

## Evaluation of Percentage of Interferon-Gamma Secreting T Helper Cells and Expression of Related Genes in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

Vida Sheikh<sup>1</sup> , Mirhamed Hoseini Aghdam<sup>2</sup>, Mahdi Behzad<sup>3,\*</sup> 

<sup>1</sup> Assistant Professor, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

<sup>2</sup> MSc in Immunology, Department of Immunology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

<sup>3</sup> Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

\* **Corresponding Author:** Mahdi Behzad, Department of Immunology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. Email: mhd.behzad@yahoo.com

### Abstract

**Received:** 25.08.2020

**Accepted:** 09.11.2020

#### How to Cite this Article:

Sheikh V, Hoseini Aghdam M, Behzad M. Evaluation of Percentage of Interferon-Gamma Secreting T Helper Cells and Expression of Related Genes in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Avicenna J Clin Med.* 2020; 27(3): 140-148. DOI: 10.29252/ajcm.27.3.140

**Background and Objective:** The alterations of the adaptive immune system are involved in type 2 diabetes mellitus (T2DM) pathogenesis. T helper 1 (Th1) cells or CD4<sup>+</sup> T cells are the pro-inflammatory components of adaptive immunity with the main feature of interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) secretion. The aim of this study was to evaluate the percentage of IFN- $\gamma$ , assess the expression of related-genes in CD4<sup>+</sup> T cells, including T-bet, IRF1, RUNX3, and NF $\kappa$ B, and determine the correlation between them and clinical parameters in T2DM patients.

**Materials and Methods:** In this case-control study, peripheral blood CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from 40 patients and 40 healthy controls (HCs). The percentage of IFN- $\gamma$  secreting CD4<sup>+</sup> T cells was assessed using flow cytometry, and the related-genes were evaluated using real-time polymerase chain reaction.

**Results:** The percentage of IFN- $\gamma$  secreting CD4<sup>+</sup> T cells significantly increased in the patients in comparison to that of the HCs (P<0.001). The expression levels of IRF1 and NF $\kappa$ B were higher in the patients in comparison to those of the HCs (P=0.02 and P<0.001, respectively). A significant positive correlation between IFN- $\gamma$  secreting CD4<sup>+</sup> T cells and both IRF1 and NF $\kappa$ B was observed in the patients (P=0.001 and P=0.002, respectively). There was a significant positive correlation between IFN- $\gamma$  secreting CD4<sup>+</sup> T cells, IRF1, and NF $\kappa$ B with fasting plasma glucose and hemoglobin A1c in the patients (P<0.001).

**Conclusion:** Due to the increased response of Th1 cells (the production of IFN- $\gamma$  and expression of related genes) in the patients and existing correlation between them and plasma glucose level, it seems that these inflammatory factors are involved in T2DM pathogenesis, and the use of IFN- $\gamma$  pathway antagonists could be considered a novel therapeutic approach.

**Keywords:** Diabetes Mellitus Type 2, Interferon-Gamma, Transcription Factors

## بررسی درصد سلول‌های T کمکی ترشح‌کننده اینترفرون گاما و بیان ژن‌های مرتبط در بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع ۲

ویدا شیخ<sup>۱</sup> ID، میرحامد حسینی اقدام<sup>۲</sup>، مهدی بهزاد<sup>۳\*</sup> ID

<sup>۱</sup> استادیار، گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

<sup>۲</sup> کارشناس ارشد ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

<sup>۳</sup> دانشیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

\* نویسنده مسئول: مهدی بهزاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

ایمیل: mhd.behzad@yahoo.com

### چکیده

**سابقه و هدف:** در پاتوژنز دیابت شیرین نوع دو (T2DM: Type 2 Diabetes Mellitus) تغییرات سیستم ایمنی اکتسابی دخیل است. سلول‌های T کمکی ۱ (Th1: T helper 1) یا سلول‌های CD4<sup>+</sup> T از اجزای ایمنی اکتسابی هستند که مهم‌ترین مشخصه آن‌ها ترشح اینترفرون گاما (IFN- $\gamma$ ) می‌باشد. مهم‌ترین اجزای ایمنی اکتسابی هستند که ویژگی آن‌ها ترشح اینترفرون گاما (IFN- $\gamma$ ) است. مطالعه حاضر با هدف بررسی درصد IFN- $\gamma$ ، ارزیابی ژن‌های T-bet، IRF1، RUNX3 و NF $\kappa$ B در سلول‌های CD4<sup>+</sup> T و تعیین همبستگی بین آن‌ها و پارامترهای کلینیکی در بیماران انجام گرفته است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مورد-شاهدی، سلول‌های CD4<sup>+</sup> T خون محیطی از ۴۰ بیمار و ۴۰ فرد سالم (کنترل) جداسازی شد. درصد سلول‌های CD4<sup>+</sup> T ترشح‌کننده IFN- $\gamma$  با استفاده از فلوسایتومتری و بیان ژن‌های مربوطه با استفاده از Real-time PCR سنجش شد.

**یافته‌ها:** درصد سلول‌های CD4<sup>+</sup> T ترشح‌کننده IFN- $\gamma$  در بیماران نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری نشان داد ( $P < 0/001$ ). میزان بیان ژن‌های IRF1 و NF $\kappa$ B در بیماران بیشتر از گروه کنترل بود (به ترتیب  $P = 0/02$  و  $P < 0/001$ ). همبستگی مثبت معناداری بین سلول‌های CD4<sup>+</sup> T ترشح‌کننده IFN- $\gamma$  و ژن‌های IRF1 و NF $\kappa$ B در بیماران مشاهده شد (به ترتیب  $P = 0/001$  و  $P = 0/002$ ). همبستگی مثبت معناداری بین سلول‌های CD4<sup>+</sup> T ترشح‌کننده IFN- $\gamma$  و همچنین IRF1 و NF $\kappa$ B با قند خون و هموگلوبین A1c در بیماران دیده شد ( $P < 0/001$ ).

**نتیجه‌گیری:** با افزایش پاسخ Th1 (تولید IFN- $\gamma$  و بیان ژن‌های مرتبط) و وجود همبستگی با قند خون، به نظر می‌رسد این عوامل التهابی در پاتوژنز بیماری نقش دارند و استفاده از آنتاگونیست مسیر IFN- $\gamma$  می‌تواند به‌عنوان راهکار درمانی مطرح شود.

**واژگان کلیدی:** اینترفرون گاما، دیابت شیرین نوع ۲، فاکتورهای نسخه‌برداری

### مقدمه

بیماری دیابت شیرین نوع دو (T2DM: Type 2 Diabetes Mellitus) با اختلال در ترشح و مقاومت به انسولین و افزایش میزان گلوکز خون مشخص می‌شود [۱]. سیتوکاین‌ها خانواده‌ای از پروتئین‌های محلول خون محیطی هستند که شامل اینترفرون‌ها (IFN: Interferon)، اینترلوکین‌ها (IL: Interleukin) و کموکاین‌ها هستند. این پروتئین‌ها با اتصال به گیرنده خود در سطح سلول و انتقال سیگنال داخل سلولی، سبب تنظیم عملکرد و تمایز سلول‌ها می‌شوند [۲]. سلول‌های T کمکی

بیماری دیابت شیرین نوع دو (T2DM: Type 2 Diabetes Mellitus) با اختلال در ترشح و مقاومت به انسولین و افزایش میزان گلوکز خون مشخص می‌شود [۱]. سیتوکاین‌ها خانواده‌ای از پروتئین‌های محلول خون محیطی هستند که شامل اینترفرون‌ها (IFN: Interferon)، اینترلوکین‌ها (IL: Interleukin) و کموکاین‌ها هستند. این پروتئین‌ها با اتصال به گیرنده خود در سطح سلول و انتقال سیگنال داخل سلولی، سبب تنظیم عملکرد و تمایز سلول‌ها می‌شوند [۲]. سلول‌های T کمکی

شیرین نوع دو که هنوز شروع به دریافت دارو نکرده بودند و ۴۰ فرد سالم به عنوان گروه کنترل (HCs: Healthy controls) پس از معاینه و تأیید پزشک بر اساس معیارهای انجمن دیابت آمریکا (American Diabetes Association) در سال ۲۰۱۹ از بیمارستان شهید بهشتی دانشگاه علوم پزشکی همدان وارد مطالعه شدند.

معیارهای ورود بیماران عبارت بود از: ۱. قند ناشتای پلاسما (FPG: Fasting Blood Glucose) مساوی یا بیشتر از ۱۲۶ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر؛ ۲. شاخص هموگلوبین A1c (HbA1c) بیشتر از ۶/۵ درصد؛ ۳. نداشتن بیماری‌های خودایمنی، آلرژی، نئوپلازی خونی-بافتی و پانکراتیت.

معیارهای خروج بیماران عبارت بود از: ۱. مصرف داروهای ضد دیابت، استروئیدها و انسولین؛ ۲. سن کمتر از ۱۸ سال و بیشتر از ۶۰ سال؛ ۳. شاخص HbA1c بیشتر از ۹ درصد؛ ۴. مصرف مداوم سیگار و الکل؛ ۵. بیماران دارای علائم نفروپاتی، رتینوپاتی و نوروپاتی و ۶. مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و استاتین‌ها در ۶ ماه اخیر. افراد سالم نیز در صورت نداشتن انواع بیماری‌های دیابت، خودایمنی، آلرژی نئوپلازی، اختلالات مزمن دیگر و همچنین مصرف نکردن سیگار، الکل و دارو وارد مطالعه شدند. از لحاظ سن و جنس تا حد ممکن بین دو گروه همسان‌سازی انجام شد (اطلاعات پایه افراد در بخش نتایج آورده شده است).

### خون‌گیری و استخراج سلول‌ها

از افراد شرکت‌کننده در این مطالعه به مقدار ۱۰ میلی‌لیتر خون وریدی در لوله‌های استریل حاوی ماده ضد انعقاد EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) گرفته شد. سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMCs: Peripheral Blood Mononuclear Cell) به روش فایکول با استفاده از پروتکل استاندارد آن جداسازی شد [۲۰]. به‌طور خلاصه، خون به نسبت مساوی ۱:۱ با بافر استریل (Phosphate Buffered Saline) رقیق و به نسبت ۱:۳ روی فایکول استریل (Sigma, Germany) منتقل شد. پس از انجام سانتریفیوژ (۲۵ دقیقه، ۲۲۰۰ دور در دقیقه)، سلول‌های تک‌هسته‌ای جداسازی شد و در محیط کشت سلولی RPMI 1640 حاوی ترکیبات L-glutamin با دز ۲۰۰ میلی‌مولار، Fetal Bovine Serum و Penicilin با دز ۱۰ هزار واحد بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین با دز ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نگهداری شد. تمام ترکیبات محیط کشت سلولی از شرکت Biosera کشور فرانسه خریداری شد. از رنگ تریپان بلو برای شمارش و تعیین زنده بودن سلول‌ها زیر میکروسکوپ نوری استفاده شد. در مرحله بعد، سلول‌های CD4<sup>+</sup> با استفاده از تکنیک جداسازی سلول به روش بیدهای مغناطیسی فعال‌شده (MACS: Magnetic Activated Cell Sorting) و با انتخاب مثبت با استفاده از پروتکل مربوطه جداسازی شد. بدین منظور، میکروبیدهای

سلول‌های Th1 با ترشح سایتوکاین پیش‌تهایی اینترفرون گاما (IFN- $\gamma$ ) شناسایی می‌شوند [۶]. اتصال IFN- $\gamma$  محلول خون محیطی به گیرنده آن (IFN- $\gamma$ R) در سطح سلول‌های Th1 سبب فعال شدن برخی از فاکتورهای نسخه‌برداری شامل T-bet (T-box transcription factor), RUNX3 (Runt-related transcription factor 3), IRF1 (Interferon regulatory factor-1) و NF $\kappa$ B (Nuclear factor kappa B) می‌شود که با مکانیسم‌های زیر در تنظیم ترشح IFN- $\gamma$  دخیل هستند [۷]. اتصال IFN- $\gamma$  به گیرنده خود سبب فعال‌سازی ژن‌های T-bet و RUNX3 می‌شود که با اتصال این فاکتورها به پروموتور IFN- $\gamma$  اثر مضاعفی در افزایش ترشح آن دارند [۸]. از طرف دیگر، این اتصال منجر به فعال شدن IRF1 می‌شود که سبب ترشح کموکاین‌های التهابی CXCL9, 10, 11 می‌شود. این کموکاین‌ها با تحریک سلول‌های Th1 سبب ترشح بیشتر IFN- $\gamma$  می‌شود [۹]. همچنین اتصال IFN- $\gamma$  به گیرنده خود سبب فعال‌سازی NF $\kappa$ B می‌شود. این فاکتور با فعال کردن IRF1, RUNX3 و کموکاین‌های التهابی، منجر به افزایش ترشح IFN- $\gamma$  می‌شود [۱۰].

برقراری تعادل بین ترشح پارامترهای التهابی و ضدالتهابی به‌منظور ایجاد هموستاز و جلوگیری از واکنش بیش‌ازحد سیستم ایمنی بسیار اهمیت دارد [۱۱]. یافته‌های تحقیقات پیشین بیانگر آن است که ترشح بیش از اندازه فاکتورهای التهابی در شکل‌گیری بیماری دیابت نقش اساسی دارد؛ مثلاً سطح سرمی (C-Reactive Protein) CRP، IL-6، TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor-alpha) در بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع دو نسبت به افراد سالم افزایش یافته است [۱۲، ۱۳]. علاوه بر این، سطح IFN- $\gamma$  و IL-17 ترشح‌شده توسط سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در محیط کشت سلولی تحریک‌شده با میتوز و همچنین سطح سرمی آن‌ها در بیماران افزایش زیادی یافته است [۱۴، ۱۵]. از سوی دیگر، تغییرات برخی از ژن‌های مرتبط با IFN- $\gamma$  از جمله T-bet, IRF1 و RUNX3 در بیماری‌های دیگر مانند لوپوس اریتماتوز سیستمیک، سلپاک، مالتیپل اسکلروزیس و همچنین سرطان روده گزارش شده است [۱۶-۱۹].

با در نظر گرفتن مطالعات پیشین، اطلاعات اندکی در رابطه با تغییرات IFN- $\gamma$  و ژن‌های مرتبط با آن در بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع دو وجود دارد. مطالعه حاضر با هدف تعیین درصد سلول‌های CD4<sup>+</sup> T ترشح‌کننده IFN- $\gamma$  به‌عنوان منبع اصلی ترشح این سایتوکاین، ارزیابی بیان ژن‌های اساسی در تنظیم ترشح آن (T-bet, IRF1, RUNX3 و NF $\kappa$ B) و همچنین بررسی همبستگی بین آن‌ها و پارامترهای کلینیکی در بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع دو انجام گرفته است.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورد-شاهدی، ۴۰ بیمار مبتلا به دیابت

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای استفاده شده

نام ژن	پرایمر پیشرو (Forward) 5' to 3'	پرایمر معکوس (Reverse) 5' to 3'	Accession number	منبع
T-bet	CACCTGTTGTGGTCCAAGTTTA	GGCCACAGTAAATGACAGGAAT	NM_013351.2	[۱۵]
IRF1	CAAGCATGGCTGGGACATCA	TGCTTTGTATCGGCCTGTGT	NM_002198.3	[۱۸]
RUNX3	TCTGTAAGGCCCAAAGTGGGTA	ACCTCAGCATGACAATATGTCA CAA	NM_001031680. 2	[۲۱]
NFκB	TCAGACGCCATCTATGACAGTA AAG	CTGGATGTCATCTTTCTGAACTT TG	NM_003998.4	[۲۲]

پروتکل شرکت سازنده انجام شد. سپس بیان ژنهای T-bet، IRF1، RUNX3 و NFκB با تکنیک Real-time PCR و SYBR green (Ampliqon, Denmark) استفاده از محلول واکنش حاوی SYBR green (Ampliqon, Denmark) طبق این مراحل بررسی شد: مرحله فعال سازی اولیه آنزیم (۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه)، مرحله دناتوراسیون (۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه)، مرحله دمای اتصال پرایمرها (۶۱ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه) و مرحله گسترش (۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه).

GAPDH به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته و بیان نسبی ژن‌ها با فرمول  $2^{-\Delta Cq}$  (target gene - Cq)  $\Delta Cq = Cq$  (reference gene) ارزیابی شد [۲۰]. مشخصات پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه در جدول ۱ آورده شده است.

به منظور بررسی توزیع پراکندگی داده‌ها از آزمون آماری شاپیرو-ویلک استفاده شد. مقایسه گروه‌های مطالعه شده با آزمون آماری تی انجام شد. از آزمون همبستگی پیرسون برای مقایسه ارتباط بین متغیرها استفاده شد. برای تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ و برای رسم نمودارها از نرم افزار Graph Pad Prism نسخه ۶/۰۷ استفاده شد. سطح معناداری کمتر از ۰/۵ در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

مشخصات کلینیکی و دموگرافیک گروه‌های مطالعه شده در جدول ۲ نشان داده شده است. میزان قند ناشتای پلاسما و درصد HbA1c در گروه بیمار نسبت به افراد سالم افزایش معناداری داشت ( $P < 0.001$ ). از نظر پارامترهای جنسیت، سن، شاخص توده بدنی، GFR، کراتینین سرم و آلومینوری بین گروه‌های مطالعه شده تفاوت معناداری وجود نداشت.

### استراتژی گیت کردن و مقایسه درصد سلول‌های CD4<sup>+</sup> T ترشح کننده IFN-γ در بیماران مبتلابه دیابت شیرین نوع دو و HCs

استراتژی گیت کردن IFN-γ در سلول‌های CD4<sup>+</sup> T در یک فرد بیمار و یک فرد سالم در شکل ۱ A آورده شده است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد درصد سلول‌های CD4<sup>+</sup> T ترشح کننده IFN-γ به دنبال تحریک در بیماران مبتلابه دیابت شیرین نوع دو در مقایسه با افراد سالم به طور معناداری افزایش

CD4<sup>+</sup> به مدت ۳۰ دقیقه با PBMCs انکوبه شد. سپس این سوسپانسیون سلولی از ستون‌های MACS عبور داده و سلول‌های CD4<sup>+</sup> نشان دار متصل به دیواره ستون، با شست و شو با مقدار مناسبی از بافر از ستون جدا شدند و در محیط کشت سلولی نگهداری شد. میزان خلوص سلول‌های CD4<sup>+</sup> T استخراج شده از هر نمونه با تکنیک فلوسایتومتری بیشتر از ۹۰ درصد ارزیابی شد.

### رنگ آمیزی داخل سلولی IFN-γ

به منظور بررسی پروتئین داخل سلولی IFN-γ، سلول‌های T CD4<sup>+</sup> جداسازی شده در حضور محرک‌های اینومایسین (۱۰ μg/ml، AdipoGen، USA Santa Cruz، ۲/۵)، PMA (۲۵ μg/ml، eBioscience، USA) و برفلدین (۱۰ μg/ml، USA) به مدت ۵ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ CO<sub>2</sub> درصد تحریک شدند. رنگ آمیزی سطح سلولی با استفاده از Anti-human CD4 کونژوگه با FITC (BD، USA) انجام شد و سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند و سپس در مجاورت محلول فیکساسیون قرار گرفتند. سپس با استفاده از بافر Permeabilization (BD، USA)، سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه نفوذپذیر شدند. در مرحله بعد، رنگ آمیزی داخلی سلولی با Anti-human IFN-γ کونژوگه با PE (BD، USA) انجام شد و پس از پایان دوره ۱ ساعته انکوباسیون، خوانش سلول‌ها به وسیله دستگاه فلوسایتومتری (Attune NxT، Life Technology، USA) انجام شد. برای تعیین دژ محرک‌های استفاده شده و مراحل رنگ آمیزی داخل سلولی از پروتکل استاندارد داخل کیت استفاده شد.

### اندازه گیری بیان ژن

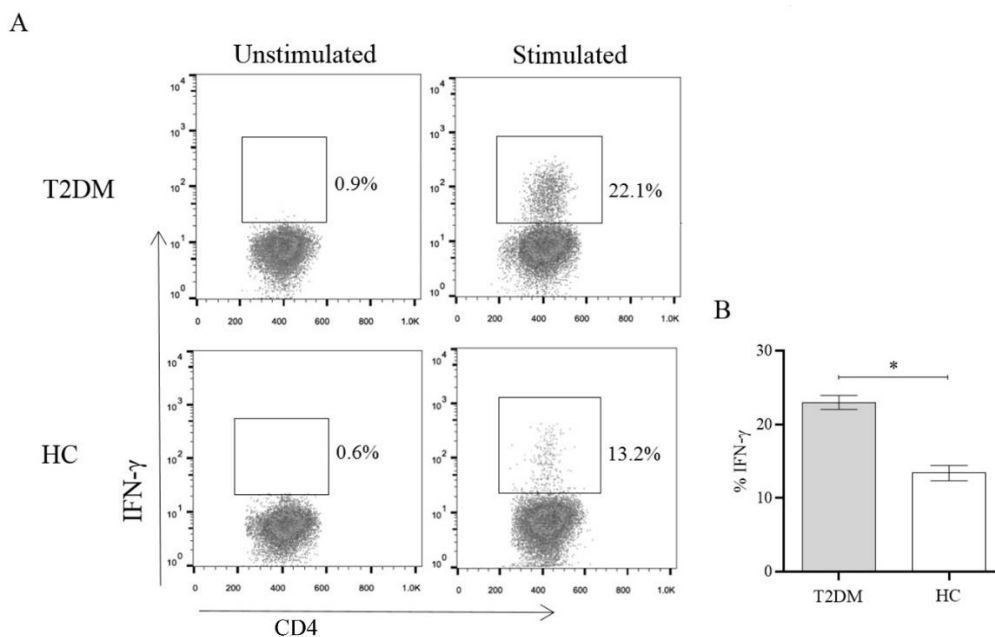
در ابتدا RNA تام سلولی از سلول‌های CD4<sup>+</sup> T به وسیله کیت استخراج RNA بر اساس پروتکل‌های شرکت سازنده (Qiagen، USA) جداسازی شد. برای اطمینان از صحت کار و غلظت مناسب RNA، با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر نانودراپ (Thermo-Scientific، USA) و در جذب نوری OD260/OD280 غلظت آن اندازه گیری شد که در محدوده نرمال (بالای ۱/۸) برای سنتز cDNA قرار داشت. در مرحله بعد، تولید cDNA با کیت سنتز آن (Takara، Japan) بر اساس

جدول ۲: مشخصات کلینیکی گروه‌های مطالعه‌شده

سطح معناداری	گروه بیمار	افراد سالم	
NS	۱۲ به ۲۸	۱۴ به ۲۶	جنسیت (زن به مرد)
NS	۴۹/۲۵ ± ۵/۷۸	۵۱/۲۲ ± ۷/۸۳	سن
NS	۲۵/۶۱ ± ۲/۴۳	۲۴/۶۰ ± ۳/۳۲	شاخص توده بدنی (کیلوگرم بر مترمربع)
<۰/۰۰۱	۱۷۴/۹۵ ± ۴۰/۴۵	۸۷/۹۷ ± ۸/۷۸	قند ناشتای پلاسما (میلی گرم بر دسی لیتر)
<۰/۰۰۱	۷/۴۱ ± ۰/۷۱	۴/۹۵ ± ۰/۶۵	HbA1c (درصد)
NS	۷۸/۸۵ ± ۱۱/۸۴	۷۵/۷۰ ± ۱۲/۵۵	GFR (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )
NS	۰/۹۱ ± ۰/۱۲	۰/۹۴ ± ۰/۱۳	کراتینین سرم (میلی گرم بر دسی لیتر)
NS	۱۷/۶۴ ± ۶/۶۸	۱۹/۰۷ ± ۶/۶۲	آلبومینوری (mg/24 hours)

مقادیر برحسب میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.

HbA1c: Hemoglobin A1c; GFR: Glomerular filtration rate; NS: Not Significant.



شکل ۱: مقایسه درصد سلول‌های CD4<sup>+</sup> T ترشح‌کننده IFN-γ در بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع دو و HCs

(A) نحوه گیت کردن و میزان درصد سلول‌های CD4<sup>+</sup> T ترشح‌کننده IFN-γ در حالت بدون تحریک (Unstimulated) و تحریک شده (Stimulated) در یک فرد بیمار و یک فرد سالم؛ (B) مقایسه درصد سلول‌های CD4<sup>+</sup> T ترشح‌کننده IFN-γ بعد از تحریک در بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع دو (n=۴۰) و افراد گروه کنترل (n=۴۰)

\*P<۰/۰۰۱

و افراد سالم مشاهده نشد (شکل ۲ B و ۲ D).

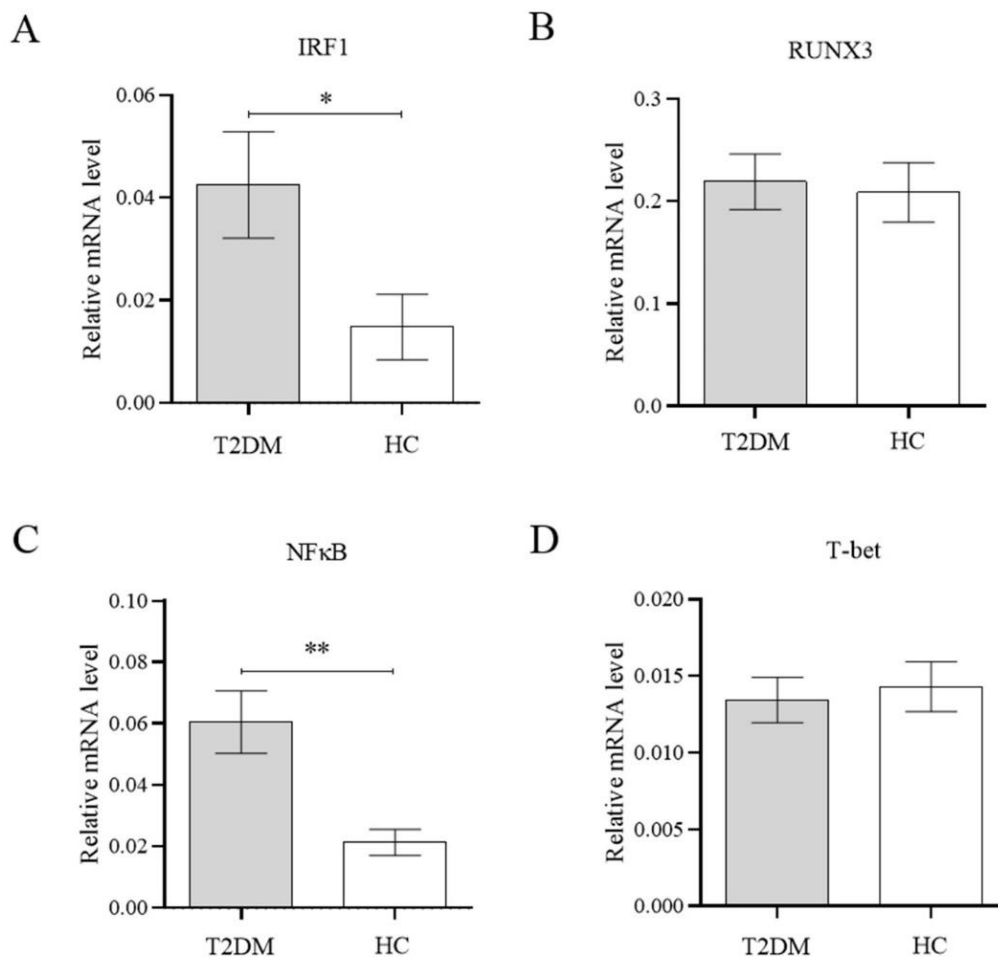
یافته است (شکل ۱ B) (P<۰/۰۰۱).

#### بررسی همبستگی درصد سلول‌های CD4<sup>+</sup> T ترشح‌کننده IFN-γ با ژن‌های مرتبط و پارامترهای کلینیکی

همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، نتایج این تحقیق حاکی از آن است که بین درصد سلول‌های CD4<sup>+</sup> T ترشح‌کننده IFN-γ با بیان ژن‌های IRF1 و NFκB همبستگی مثبت معناداری وجود دارد (P=۰/۰۰۱، P=۰/۰۰۲). علاوه بر این، همبستگی مثبت معناداری میان درصد سلول‌های CD4<sup>+</sup> T ترشح‌کننده IFN-γ با پارامترهای FPG و HbA1c در بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع دو مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). در بین

#### مقایسه بیان ژن‌های IRF1، RUNX3، NFκB و T-bet در بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع دو و HCs

به دلیل تغییراتی مشاهده شده در درصد سلول‌های CD4<sup>+</sup> T ترشح‌کننده IFN-γ، بیان ژن‌های مرتبط با آن ارزیابی شد. یافته‌های این مطالعه نشان داد میزان بیان ژن‌های IRF1 (شکل ۲ A، P=۰/۰۰۲) و NFκB (شکل ۲ C، P<۰/۰۰۱) در بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع دو نسبت به افراد کنترل افزایش معناداری یافته است. تفاوت معناداری در بیان ژن‌های T-bet و RUNX3 بین بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع دو



شکل ۲: میزان بیان ژن‌های IRF1, RUNX3, NFκB و T-bet

در ابتدا RNA تام از سلول‌های CD4<sup>+</sup> T (A) IRF1 (B) RUNX3 (C) NFκB و (D) T-bet در بیماران مبتلابه دیابت شیرین نوع دو و HCs مقایسه شده است.

\*P=0/02; \*\*P<0/001

جدول ۳: بررسی همبستگی بین متغیرهای مطالعه شده

بیماران						
IFN-γ percentage	T-bet	RUNX3	NFκB	IRF1	r value	IFN-γ percentage
-	0,132	0,190	0,839	0,723		
-	0,418	0,240	0,002	0,001	p value	
0,930	-0,127	0,181	0,967	0,0894	r value	FPG
< 0,001	0,436	0,264	< 0,001	< 0,001	p value	
0,915	-0,091	0,228	0,957	0,860	r value	HbA1c
< 0,001	0,576	0,156	< 0,001	< 0,001	p value	
افراد سالم						
IFN-γ percentage	T-bet	RUNX3	NFκB	IRF1	r value	IFN-γ percentage
1	-0,102	-0,101	-0,002	0,074		
-	0,532	0,534	0,988	0,649	p value	
-0,089	-0,050	-0,076	-0,014	0,064	r value	FPG
0,587	0,757	0,643	0,933	0,696	p value	
-0,007	-0,019	0,230	-0,050	0,228	r value	HbA1c
0,965	0,907	0,153	0,757	0,158	p value	

Th1 RUNX3 سبب تنظیم ترشح  $\text{IFN-}\gamma$  در سلول‌های Th1 می‌شود [۷].

در این راستا، تغییرات  $\text{IFN-}\gamma$  و ژن‌های مرتبط با آن در پاتوژنز برخی بیماری‌های خودایمنی و سرطانی دخیل است. به‌عنوان نمونه، در مطالعه‌ای که Manman Liu و همکارانش در سال ۲۰۱۸ انجام دادند، درصد  $\text{IFN-}\gamma$  و میزان بیان ژن‌های  $\text{IFN-}\gamma$  و IRF1 در سلول‌های T خون محیطی بیماران لوپوس اریتماتوز سیستمیک نسبت به افراد سالم افزایش زیادی را نشان داد [۱۸]. نتایج مطالعه Virginia M. Salvati و همکارانش در سال ۲۰۰۳ بیانگر آن بود که میزان بیان پروتئینی و ژنی IRF1 به دنبال تحریک با پروتئین نو ترکیب انسانی  $\text{IFN-}\gamma$  در سلول‌های Th1 لامینا پروپریای مخاط بیماران سلیاک در مقایسه با افراد سالم افزایش یافته است [۱۹].

در تحقیقی دیگر در سال ۲۰۰۶، Giovanni Frisullo و همکارانش به این نتیجه رسیدند که درصد T-bet در سلول‌های  $\text{CD4}^+$  T و سطح بیان  $\text{IFN-}\gamma$  در محیط کشت سلولی در اثر تحریک با محرک میتوز در لنفوسیت‌های خون محیطی بیماران مالتیپل اسکلروزیس در مقایسه با افراد سالم افزایش یافته است [۱۶]. در مقابل، یافته‌های مطالعه Yazhen Li و همکارانش در سال ۲۰۱۴ بیانگر کاهش بیان سرمی و ژنی  $\text{IFN-}\gamma$  و همچنین بیان ژن‌های RUNX3 و T-bet در لنفوسیت‌های خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان روده نسبت به افراد سالم است. همچنین همبستگی مثبت معناداری میان  $\text{IFN-}\gamma$  با بیان RUNX3 و T-bet در این بیماران وجود داشت [۱۷].

در این مطالعه بیان ژن‌های T-bet، IRF1، RUNX3 و NFκB به‌طور اختصاصی در سلول‌های  $\text{CD4}^+$  T بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع دو ارزیابی شد. یافته‌های این تحقیق بیانگر افزایش میزان بیان ژن‌های IRF1 و NFκB در سلول‌های  $\text{CD4}^+$  T بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع دو نسبت به افراد سالم است. همچنین همبستگی مثبت معناداری بین بیان این ژن‌ها با درصد سلول‌های  $\text{CD4}^+$  T ترشح‌کننده  $\text{IFN-}\gamma$  در بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع دو وجود دارد. از طرف دیگر، بررسی پارامترهای کلینیکی افراد حاکی از آن است که درصد سلول‌های  $\text{CD4}^+$  T ترشح‌کننده  $\text{IFN-}\gamma$  و بیان ژن‌های IRF1 و NFκB همبستگی مثبت معناداری با پارامترهای FPG و HbA1c در بیماران دارد. افزایش تولید  $\text{IFN-}\gamma$  و بیان ژن‌های IRF1 و NFκB در سلول‌های Th1 و همچنین وجود همبستگی بین این فاکتورهای التهابی با معیارهای قند خون و هموگلوبین A1c بیماران بیانگر آن است که  $\text{IFN-}\gamma$  و ژن‌های مرتبط منجر به شکل‌گیری پاسخ‌های التهابی در بیماران می‌شود که این شرایط التهابی ممکن است به‌صورت مستقیم یا غیرمستقیم با تأثیر بر سلول‌های خونی و شاید سلول‌های بتای پانکراس، سبب افزایش قند خون این افراد و ایجاد مقاومت انسولینی در آن‌ها شود که در مطالعات آینده می‌توانند بیشتر مورد توجه قرار گیرند.

بیماران میان بیان ژن‌های IRF1 و NFκB با پارامترهای FPG و HbA1c همبستگی مثبت معناداری وجود داشت ( $P < 0.001$ ). همبستگی معناداری بین درصد سلول‌های  $\text{CD4}^+$  T ترشح‌کننده  $\text{IFN-}\gamma$  با پارامترهای کلینیکی و ژن‌های مرتبط در افراد سالم وجود نداشت. همبستگی معناداری بین بیان ژن‌ها و پارامترهای کلینیکی سن، جنسیت، شاخص توده بدنی، کراتینین سرم، GFR و آلبومینوری مشاهده نشد.

## بحث

به‌منظور حفظ هموستاز پاسخ‌های سیستم ایمنی بدن، تنظیم ترشح سایتوکاین‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد [۲۳]. شواهد بیانگر آن است که دیابت نوع دو نوعی بیماری التهابی مزمن است که پاتوژنز آن با عدم تعادل در پاسخ‌های سیستم ایمنی و به دنبال آن ترشح بیش‌ازحد فاکتورهای التهابی در ارتباط است [۲۴].  $\text{IFN-}\gamma$  نوعی سایتوکاین پیش‌التهابی است که منبع اصلی ترشح آن سلول‌های Th1 است [۲۵]. یافته‌های مطالعات پیشین نشان داده‌اند ترشح فاکتورهای التهابی در بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع دو افزایش یافته است. به‌عنوان نمونه، مطالعه Madhumita و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان داد سطح بیان  $\text{IFN-}\gamma$  و IL-17 ترشح‌شده توسط PBMCs در محیط کشت سلولی تحریک‌شده با میتوز و همچنین سطح سرمی آن‌ها در بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع دو نسبت به افراد سالم افزایش یافته است [۱۴]. همچنین نتایج تحقیقات قبلی بیانگر افزایش سطح سرمی فاکتورهای پیش‌التهابی IL-6، TNF-α و CRP در بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع دو نسبت به افراد سالم است [۱۴، ۱۲].

با توجه به اینکه  $\text{IFN-}\gamma$  با پاتوژنز بیماری دیابت شیرین نوع دو در ارتباط است و اطلاعات اندکی در رابطه با آن موجود است، لذا در مطالعه حاضر به‌طور اختصاصی درصد سلول‌های  $\text{CD4}^+$  T ایزوله‌شده ترشح‌کننده  $\text{IFN-}\gamma$  و همچنین همبستگی آن با پارامترهای کلینیکی در بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع دو و افراد سالم بررسی شد. نتایج این تحقیق حاکی از آن است که درصد سلول‌های  $\text{CD4}^+$  T ترشح‌کننده  $\text{IFN-}\gamma$  در بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع دو نسبت به افراد سالم به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است. در ارتباط با مسیر سیگنال‌رسانی داخل سلولی، اتصال  $\text{IFN-}\gamma$  محلول خون محیطی به  $\text{IFN-}\gamma\text{R}$  در سلول‌های Th1 منجر به فعال‌سازی برخی از مهم‌ترین فاکتورهای نسخه‌برداری در تنظیم ترشح  $\text{IFN-}\gamma$  می‌شود. این اتصال به فعال‌سازی T-bet و RUNX3 منجر می‌شود که این دو فاکتور همراه با یکدیگر باعث ترشح بیشتر  $\text{IFN-}\gamma$  می‌شود. از طرف دیگر، این اتصال سبب فعال‌سازی IRF1 می‌شود که به‌طور غیرمستقیم با افزایش بیان کموکاین‌های تحریک‌کننده، منجر به ترشح بیشتر  $\text{IFN-}\gamma$  می‌شود. این واکنش همچنین سبب فعال‌سازی NFκB می‌شود که آن نیز با فعال‌کردن IRF1 و

التهابی مرتبط با آن و میزان قند خون را در بیماران کاهش داد. مطالعات تکمیلی نیازمند بررسی دقیق مکانیسم اختلال IFN- $\gamma$  و ژن‌های مرتبط در بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع دو هستند.

### تشکر و قدردانی

این مقاله از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی همدان با شماره ۹۹۰۷۲۹۵۳۷۳ گرفته شده است. از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه به‌منظور تأمین منابع مالی این پروژه تحقیقاتی تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از تمامی بیماران و افرادی که در این مطالعه علمی همکاری داشتند، قدردانی می‌کنیم.

### تضاد منافع

نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان در تعارض نیست.

### ملاحظات اخلاقی

این پروژه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان با کد اخلاق IR.UMSHA.REC.1399.566 تصویب شده و رضایت‌نامه آگاهانه از همه افراد شرکت‌کننده گرفته شده است.

### سهم نویسندگان

نویسنده اول (پژوهشگر همکار): معاینه بالینی، معرفی بیماران دیابتی، انجام تست‌های فلوسایتومتری و تست‌های اولیه پاراکلینیکی (۴۰ درصد)؛ نویسنده دوم (پژوهشگر همکار): انجام تست‌های ریل‌تایم و مشارکت در نگارش مقاله (۲۰ درصد)؛ نویسنده سوم (پژوهشگر اصلی): مسئول مکاتبات، طراحی پروژه، نظارت بر اجرای پروژه، انجام تحلیل‌های آماری، نگارش و ویرایش مقاله (۴۰ درصد).

### حمایت مالی

این مطالعه از سوی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان پشتیبانی مالی شده است.

از محدودیت‌های این مطالعه این بود که درصد IFN- $\gamma$  و بیان ژن‌های مرتبط آن در سلول‌های CD4<sup>+</sup> T ارزیابی شد که منبع اصلی ترشح IFN- $\gamma$  هستند. مطالعات آینده می‌توانند تغییرات IFN- $\gamma$  و ژن‌های مرتبط را در سایر رده‌های سلولی ترشح‌کننده آن مانند سلول‌های CD8<sup>+</sup> T و کشنده طبیعی بررسی کنند. در این تحقیق تغییرات IFN- $\gamma$  و ژن‌های مرتبط با آن در بیماران دیابتی بررسی شد که داروهای درمانی را دریافت نمی‌کردند. پیشنهاد می‌شود تأثیر داروهای ضد دیابتی مانند متفورمین، سیتاگلیپتین، امپاگلیفلوزین و همچنین دریافت انسولین و اثر آن روی پارامترهای بررسی‌شده در مطالعات بعدی مدنظر قرار گیرد.

علاوه بر این، در تحقیقات آینده بررسی تغییرات بیان IFN- $\gamma$  و ژن‌های مرتبط در بیماران با زیرگروه‌های مختلف بیماری مانند نفروپاتی دیابتی، رتینوپاتی دیابتی، نوروپاتی دیابتی و بیماری‌هایی که دارای علائم میکرو و ماکرو واسکولار هستند، می‌تواند مدنظر باشد. مطالعات آینده می‌تواند به‌منظور درک بهتر مکانیسم اختلال سلول‌های CD4<sup>+</sup> T، فاکتورهای نسخه‌برداری بیشتری را بررسی کند که در تنظیم فعال شدن مسیر سیگنال‌رسانی IFN- $\gamma$  دخیل هستند.

### نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعه حاضر حاکی از آن است که درصد سلول‌های CD4<sup>+</sup> T ترشح‌کننده IFN- $\gamma$  به‌عنوان مهم‌ترین سایتوکاین ترشحاتی سلول‌های Th1 و بیان دو ژن مرتبط با آن شامل IRF1 و NFkB در بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع دو افزایش داشته است. همچنین در بیماران افزایش پاسخ‌های التهابی مرتبط با سلول‌های Th1 با افزایش میزان قند خون همبستگی مثبتی را نشان داد. با توجه به نتایج این مطالعه، سلول‌های CD4<sup>+</sup> T ترشح‌کننده IFN- $\gamma$  و ژن‌های مرتبط با آن می‌توانند به‌عنوان نوعی رویکرد درمانی بالقوه در بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع دو مطرح شوند تا شاید بتوان با استفاده از آنتاگونیست IFN- $\gamma$  و مهارکننده‌های IRF1 و NFkB، پاسخ‌های

## REFERENCES

- Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):98-107. PMID: 2123385 DOI: 10.1038/nri2925
- Pawlak M, Ho AW, Kuchroo VK. Cytokines and transcription factors in the differentiation of CD4(+) T helper cell subsets and induction of tissue inflammation and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2020;67(2):57-67. PMID: 33039897 DOI: 10.1016/j.coi.2020.09.001
- Christie D, Zhu J. Transcriptional regulatory networks for CD4 T cell differentiation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014;381(1):125-72. PMID: 24839135 DOI: 10.1007/82-2014-372
- Borzouei S, Sheikh V, Ghasemi M, Zamani A. Anti-inflammatory effect of combined sitagliptin and vitamin D3 on cytokines profile in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Interferon Cytokine Res*. 2019;39(5):293-301. PMID: 30855208 DOI: 10.1089/jir.2018.0144
- Zhang C, Xiao C, Wang P, Xu W. The alteration of Th1/Th2/Th17/Treg paradigm in patients with type 2 diabetes mellitus: relationship with diabetic nephropathy. *Hum Immunol*. 2014;75(4):289-96. PMID: 24530745 DOI: 10.1016/j.humimm.2014.02.007
- Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*. 2015;74(1):5-17. PMID: 25458968 DOI: 10.1016/j.cyto.2014.09.011
- Fenimore J, Young HA. Regulation of IFN- $\gamma$  expression. *Adv Exp Med Biol*. 2016;941(1):1-19. PMID: 27734406 DOI: 10.1007/978-94-024-0921-5\_1
- Djuretic IM, Levanon D, Negreanu V, Groner Y, Rao A, Ansel KM. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol*. 2007;8(2):145-53. PMID: 17195845 DOI: 10.1038/ni1424
- Kirou KA, Lee C, George S, Louca K, Papagiannis IG, Peterson MG, et al. Coordinate overexpression of interferon-alpha-induced genes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004;50(12):3958-67. PMID: 15593221



- DOI: [10.1002/art.20798](https://doi.org/10.1002/art.20798)
10. Negishi H, Taniguchi T, Yanai H. The interferon (IFN) class of cytokines and the IFN regulatory factor (IRF) transcription factor family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018; **10**(11):258-78. PMID: [28963109](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28963109/) DOI: [10.1101/cshperspect.a028423](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028423)
  11. Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev.* 2014; **13**(6):668-77. PMID: [24418308](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24418308/) DOI: [10.1016/j.autrev.2013.12.004](https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.12.004)
  12. Qiao YC, Shen J, He L, Hong XZ, Tian F, Pan YH, et al. Changes of regulatory T cells and of proinflammatory and immunosuppressive cytokines in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *J Diabetes Res.* 2016; **36**(9):49-57. PMID: [27777959](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27777959/) DOI: [10.1155/2016/3694957](https://doi.org/10.1155/2016/3694957)
  13. Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, et al. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes.* 2003; **52**(3):812-7. PMID: [12606524](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12606524/) DOI: [10.2337/diabetes.52.3.812](https://doi.org/10.2337/diabetes.52.3.812)
  14. Jagannathan-Bogdan M, McDonnell ME, Shin H, Rehman Q, Hasturk H, Apovian CM, et al. Elevated proinflammatory cytokine production by a skewed T cell compartment requires monocytes and promotes inflammation in type 2 diabetes. *J Immunol.* 2011; **186**(2):1162-72. PMID: [12606524](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12606524/) DOI: [10.2337/diabetes.52.3.812](https://doi.org/10.2337/diabetes.52.3.812)
  15. Telikani Z, Sheikh V, Zamani A, Borzouei S, Salehi I, Amirzargar MA, et al. Effects of sitagliptin and vitamin D3 on T helper cell transcription factors and cytokine production in clinical subgroups of type 2 diabetes mellitus: highlights upregulation of FOXP3 and IL-37. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2019; **41**(2):299-311. PMID: [30907193](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30907193/) DOI: [10.1080/08923973.2019.1593447](https://doi.org/10.1080/08923973.2019.1593447)
  16. Frisullo G, Angelucci F, Caggiula M, Nociti V, Iorio R, Patanella AK, et al. pSTAT1, pSTAT3, and T-bet expression in peripheral blood mononuclear cells from relapsing-remitting multiple sclerosis patients correlates with disease activity. *J Neurosci Res.* 2006; **84**(5):1027-36. PMID: [16865709](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16865709/) DOI: [10.1002/jnr.20995](https://doi.org/10.1002/jnr.20995)
  17. Li Y, Ji X, Su Z, Tong J, Xia S, Chen X, et al. Downregulation of Runx3 is closely related to the decreased Th1-associated factors in patients with gastric carcinoma. *Tumour Biol.* 2014; **35**(12):12235-44. PMID: [25270738](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25270738/) DOI: [10.1007/s13277-014-2532-6](https://doi.org/10.1007/s13277-014-2532-6)
  18. Liu M, Liu J, Hao S, Wu P, Zhang X, Xiao Y, et al. Higher activation of the interferon-gamma signaling pathway in systemic lupus erythematosus patients with a high type I IFN score: relation to disease activity. *Clin Rheumatol.* 2018; **37**(10):2675-84. PMID: [29774490](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29774490/) DOI: [10.1007/s10067-018-4138-7](https://doi.org/10.1007/s10067-018-4138-7)
  19. Salvati VM, MacDonald TT, del Vecchio Blanco G, Mazzarella G, Monteleone I, Vavassori P, et al. Enhanced expression of interferon regulatory factor-1 in the mucosa of children with celiac disease. *Pediatr Res.* 2003; **54**(3):312-8. PMID: [12788988](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12788988/) DOI: [10.1203/01.PDR.0000079184.70237.9C](https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000079184.70237.9C)
  20. Hoseini-Aghdam M, Sheikh V, Eftekharian MM, Rezaeipoor M, Behzad M. Enhanced expression of TIGIT but not neuropilin-1 in patients with type 2 diabetes mellitus. *Immunol Lett.* 2020; **225**(1):1-8. PMID: [32540486](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32540486/) DOI: [10.1016/j.imlet.2020.06.003](https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.06.003)
  21. Qiao J, Liu Y, Wu Y, Li X, Zhu F, Xia Y, et al. Aberrant expression of RUNX3 in patients with immune thrombocytopenia. *Int Immunopharmacol.* 2015; **28**(1):252-6. PMID: [26093269](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26093269/) DOI: [10.1016/j.intimp.2015.06.008](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.06.008)
  22. Song C, Hsu K, Yamen E, Yan W, Fock J, Witting PK, et al. Serum amyloid A induction of cytokines in monocytes/macrophages and lymphocytes. *Atherosclerosis.* 2009; **207**(2):374-83. PMID: [19535079](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19535079/) DOI: [10.1016/j.athero.sclerosis.2009.05.007](https://doi.org/10.1016/j.athero.sclerosis.2009.05.007)
  23. O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2002; **2**(1):37-45. PMID: [11905836](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11905836/) DOI: [10.1038/nri702](https://doi.org/10.1038/nri702)
  24. Navarro-González JF, Mora-Fernández C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2008; **19**(3):433-42. PMID: [18256353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18256353/) DOI: [10.1681/ASN.2007091048](https://doi.org/10.1681/ASN.2007091048)
  25. Gutcher I, Becher B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest.* 2007; **117**(5):1119-27. PMID: [17476341](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17476341/) DOI: [10.1172/JCI131720](https://doi.org/10.1172/JCI131720)