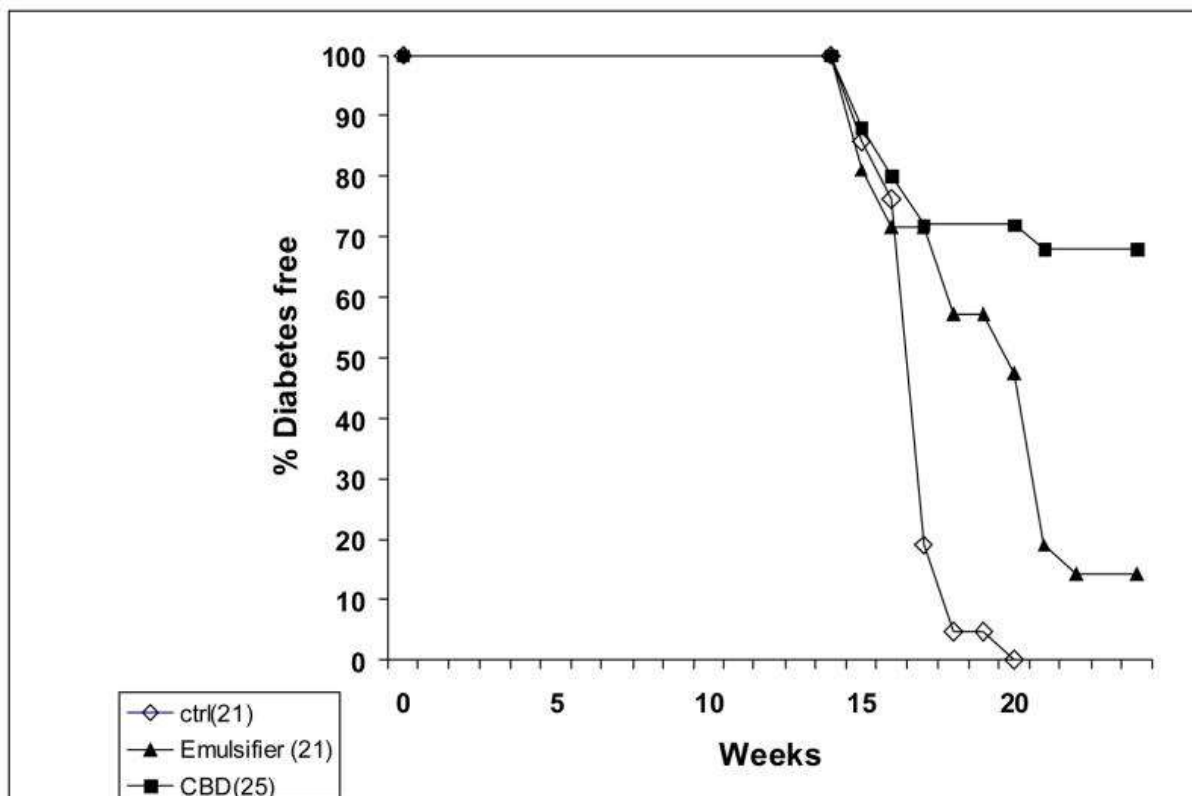
Hladiny cytokínov v plazme a v supernatantoch slezinných lymfocytov a peritoneálnych makrofágov myši boli testované „sendvičovou“ ELISA technikou. Reagencie ELISA boli zakúpené ako Opt. Sady EIA Cytokine ELISA od BD Biosciences (San Diego, CA, USA) a boli použité podľa protokolu výrobcu, ako už bolo opísané (Ji et al., 2003).

2.7 Histopatológia

Pankreatické tkanivo sa fixovalo v 4% pufrovanom formalíne, zalialo sa do parafínu a 5 µm rezy sa zafarbili hematoxylínom a eozínom. Dvadsať rezov bolo skrínovaných a hodnotených dvoma nezávislými pozorovateľmi a boli klasifikované nasledovne: neporušené ostrovčeky; čiastočne infiltrované ostrovčeky a periinfiltrované ostrovčeky; úplne infiltrované ostrovčeky; zničené ostrovčeky.

2.7 Štatistická analýza

Štatistická významnosť výsledkov výskytu cukrovky v Obrbola vypočítaná Kaplan-Meierovou metódou a štatisticky významné rozdiely medzi krivkami boli analyzované podľa logaritmu. Rozdiely medzi experimentálnymi a kontrolnými hodnotami (stôl 1) boli analyzované na významnosť (p<0,05) Mann-Whitney U testom bez jednostrannej distribúcie.



Výskyt cukrovky u NOD myší liečených 5 mg/kg CBD ip, kontrolné vehikulum a neliečené myši. Výskyt cukrovky v skupine liečenej CBD v porovnaní s myšami liečenými vehikulom a neliečenými kontrolami bol významný $p < 0,001$ (log rank test)

Výsledky

3.1 CBD čiastočne bráni rozvoju zjavného diabetu u samíc myší NOD

CBD sa podávalo ip 11-14 týždňov starým samiciam NOD myší. Liečba pokračovala počas 4 týždňov (5 dní v týždni) v dávke 5 mg/kg/deň. Liečba sa potom prerušila a myši sa pozorovali až do veku 24 týždňov. Pozoruhodné zníženie rozvoja cukrovky bolo pozorované u myší liečených CBD v porovnaní s myšami liečenými vehikulom a neliečenými kontrolami ($p < 0,001$, log rank test). Na konci 24 týždňov sa len u 8 z 25 (32 %) myší liečených CBD vyvinula glukozúria v porovnaní s 18 z 21 (86 %) myší liečených vehikulom a 100 % (21 myší) neliečených kontrol (Obr).

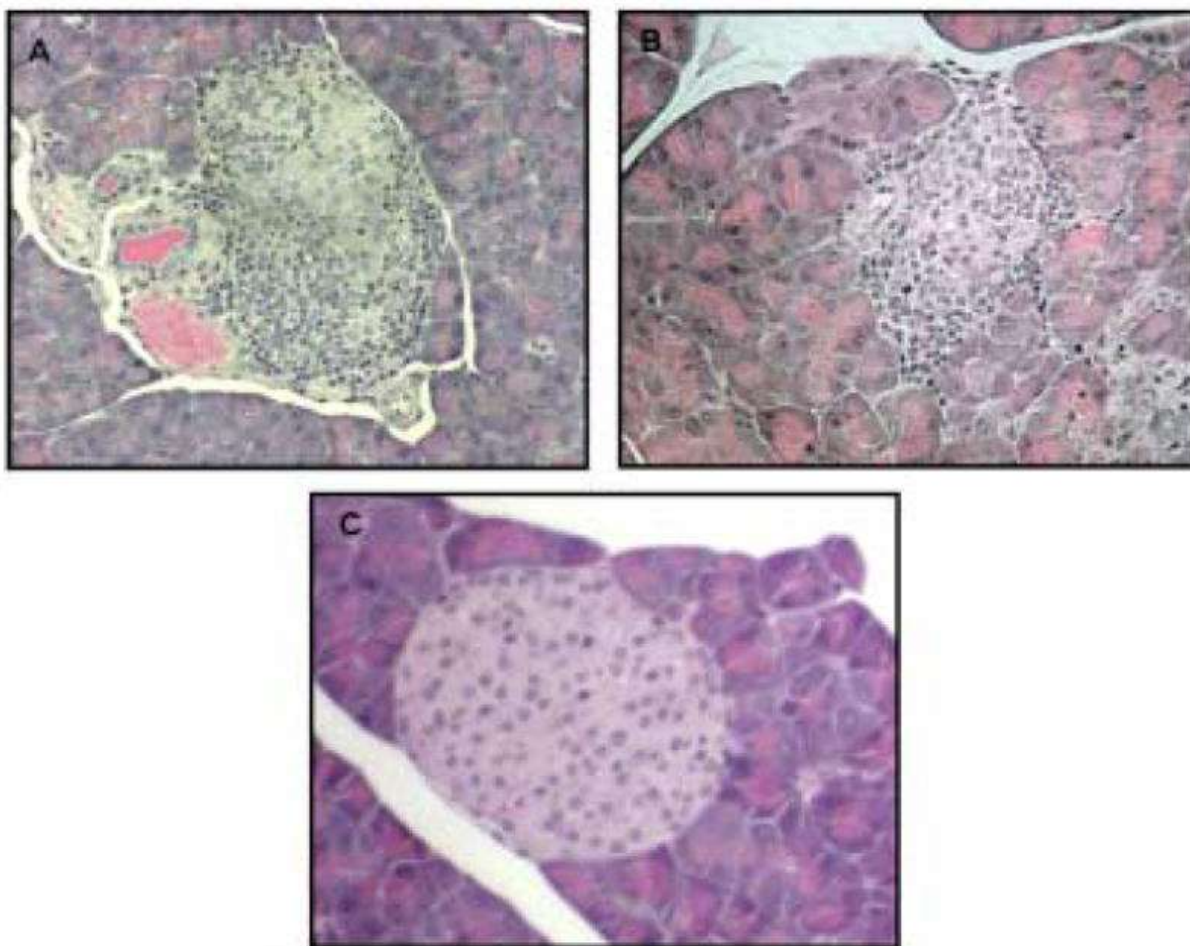
3.2 Účinok CBD na cytokínový profil

Koncentrácia cytokínov IL-12, TNF- α , IL-6 a IL-10 v supernatantoch NOD splenocytov a makrofágov (stimulovaných a nestimulovaných in vitro), ako aj IL-6 v plazme boli hodnotené pomocou ELISA. Významné zníženie hladiny IL-6 bolo zaznamenané v plazme myší liečených CBD ($p = 0,016$), ako aj hladín IL-6 a IL-12 v bunkových supernatantoch myší NOD liečených CBD v porovnaní s hladinami u myší liečených vehikulom ($p = 0,015$ a $p = 0,018$). Hladina TNF- α v supernatantoch splenocytov bola tiež znížená, ale zníženie nebolo významné ($p = 0,068$). Na rozdiel od toho hladiny cytokínov spojených s Th2, IL-10, v supernatantoch makrofágov a splenocytov a IL-4 vylučovaného splenocytmi boli vyššie, hoci v prípade IL-4 nebolo zvýšenie významné ($p = 0,05$, $p = 0,029$ a $p = 0,056$) (stôl 1). Zmeny v cytokínovom profile naznačujú, že podávanie CBD indukuje posun Th1 \rightarrow Th2 (Crane a Forrester, 2005 ; Chan et al., 1991),

3.3 Histológia pankreasu

Morfologická štruktúra neporušených ostrovčekov z myší NOD liečených CBD bola podobná ako u normálnych ostrovčekov, na rozdiel od hojnej invázie mononukleárných buniek do ostrovčekov u myší liečených vehikulom a neliečených myší. Počet neporušených ostrovčekov v pankrease odobratých neliečeným (6 zo 73, 8 %) a vehikulom liečeným myšiam (12 z 94, 13 %) sa znížil v porovnaní s myšami liečenými CBD (108 zo 140, 77 %). Keďže väčšina ostrovčekov u kontrolných diabetických myší bola úplne zničená a zmizla, celkový počet spočítaných ostrovčekov bol nižší ako u myší liečených CBD. (Tabuľka 2).

Bunková infiltrácia do ostrovčekov (vedúca k inzulitíde) bola tiež nižšia v pankrease myší liečených CBD, keď boli vyšetrené 6–8 týždňov po ukončení liečby. Morfologický vzhľad intaktných ostrovčekov bol podobný ako u normálnych ostrovčekov. Na rozdiel od toho bola v pankrease vehikula a neliečených kontrol pozorovaná hojná invázia mononukleárných buniek do ostrovčekov a zničené ostrovčeky (Obr).



Reprezentatívna histológia hematoxylín-eozínom zafarbených pankreasov z (A) neliečených kontrolných myší, mag. $\times 800$, (B) myši ošetrené vehikulom, mag. $\times 800$ a (C) myši liečené CBD, mag. $\times 800$. Bohatá invázia mononukleárných buniek do ostrovčekov a priinzulitída v pankrease neliečených myší a myší liečených vehikulom (A a B). Pankreas nediabetických myší liečených CBD nevykazoval ani bunkovú infiltráciu, ani deštrukciu ostrovčekov (C).

Diskusia

Štúdium hladín rôznych cytokínov vylučovaných in vitro makrofágmi a splenocytmi odvođenými od NOD myší liečených CBD preukázalo zníženie produkcie IL-6, TNF-a a IL-12. Na rozdiel od toho boli hladiny IL-10 (pomocou PM9 a splenocytov) a IL-4 (pomocou splenocytov) zvýšené. Avšak zmeny hladín TNF-a a IL-4 indikovali iba trend, pretože nedosiahli štatistickú významnosť. Početné výskumy ukázali, že potlačenie prozápalových cytokínov TNF-a, IL-6 ako aj IL-12 inhibuje zápalové poškodenie. Okrem toho je známe, že zvýšenie produkcie IL-10, ktorý potláča produkciu prozápalových cytokínov, ruší zápalové prejavy.

Už sme predtým ukázali, že liečba NOD myší (vo veku 6–12 týždňov) pomocou CBD vedie k zvýšeniu produkcie IL-4 a IL-10 splenocytmi a zníženiu IFN- γ (Weiss et al., 2006). Predpokladali sme, že tento jav demonštruje posun cytokínov Th1 na Th2, mechanizmus, ktorý môže zabrániť rozvoju diabetu (Elenkov et al. 2005).

Výsledky tejto štúdie naznačujú, že liečba samičiek NOD myší vo veku 11–14 týždňov, buď v štádiu latentného diabetu (po 14 týždňoch) alebo s počiatočnými príznakmi diabetu (objavujú sa až 14 týždňov), pomocou CBD počas 4 týždňov, viedla k trvalej inhibícii inzulinodity. Liečba CBD vyvolala kvalitatívnu modifikáciu infiltrátov ostrovčekov mononukleárnymi bunkami, inhibovala špecifickú deštrukciu ostrovčekov a prípadne zabránila cukrovke (Obr, Tabuľka 2). Liečba CBD znížila diabetes z 86 % u neliečených myší na 32 % u myší liečených CBD. Priamy účinok CBD na glukózové záťažové testy (tj 2 g/kg ip) u BALB/c oproti NOD myšiam nepreukázal žiadny rozdiel v liečbe fyziologickým roztokom v porovnaní s CBD. Tento výsledok nepreukázal žiadny priamy vplyv CBD na hladiny glukózy v krvi. Bolo tiež preukázané, že liečba CBD inhibovala produkciu IL-12 splenocytmi. IL-12 je cytokín, ktorý hrá hlavnú úlohu pri autoimunitnej cukrovke (Rothe a kol., 1996; Trembleau a kol., 1995 ; Rabinovitch a kol., 1996 ; Trichieri a kol., 1995). Je známe, že makrofágy a dendritické bunky produkujú IL-12, ktorý spúšťa tvorbu IFN γ (Verma et al., 2006).

Th1 cytokíny aktivujú cytotoxické T bunky a stimulujú makrofágy k produkcii prozápalových cytokínov a voľných dusíkových radikálov (NO). Je známe, že makrofágy a dendritické bunky produkujú IL-12, ktorý spúšťa tvorbu IFN γ (Verma et al., 2006). Všetky tieto molekuly prispievajú k deštrukcii ostrovčekov. Tieto výsledky naznačujú, že supresia produkcie makrofágového IL-12 CBD môže inhibovať autoimunitu sprostredkovanú Th1.

Rozdiel medzi Th1 a Th2 bunkami pri diabete je diskutovaný v rôznych štúdiách (Rabinovitch a kol., 2003, Maierhoff G, 2002, Suarez-Pinzon 2001). Cieľom liečby diabetu je znížiť hladiny cytokínov súvisiacich s Th1 cytokínmi IFN γ a IL-12 a zvýšiť cytokíny súvisiace s Th2 IL-4, IL-10.

Údaje v našej štúdii NOD naznačujú, že IL-6 sa podieľa na zápale ostrovčekov a CBD výrazným potlačením produkcie IL-6 znižuje deštrukciu ostrovčekov. Na patologických udalostiach sa pravdepodobne podieľajú ďalšie faktory, ako sú prozápalové cytokíny a mediátory.

Ďalej v tejto štúdii ukazujeme, že imunitné bunky z myší liečených CBD zvyšujú in vitro produkciu cytokínov IL-4 a IL-10. Tieto zmeny cytokínov korelovali s potlačením ochorenia. Niekoľko správ podporuje, že imunologické zásahy, ktoré zosilňujú Th2 imunitné reakcie u NOD myší, chránia pred ochorením. Napríklad liečba NOD myší pomocou IL-4, Th2 cytokínu, zabraňuje zjavnému diabetu (Rapaport a kol., 1993; Cameron a kol., 1997 ; Tominaga a kol., 1998) a lokálnej expresii IL-4 v pankrease beta bunky u transgénnych myší inhibujú inzulitídu (Mueller et al., 1996). Shi a spol. (2006) preukázali, že zrušenie rekurentnej autoimunity vyžaduje hostiteľský IL-4. Okrem toho hladiny IL-10, cytokínu spojeného s Th2, korelujú s ochranou (Mueller et al., 1996) a IL-4 a IL-10 inhibujú diabetes potlačením produkcie Th1 cytokínov v ostrovčekových štepoch (Rabinovitch et al., 1995).

Histologické vyšetrenie pankreasu ukázalo neprítomnosť inzulitídy u 77 % ostrovčekov v skupine liečenej CBD v porovnaní s 13 % v pankrease odobratom myšiam liečeným vehikulom; teda deštrukcia β buniek u myší liečených CBD bola výrazne potlačená (Tabuľka 2, Obr. 2C).

Už sme predtým ukázali, že liečba CBD mladých myší NOD zachovala viac ako 85 % ostrovčekov, ako bolo stanovené histologickou analýzou (Weiss et al., 2006). Tiež sme uviedli, že CBD inhibovalo produkciu TNF-a in vitro a in vivo (Malfait et al., 2000) a teraz sme zaznamenali rovnaký trend v inom systéme. Už sme tiež videli, že tvorba oxidu dusnatého je znížená in vitro (Ben-Shabat et al., 2006). Keďže TNF-a a oxid dusnatý sú dôležitými mediátormi poškodenia β -buniek indukovaného IL-1p (Corbett et al., 1991), je možné, že táto inhibícia predstavuje jednu z ochranných ciest, ktorými CBD pôsobí.

Carrier et al. (2006) nedávno navrhol, že CBD má protizápalové vlastnosti vďaka svojej väzbovej kapacite k A2A adenosínovému receptoru, čo vedie k inhibícii vychytávania adenosínu a zvýšeniu endogénnej adenosínovej signalizácie. Ďalej sa preukázalo, že inhibítory transportu adenosínu potláčajú in vivo produkciu TNF-a, jedného z kľúčových cytokínov zápalu. Pozorovaný účinok CBD pri cukrovke teda môže byť spôsobený, aspoň čiastočne, jeho väzbou a aktiváciou receptora A2A. V skutočnosti existuje niekoľko správ, ktoré naznačujú, že aktivácia receptora A2A sa podieľa na spôsobení cukrovky, hoci v niektorých prípadoch môže predstavovať výsledok cukrovky (Grden a kol., 2005 ; Thong a Graham., 2002 ; Awad a kol., 2006).

Je možné, že CBD pôsobí antagonizmom kanabinoidných agonistov. Bermudez-Siva a kol. (2006) preukázali, že aktivácia kanabinoidných CB1 receptorov indukuje glukózovú intoleranciu u myší a Juan-Pico et al. (2006) uviedli, že endokanabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG) prostredníctvom CB2 receptorov ovplyvňuje signály Ca^{2+} v β -bunkách a v dôsledku toho znižuje sekréciu inzulínu. Keďže sa nedávno zistilo, že CBD je antagonistom agonistov receptora CB1 a CB2 (Thomas et al., 2007) je možné, že touto cestou ovplyvňuje rozvoj diabetu u NOD myší. V skutočnosti sa uvádza, že antagonista kanabinoidného receptora CB1, rimonabant, vedie k nižším hladinám glukózy a inzulínu v plazme, ako aj k zlepšeniu inzulínovej rezistencie u zvierat a k zlepšeniu kontroly glykémie u prediabetických pacientov a pacientov s diabetom 2. typu (Gelfand a Cannon, 2006). .

Tiež sme demonštrovali, že in vivo liečba CBD zvyšuje produkciu IL-4 a IL-10, čo môže zabrániť rozvoju cukrovky prostredníctvom posunu Th1 → Th2 cytokínov, ako zaznamenali iné štúdie (Weiss et al., 2006).

Ukázalo sa, že rozsiahly zoznam terapeutických stratégií poskytuje určitú ochranu pred rozvojom zjavného diabetu v modeli NOD myší. Množstvo klinicky dostupných imunomodulačných zlúčenín, ako je cyklosporín, FK506 a Rapamycín, môže potlačiť progresiu ochorenia, ale niektoré z nich sú toxické alebo môžu zvýšiť riziko infekcie a tumorigenézy (Kai a kol., 1993 ; Baeder a kol., 1992).

Úspešná indukcia remisie u 17 z 25 diabetických myší liečbou CBD dlho po ukončení liečby naznačuje, že CBD má dlhodobý priaznivý vplyv na hmotu β -buniek a glykémiu. Predpokladáme, že účinnou kontrolou autoimunitných efektorových T-buniek alebo ovplyvňovaním cytokínovej rovnováhy, čo má za následok posun Th1 → Th2, CBD spôsobilo zlepšenie autoimunitnej inzulinodéy a umožnilo endogénnym prekurzorovým bunkám pomaly rásť k zvýšeniu hmoty β -buniek, a tak udržať normoglykémiu.

Hoci inzulinové substitučné terapie poskytujú chronickú starostlivosť o ľudí s diabetom 1. typu, táto liečba neobnovuje normálnu kontrolu glukózy a je spojená s významným rizikom hypoglykémie. Kontrola autoimunity môže predstavovať alternatívnu terapeutickú cestu zameranú na obnovu hmoty a funkcie pankreatických buniek.

CBD nie je psychoaktívne a má protizápalové a proti autoimunitné vlastnosti. Na základe vyššie uvedených výsledkov, na základe predtým zdokumentovaných protizápalových účinkov CBD (Malfait et al., 2000) a na základe jeho klinickej bezpečnosti (Cunha et al., 1980), sa zdá rozumné zvážiť použitie CBD na kontrolu diabetes 1. typu v počiatočnom štádiu ochorenia.

Referencie

Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:447–485. [PubMed] [Google Scholar]

Atkinson MA, Leiter EH. The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? *Nat Med.* 1999;5:601–604. [PubMed] [Google Scholar]

Awad AS, Huang L, Ye H, Duong ET, Bolton WK, Linden J, Okusa MD. Adenosine A2A receptor activation attenuates inflammation and injury in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;290:F828–837. [PubMed] [Google Scholar]

Baeder WL, Sredy J, Sehgal SN, Chang JY, Adams LM. Rapamycin prevents the onset of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in NOD mice. *Clin Exp Immunol.* 1992;89:174–178. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

Ben-Shabat S, Hanus LO, Katzavian G, Gallily R. New cannabidiol derivatives: Synthesis, binding to cannabinoid receptors and evaluation of their antiinflammatory activity. *J Med Chem.* 2006;49:1113–1117. [PubMed] [Google Scholar]

Bermudez-Siva FJ, Serrano A, Diaz-Molina FJ, Sanchez Vera I, Juan-Pico P, Nadal A, Fuentes E, Rodriguez de Fonseca F. Activation of cannabinoid CB1 receptors induces glucose intolerance in rats. *Eur J Pharmacol.* 2006;531:282–284. [PubMed] [Google Scholar]

Cameron MJ, Arreaza GA, Zucker P, Chensue SW, Strieter RM, Chakrabarti S, Delovitch TL. IL-4 prevents insulinitis and insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice by potentiation of regulatory T helper-2 cell function. *J Immunol.* 1997;159:4686–4692. [PubMed] [Google Scholar]

Carrier EJ, Auchampach JA, Hillard CJ. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2006;103:7895–7900. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

Chan SH, Perussia B, Gupta JW, Kobayashi M, Pospisil M, Young HA, Wolf SF, Young D, Clark SC, Trinchieri G. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med.* 1991;173:869–879. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

Corbett JA, Lancaster JR, Sweetland MA. Interleukin-1 beta-induced formation of EPR-detectable iron-nitrosyl complexes in islets of Langerhans. Role of nitric oxide in interleukin-1 beta-induced inhibition of insulin secretion. *J Biol Chem.* 1991;266:21351–21354. [PubMed] [Google Scholar]

Crane IJ, Forrester JV. Th1 and Th2 lymphocytes in autoimmune disease. *Crit Rev Immunol.* 2005;25:75–102. [PubMed] [Google Scholar]

Cunha JM, Carlini EA, Pereira AE, Ramos OL, Pimentel C, Gagliardi R, Sanvito WL, Lander N, Mechoulam R. Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. *Pharmacology.* 1980;21:175–185. [PubMed] [Google Scholar]

Elenkov IJ, Iezzoni DG, Daly A, Harris AG, Chrousos GP. Cytokine dysregulation, inflammation and well-being. *Neuroimmunomodulation.* 2005;12:255–69. [PubMed] [Google Scholar]

Gaoni Y, Mechoulam R. The isolation and structure of Δ^1 -THC and other neutral cannabinoids from hashish. *J Am Chem Soc.* 1971;93:217–224. [PubMed] [Google Scholar]

Gelfand EV, Cannon CP. Rimonabant: a cannabinoid receptor type 1 blocker for management of multiple cardiometabolic risk factors. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:1919–1926. [PubMed] [Google Scholar]

Grden M, Podgorska M, Szutowicz A, Pawelczyk T. Altered expression of adenosine receptors in heart of diabetic rat. *J Physiol Pharmacol.* 2005;56:587–597. [PubMed] [Google Scholar]

Gross DJ, Weiss L, Reibstein I, Van den Brand J, Okamoto H, Clark A. Amelioration of diabetes in nonobese diabetic mice with advanced disease by linomide-induced immunoregulation combined with Reg protein treatment. *Endocrinology.* 1998;139(5):2369–74. [PubMed] [Google Scholar]

Ji YH, Weiss L, Zeira Abdul-Hai AM, Har-Noy M, Slavin S. Allogeneic cell-mediated immunotherapy of leukemia with immune donor lymphocytes to upregulate antitumor effects and downregulate antihost responses. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32:495–504. [PubMed] [Google Scholar]

Juan-Pico P, Fuentes E, Bermudes-Silva FJ, Javier Diaz-Molina F, Ripoll C, Rodriguez de Fonseca F, Nadal A. Cannabinoid receptors regulate Ca^{2+} signals and insulin secretion in pancreatic β -cells. *Cell Calcium.* 2006;39:155–162. [PubMed] [Google Scholar]

Kai N, Motojima K, Tsunoda T, Kanematsu T. Prevention of insulinitis and diabetes in nonobese diabetic mice by administration of FK506. *Transplantation*. 1993;55:936–940. [PubMed] [Google Scholar]

Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG, Mathieu C, Kaufman L, Hale G, Gorus F, Goldman M, Walter M, Candon S, Schandene L, Crenier L, De Block C, Seigneurin JM, De Pauw P, Pierard D, Weets I, Rebello P, Bird P, Berrie E, Frewin M, Waldmann H, Bach JF, Pipeleers D, Chatenoud L. Insulin needs after CD3 antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2005;352:2598–2608. [PubMed] [Google Scholar]

Malfait AM, Gallily R, Sumariwalla PF, Malik AS, Andreakos E, Mechoulam R, Feldmann M. The non-psychoactive cannabis-constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2000;97:9561–9566. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

Mandrup-Poulsen T. Beta cell death and protection. *Ann NY Acad Sci*. 2003;1005:32–42. [PubMed] [Google Scholar]

Mueller R, Krahl T, Sarvetnick N. Pancreatic expression of interleukin-4 abrogates insulinitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med*. 1996;184:1093–1099. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Sorensen O, Bleackley RC, Power RF, Rajotte RV. Combined therapy with interleukin-4 and interleukin-10 inhibits autoimmune diabetes recurrence in syngeneic islet-transplanted nonobese diabetic mice. Analysis of cytokine mRNA expression in the graft. *Transplantation*. 1995;60:368–374. [PubMed] [Google Scholar]

Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Sorensen O. Interleukin 12 mRNA expression in islets correlates with beta-cell destruction in NOD mice. *J Autoimmun*. 1996;9:645–651. [PubMed] [Google Scholar]

Rapoport MJ, Jaramillo A, Zipris D, Lazarus AH, Serreze DV, Leiter EH, Cyopick P, Danska JS, Delovitch TL. Interleukin 4 reverses T-cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med*. 1993;178:87–99. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, Metzger M, Cohen IR. Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet*. 2001;358:1749–1753. [PubMed] [Google Scholar]

Rothe H, Burkart V, Faust A, Kolb H. Interleukin-12 gene expression is associated with rapid development of diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Diabetologia*. 1996;39:119–122. [PubMed] [Google Scholar]

Shi Q, Wang D, Hadley GA, Farber DL, Bartlett ST. Abrogation of recurrent autoimmunity in the NOD mouse: A critical role for host interleukin 4. *Surgery*. 2006;140:281–288. [PubMed] [Google Scholar]

Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB(1) and CB(2) receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol*. 2007;150:613–623. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

Thong FS, Graham TE. The putative roles of adenosine in insulin- and exercise-mediated regulation of glucose transport and glycogen metabolism in skeletal muscle. *Can J Appl Physiol*. 2002;27:152–178. [PubMed] [Google Scholar]

Tominaga Y, Nagata M, Yasuda H, Okamoto N, Arisawa K, Moriyama H, Miki M, Yokono K, Kasuga M. Administration of IL-4 prevents autoimmune diabetes but enhances pancreatic insulinitis in NOD mice. *Clin Immunol Immunopathol.* 1998;86:209–218. [PubMed] [Google Scholar]

Trembleau S, Penna G, Bosi E, Mortara A, Gately MK, Adorini L. Interleukin 12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice. *J Exp Med.* 1995;81:817–821. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:251–276. [PubMed] [Google Scholar]

Verma ND, Boyd R, Robinson C, Plain KM, Tran GT, Hall BM. Interleukin-12p70 prolongs allograft survival by induction of interferon gamma and nitric oxide production. *Transplantation.* 2006;82:1324–1333. [PubMed] [Google Scholar]

Weiss L, Zeira M, Reich S, Har-Noy M, Mechoulam R, Slavin S, Gallily R. Cannabidiol lowers incidence of diabetes in non-obese diabetic mice. *Autoimmunity.* 2006;39:143–151. [PubMed] [Google Scholar]