

## اثر سیتاگلیپتین بر سطح سرمی $TNF-\alpha$ ، $IL-1\beta$ و $IL-10$ در بیماران مبتلا به دیابت ملیتوس نوع ۲

زهرا تلیکانی<sup>۱</sup> (M.Sc)، ویدا شیخ<sup>۳</sup> (M.D)، علیرضا زمانی<sup>۱</sup> (Ph.D)، شیوا برزوئی<sup>۳</sup> (M.D)، ایرج صالحی<sup>۴</sup> (Ph.D)، محمد علی امیرزرگر<sup>۳</sup> (M.D)، مهدی‌اله قلی حاجی بهزاد<sup>۱</sup> (Ph.D)

۱- گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۲- گروه تحقیقاتی ایمنولوژی مولکولی، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۳- گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۴- مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۲/۲۷

m.hajibehzad@umsha.ac.ir

تلفن: ۰۸۱۱-۸۳۸۰۵۸۳

### چکیده

**هدف:** دیابت قندی نوع دو (Type 2 diabetes mellitus, T2DM) یک بیماری التهابی مزمن همراه با تغییرات سیستم ایمنی می‌باشد. عدم تعادل در سایتوکاین‌ها نقش مهمی در پاتوژنز T2DM بازی می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی سطح سرمی سایتوکاین‌های  $TNF-\alpha$ ،  $IL-1\beta$  و  $IL-10$  و اثر سیتاگلیپتین بر سطح آن‌ها در بیماران T2DM بود.

مواد و روش‌ها: نمونه خون از ۶۰ بیمار T2DM و ۳۰ فرد کنترل جمع‌آوری شد. بیماران بر اساس درمان به دو گروه ۳۰ نفری دریافت‌کننده سیتاگلیپتین (۱۰۰ mg/day) به مدت هشت ماه و غیر دریافت‌کننده سیتاگلیپتین تقسیم شدند. پس از جداسازی نمونه سرم، سطح  $TNF-\alpha$ ،  $IL-1\beta$  و  $IL-10$  با استفاده از الایزا اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: سطح سرمی  $TNF-\alpha$  در گروه T2DM غیر دریافت‌کننده سیتاگلیپتین نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری نشان داد ( $p=0/002$ ) سطح  $TNF-\alpha$  در گروه دریافت‌کننده سیتاگلیپتین در مقایسه با گروه غیر دریافت‌کننده سیتاگلیپتین کاهش معناداری داشت ( $p=0/01$ ). سطح  $IL-10$  در بیماران غیر دریافت‌کننده سیتاگلیپتین در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری داشت ( $p=0/003$ ). سطح  $IL-10$  در گروه دریافت‌کننده سیتاگلیپتین در مقایسه با گروه غیر دریافت‌کننده افزایش معناداری نشان داد ( $p=0/002$ ). سطح  $IL-1\beta$  در مقایسه بین زیر گروه‌ها و در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری نشان نداد. نتیجه‌گیری: با مصرف سیتاگلیپتین، کاهش سایتوکاین التهابی  $TNF-\alpha$  و در مقابل افزایش سایتوکاین مهار کننده  $IL-10$  در بیماران مشاهده شد. به نظر می‌رسد سیتاگلیپتین دارای اثرات ضد التهابی در تنظیم سیستم ایمنی بیماران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: دیابت ملیتوس نوع دو، سیتاگلیپتین، سایتوکاین، اینترلوکین ۱۰، اینترلوکین ۱، فاکتور نکروزدهنده تومور

آلفا

### مقدمه

پروتئین‌های فاز حاد از جمله شاخص‌های نشان‌دهنده پیشرفت التهاب در T2DM می‌باشند [۵، ۶].

سایتوکاین  $TNF-\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ ) عمدتاً توسط لنفوسیت‌های T و ماکروفاژها تولید می‌شود و باعث ایجاد تغییرات التهابی و متابولیسمی در T2DM می‌شود [۷]. سایتوکاین التهابی اینترلوکین-۱ (IL-1 $\beta$ ) عمدتاً توسط ماکروفاژها و سلول‌های بتای پانکراس تولید می‌شود و در تخریب سلول‌های بتا، مقاومت انسولینی دیابت نوع دو نقش دارد [۸]. سایتوکاین مهار کننده  $IL-10$  بیش‌تر توسط سلول‌های Treg (Regulatory T cell) جهت سرکوب التهاب تولید می‌شود [۹، ۱۰]. سلول‌های

دیابت قندی نوع دو (Type 2 diabetes mellitus, T2DM)

یک اختلال متابولیسمی مزمن است که افزایش قند خون و مقاومت انسولینی شاخص‌های اصلی آن می‌باشند [۱، ۲]. التهاب نقش مهمی در پاتوژنز و عوارض جانبی ناشی از T2DM بازی می‌کند. نتایج مطالعات حاکی از تغییرات سیستم ایمنی در بیماران مبتلا به T2DM می‌باشد که از جمله می‌توان به عدم تعادل در سایتوکاین‌های التهابی و مهار کننده اشاره کرد که تا حدی می‌تواند مرتبط با نقص و التهاب موجود در سلول‌های بتاپانکراس باشد [۳، ۴]. افزایش سطح سایتوکاین‌های التهابی و

نمونه‌های انسانی رعایت گردید. در این مطالعه ۶۰ بیمار مبتلا به دیابت نوع دو که واجد معیارهای ورود بودند طبق تشخیص پزشکی وارد مطالعه شدند. تمام بیماران به صورت پایه داروهای متفورمین با دوز ۱۰۰۰ mg/day و گلیکلازید با دوز ۱۶۰ mg/day دریافت کردند. بیماران بر اساس دریافت و عدم دریافت سیتاگلیپتین به دو زیر گروه ۳۰ نفره دریافت‌کننده سیتاگلیپتین (Sitagliptin+) و غیر دریافت‌کننده سیتاگلیپتین (Sitagliptin-) تقسیم شدند. بیماران دریافت‌کننده سیتاگلیپتین، به مدت هشت ماه (۱۰۰ mg/day) تحت درمان با این دارو بوده‌اند. دوز داروهای فوق‌الذکر طبق نظر پزشک مربوطه و با توجه به علائم کلینیکی و پاراکلینیکی تعیین شد. توضیح این‌که گروه‌های دریافت‌کننده سیتاگلیپتین از بین بیماران دیابتی که به دلیل عدم کنترل مناسب قند خون به وسیله داروهای متفورمین و گلیکلازید کاندید دریافت سیتاگلیپتین بودند وارد مطالعه شدند.

معیارهای ورود: ۱) تشخیص بیماری دیابت توسط پزشک متخصص بر اساس معیار American Diabetes Association سال ۲۰۱۶. ۲) میزان قند ناشتای پلاسما بیش‌تر از mg/dL ۱۲۶. ۳) میزان قند خون بعد از غذا بیش‌تر از mg/dL ۲۰۰. ۴) شاخص HbA1c بیش‌تر از ۵/۶٪. ۵) BMI کم‌تر از ۳۰ کیلوگرم بر مترمربع. ۶) میزان کراتینین سرم نرمال و کم‌تر از mg/dL ۱. ۷) میزان GFR نرمال و بیش‌تر از ۶۰. ۸) سن بین ۱۸-۶۰ سال. معیارهای خروج: ۱) سن زیر ۱۸ سال و بالای ۶۰ سال. ۲) میزان HbA1c بیش‌تر از ۹٪. ۳) داشتن بیماری خود ایمن، نئوپلازی خونی و بافتی و پانکراتیت. ۴) مصرف استروئید، انسولین و داروهای مهارکننده سیستم ایمنی. ۵) داشتن نروپاتی کلیوی و یا ریتینوپاتی. ۶) مصرف الکل و سیگار. از طرف دیگر ۳۰ فرد سالم به عنوان گروه کنترل یا HC (Healthy control subjects) بعد از معاینه بالینی و آزمایشگاهی توسط پزشک، در صورت نداشتن بیماری دیابت نوع دو، بیماری‌های خود ایمن، نئوپلازی و بیماری مزمن دیگر و هم‌چنین عدم مصرف سیگار و الکل وارد مطالعه شدند. گروه کنترل تا حد ممکن از لحاظ سن و جنس با گروه بیمار مطابقت داده شد. مشخصات کلینیکی و دموگرافیک افراد مورد مطالعه در جدول ۱ آورده شده است.

خونگیری و جداسازی سرم: میزان ۵ میلی‌لیتر خون وریدی از بازو در شرایط استریل از افراد مورد مطالعه گرفته و به لوله سرم منتقل شد. نمونه‌ها در دور ۳۰۰۰ RPM به مدت ده دقیقه در دمای اتاق سانتیفریوژ و سرم آن‌ها جداسازی شد. نمونه‌ها جهت اندازه‌گیری سایتوکاین در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اندازه‌گیری سایتوکاین: سطح سرمی سایتوکاین‌های IL-10 (ELISA MAX™ Deluxe, Sensitivity: 2 pg/mL,

Treg زیر رده سلول‌های T کمکی (CD4+ T helper cells) می‌باشد که در تنظیم پاسخ‌های سیستم ایمنی در بسیاری از بیماری‌های التهابی مانند دیابت نوع دو نقش دارند [۱۲،۱۱]. مطالعات نقش IL-10 در التهاب مرتبط با T2DM و هم‌چنین ارتباط بین سطح IL-10 تولیدی و میزان قند خون در این بیماران را نشان داده است [۱۴،۱۳]. نتایج تحقیقات مختلف حاکی از افزایش فاکتورهای التهابی مانند CRP (C-reactive protein), IFN- $\gamma$  (Interferon gamma) و IL-17 در T2DM می‌باشد [۱۶،۱۵]. از سوی دیگر عدم تعادل بین زیر گروه‌های لنفوسیتی التهابی مانند Th1 و Th17 و زیر گروه Treg در T2DM دیده شده است [۱۷].

تجویز داروهای روتین آنتی‌دیابتیک مانند متفورمین و گلیکلازید به عنوان خط اول درمانی این بیماری مطرح است که با سرکوب گلوکوتوژنز و افزایش جذب گلوکز در بافت‌ها سبب افزایش حساسیت انسولینی و بهبود روند درمان در T2DM می‌شوند [۱۸]. دسته دیگری از داروهای آنتی‌هایپرگلیسمیک که اخیراً مورد توجه قرار گرفته‌اند مهارکننده‌های دی پپتیدیل پپتیداز-۴ می‌باشند که مهم‌ترین آن‌ها سیتاگلیپتین (Sitagliptin) است. سیتاگلیپتین با جلوگیری از غیر فعال شدن هورمون‌های اینکرتین سبب تحریک ترشح انسولین از پانکراس و در نتیجه کاهش غلظت گلوکز خون می‌شود [۱۹]. تجویز سیتاگلیپتین باعث کاهش سطح سرمی سایتوکاین‌های التهابی مانند IFN- $\gamma$  در بیماران T2DM می‌شود [۲۰]. هم‌چنین تحقیقات مختلف حاکی از کاهش فاکتورهای التهابی مانند CRP در اثر مصرف داروی سیتاگلیپتین در بیماران T2DM می‌باشد [۲۱].

با توجه به تغییرات سیستم ایمنی و عدم تعادل سایتوکاین‌های التهابی و مهاری در پیشرفت T2DM و هم‌چنین اثرات ضد التهابی احتمالی سیتاگلیپتین در تنظیم پاسخ‌های ایمنی، مطالعه حاضر با هدف بررسی سطح سرمی سایتوکاین‌های پیش‌التهابی TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  و ضد التهابی IL-10 و هم‌چنین بررسی اثر سیتاگلیپتین پس از یک دوره درمانی هشت ماهه (۱۰۰ mg/day) بر سطح این سایتوکاین‌ها در T2DM صورت گرفت.

## مواد و روش‌ها

جامعه و نمونه پژوهش: این مطالعه مورد-شاهدی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان با کد IR.UMSHA.REC.1395.549 بر روی بیماران مبتلا به دیابت نوع دو مراجعه‌کننده به بیمارستان شهید بهشتی انجام شد. جمع‌آوری نمونه‌ها همراه با پرسش‌نامه، رضایت‌نامه کتبی و با رعایت قوانین اخلاق در مطالعات تجربی پزشکی انجام گرفت. تمامی دستورالعمل‌های اخلاقی برای نگهداری و استفاده از

دقیقه بر روی شیکر در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از انجام شستشو ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترات به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. صد میکرولیتر محلول Stop به هر چاهک اضافه شد (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) و سپس با استفاده از دستگاه ELISA Reader، در طول موج ۴۵۰ nm جذب نوری نمونه‌ها خوانده شد.

آنالیز داده‌ها و بررسی آماری: توزیع پراکندگی داده‌ها توسط تست Shapiro-Wilk آنالیز شد. با توجه به پراکندگی داده‌ها و داشتن سه گروه مورد مطالعه، جهت مقایسه گروه‌های مورد مطالعه از روش آماری ANOVA و آزمون بونفرونی (post hoc Bonferroni) استفاده شد [۲۲]. برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 21 و جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Graph Pad Prism 6.07 استفاده شد. سطح معنی‌داری کم‌تر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

IL-1 $\beta$  (ELISA, Biolegend, USA, Cat no: 430604) MAX<sup>TM</sup> Deluxe, Sensitivity: 0.5 pg/mL, Biolegend, TNF- $\alpha$  (ELISA MAX<sup>TM</sup> USA, Cat no: 437004) Deluxe, Sensitivity: 2 pg/mL, Biolegend, USA, Cat no: 430204) توسط تکنیک الایزا و بر اساس دستورالعمل کیت سازنده اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه ۱۰۰ میکرولیتر Capture Antibody به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه الایزا اضافه شد. به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از دوره انکوباسیون چهار بار پلیت شستشو داده شد و سپس ۲۰۰ میکرولیتر محلول بلاکینگ به هر چاهک اضافه شد و به مدت دو ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از مراحل شستشو استاندارد و نمونه‌ها اضافه گردید و به مدت دو ساعت انکوبه شد. بعد از شستشوی پلیت ۱۰۰ میکرولیتر Detection Antibody، به هر چاهک اضافه شد و به مدت یک ساعت بر روی شیکر در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از مراحل شستشو ۱۰۰ میکرولیتر Avidin-HRP، به هر چاهک اضافه شد. به مدت ۳۰

جدول ۱. اطلاعات پایه افراد مورد مطالعه

مشخصات	گروه کنترل	گروه بیمار غیر دریافت کننده سیتاگلیپتین	گروه بیمار دریافت کننده سیتاگلیپتین	سطح معناداری p
جنسیت (زن به مرد)	۱۹ به ۱۱	۱۵ به ۵	۱۴ به ۶	NS
سن (سال)	۴۸/۸۴±۶/۹۱	۴۷/۶۵±۳/۱۴	۴۸/۳۱±۷/۱۸	NS
BMI (کیلوگرم/مترمربع)	۲۴/۲±۲/۶۹	۲۶/۰۷±۳/۴۱	۲۶/۹۸±۴/۷۱	NS
قند ناشتای پلاسما (mg/dL)	۸۶/۶۴±۶۶/۹۸	۱۸۱/۶۹±۳۹/۲۹*	۱۴۵/۲۱±۲۶/۱۱*	≤۰/۰۰۱
قند بعد از غذای پلاسما (mg/dL)	۱۱۲/۷۶±۸۶/۹۲	۲۸۳/۹۲±۷۰/۵۶*	۲۶۸/۶۶±۸۲/۵۸*	≤۰/۰۰۱
HbA1c (%)	۴/۶۵±۰/۵۶	۷/۳۳±۰/۸۲*	۷/۷۲±۰/۸*	≤۰/۰۰۱
طول دوره بیماری (سال)	-	۲/۴۲±۰/۹۹	۲/۳۱±۰/۹۷	NS
mg/dL کراتینین سرم	۰/۹۸±۰/۱۶	۰/۹۶±۰/۱۴	۰/۸۶±۰/۱	NS
GFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	۷۴/۲۸±۱/۴۱	۷۲/۵۸±۱/۶۱	۷۹/۲۵±۱/۲۷	NS
mg/day آلبومینوری	۱۲/۲۱±۵/۵۴	۱۳/۹±۸/۸۵	۱۲±۹/۰۳	NS

BMI: Body Mass Index; HbA1C: Hemoglobin A1c; GFR: Glomerular filtration rate; NS: Not Significant

مقادیر بر حسب میانگین ± انحراف معیار بیان شده است. \* نسبت به گروه کنترل

پلاسما، HbA1c در گروه‌های بیمار در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری نشان داد (p ≤ ۰/۰۰۱) (جدول ۱).

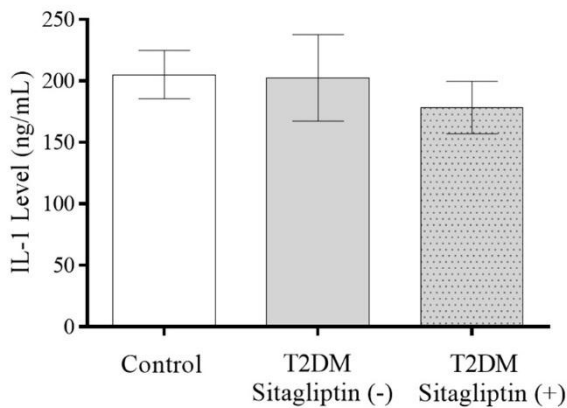
اثر سیتاگلیپتین بر سطح سرمی TNF- $\alpha$  در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو

جهت مقایسه سطح سرمی سایتوکاین التهابی TNF- $\alpha$  در بیماران T2DM و گروه کنترل و هم‌چنین بررسی اثر سیتاگلیپتین بر آن، سطح سرمی این سایتوکاین در زیر گروه‌ها با استفاده از تکنیک الایزا اندازه‌گیری شد. سطح سرمی TNF- $\alpha$  در گروه بیماران مبتلا به دیابت نوع دو که سیتاگلیپتین دریافت نکردند در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری را

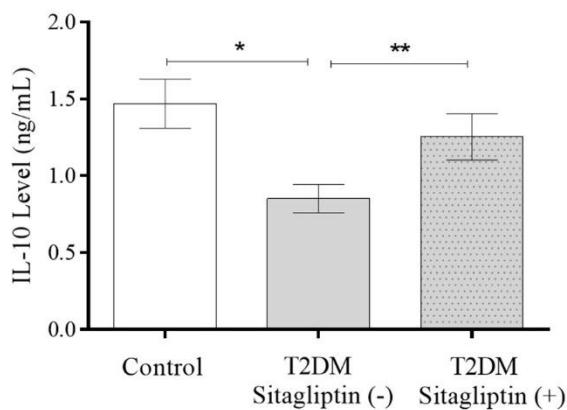
## نتایج

### اطلاعات پایه افراد مورد مطالعه

به طور کلی، ۶۰ فرد بیمار (۳۰ نفر در گروه بیماران دیابتی Sitagliptin+ و ۳۰ فرد سالم (HCs) مورد مطالعه قرار گرفتند. میانگین سنی افراد دیابتی Sitagliptin+ ۴۸/۳۱±۷/۱۸ سال، افراد دیابتی Sitagliptin- ۴۷/۶۵±۳/۱۴ سال و در گروه HCs ۴۸/۸۴±۶/۹۱ سال بود. در مقایسه پارامترهای سن، جنس، طول دوره بیماری، قد، وزن و BMI بین گروه‌های بیمار و گروه کنترل تفاوت معناداری مشاهده نشد. پارامترهای مربوط به تشخیص دیابت شامل قند ناشتای پلاسما، قند بعد از غذای



شکل ۲. سطح سرمی IL-1 $\beta$  در گروه های بیمار و افراد کنترل. مقایسه سطح سرمی سایتوکاین IL-1 $\beta$  در گروه غیر دریافت کننده سیتاگلیپتین (Sitagliptin -) و گروه دریافت کننده سیتاگلیپتین (Sitagliptin +) و گروه کنترل (HCs).

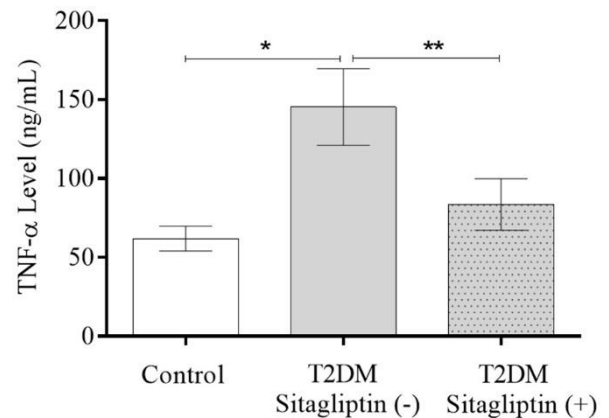


شکل ۳. سطح سرمی IL-10 در گروه های بیمار و افراد کنترل. مقایسه سطح سرمی سایتوکاین IL-10 در گروه غیر دریافت کننده سیتاگلیپتین (Sitagliptin -) و گروه دریافت کننده سیتاگلیپتین (Sitagliptin +) و گروه کنترل (HCs). \*\*P=0.002, \*P=0.003.

## بحث و نتیجه گیری

بیشرفت التهاب در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو از عوامل موثر در افزایش مقاومت انسولینی در بیماران می باشد [۲۳]. عدم تعادل در تولید و ترشح سایتوکاین های التهابی و مهارتی از جمله عوامل پیش برنده التهاب در دیابت نوع می باشد [۲۴]. نتایج این مطالعه نشان دهنده افزایش سطح سرمی TNF- $\alpha$  و کاهش سطح سرمی IL-10 در بیماران T2DM می باشد. تمام بیماران در مطالعه حاضر داروهای متفورمین و گلیکلازید را به صورت پایه دریافت کرده اند. و شروع درمان با سیتاگلیپتین در گروه Sitagliptin+ به دلیل عدم پاسخگویی به درمان با متفورمین و گلیکلازید بوده است. نتایج مطالعه حاضر حاکی از اثر کاهشی درمان با سیتاگلیپتین بر سطح سرمی TNF- $\alpha$  و در مقابل اثر افزایشی بر سطح سرمی IL-10 در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو می باشد.

نشان داد (شکل ۱،  $p=0/002$ ). مصرف سیتاگلیپتین سبب کاهش معنادار سطح سرمی TNF- $\alpha$  در گروه بیماران دریافت کننده سیتاگلیپتین نسبت به گروه غیر دریافت کننده سیتاگلیپتین شد (شکل ۱،  $p=0/01$ ).



شکل ۱. سطح سرمی TNF- $\alpha$  در گروه های بیمار و افراد کنترل. مقایسه سطح سرمی سایتوکاین TNF- $\alpha$  در گروه غیر دریافت کننده سیتاگلیپتین (Sitagliptin -) و گروه دریافت کننده سیتاگلیپتین (Sitagliptin +) و گروه کنترل (HCs). \*\*p=0.01, \*p=0.002.

اثر سیتاگلیپتین بر سطح سرمی IL-1 $\beta$  در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو

سطح سرمی IL-1 $\beta$  در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو، زیر گروه های آن و گروه کنترل اندازه گیری شد. سطح سرمی سایتوکاین IL-1 $\beta$  در گروه بیماران مبتلا به دیابت نوع دو که سیتاگلیپتین دریافت نکردند در مقایسه با گروه افراد سالم تفاوت معناداری را نشان نداد. هم چنین در مقایسه سطح سرمی IL-1 $\beta$  بین گروه بیماران دریافت کننده سیتاگلیپتین و گروه غیر دریافت کننده سیتاگلیپتین تفاوت معناداری مشاهده نشد (شکل ۲).

اثر سیتاگلیپتین بر سطح سرمی IL-10 در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو

به منظور بررسی سطح IL-10 در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو، مقایسه آن در زیر گروه ها و گروه کنترل و هم چنین بررسی اثر سیتاگلیپتین بر آن، سطح سرمی IL-10 با استفاده از تکنیک الیزا اندازه گیری شد. سطح IL-10 در گروه بیماران مبتلا به دیابت نوع دو که سیتاگلیپتین دریافت نکردند در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری را نشان داد (شکل ۳،  $p=0/003$ ). در مقابل، سطح سرمی IL-10 در گروه بیماران دریافت کننده سیتاگلیپتین نسبت به گروه غیر دریافت کننده سیتاگلیپتین افزایش معناداری را نشان داد (شکل ۳،  $p=0/002$ ).

IL-1 $\beta$  در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو که هیچ‌گونه درمانی دریافت نکرده بودند در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری نشان نداد، در حالی‌که در گروه‌بندی دیگری در همین مطالعه نشان داده‌اند که سطح سرمی این سایتوکاین در بیمارانی با سطح سرمی IL-6 افزایش یافته در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری داشته است [۳۳]. نتایج مطالعه Kousathana و همکارانش در سال ۲۰۱۷ نشان داد که سطح IL-1 $\beta$  در سوپرناونت‌های جمع‌آوری شده از محیط کشت سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی تحریک شده با LPS در بیماران مبتلا به T2DM در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری داشته است [۳۴]. Sromova و همکارانش در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۳ نشان دادند مصرف سیتاگلیپتین (۱۰۰ mg/day) در دو دوره درمانی ۴ هفته و ۱۲ ماه تاثیری بر سطح سرمی IL-1 $\beta$  در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو نداشته است [۳۰]. نتایج مطالعه حاضر نیز تفاوت معناداری در سطح سرمی IL-1 $\beta$  پس از هشت ماه مصرف سیتاگلیپتین با دوز مصرفی ۱۰۰ mg/day در مقایسه با گروه غیر دریافت‌کننده سیتاگلیپتین نشان نداد.

مطالعات مختلفی نقش IL-10 در التهاب مرتبط با دیابت نوع دو و همچنین ارتباط بین سطوح IL-10 تولیدی و تنظیم میزان قند خون در این بیماری را نشان داده‌اند [۱۳، ۱۴]. نتایج مطالعه Francisco و همکارانش در سال ۲۰۱۶ حاکی از افزایش سطح IL-10 تولیدی توسط سلول‌های T کمکی CD4+ در بیماران T2D در مقایسه با گروه کنترل بوده است [۱۵]. از طرف دیگر در سال ۲۰۱۶، Barry JC و همکارانش در مطالعه‌ای به صورت *in vivo* و *in vitro* نشان داده‌اند که عملکرد مهاره IL-10 در سرکوب التهاب در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو کاهش داشته است [۲۳]. همچنین Eric VE و همکارانش در سال ۲۰۰۲ نشان داده‌اند که سطح سرمی IL-10 در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو غیر دریافت‌کننده دارو در مقایسه با گروه کنترل کاهش نشان داده است [۳۵]. نتایج این حاکی از کاهش سطح سرمی IL-10 در بیماران T2DM در مقایسه با گروه کنترل و همسو با نتایج مطالعات سرمی می‌باشد.

نتایج مطالعه Satoh-Asahara N و همکارانش روی بیماران مبتلا به دیابت نوع دو که به مدت سه ماه تحت درمان با سیتاگلیپتین (۵۰ mg/day) بودند حاکی از افزایش سطح سرمی IL-10 در بیماران تحت درمان با سیتاگلیپتین در مقایسه با گروه بدون درمان بود [۲۹]. در مقابل، در مطالعه‌ای که Pinheiro و همکارانش در سال ۲۰۱۷ انجام دادند نشان داد اضافه کردن سیتاگلیپتین به محیط کشت سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی تحریک شده با PHA که از افراد سالم گرفته شده، سبب کاهش تولید IL-10 توسط این سلول‌ها می‌شود [۳۶]. نتایج این مطالعه

بر اساس مطالعات انجام شده TNF- $\alpha$  به عنوان یک سایتوکاین التهابی مهم در ایجاد مقاومت انسولینی نقش دارد. این سایتوکاین با اختلال در بیان یکی از ترانسپورترهای گلوکز (GLUT4) و مهار فسفریلاسیون گیرنده انسولین باعث ایجاد مقاومت انسولینی می‌شود [۲۵]. در مطالعه‌ای که توسط Tsiotra و همکارانش در سال ۲۰۰۷ انجام شد، بیان ژن TNF- $\alpha$  در زنان مبتلا به دیابت نوع دو در مقایسه با گروه افراد سالم افزایش معناداری را نشان داد [۲۶]. همچنین مطالعه Pickup و همکارانش در سال ۲۰۰۰ بر روی بیماران مبتلا به دیابت نوع دو نشان‌دهنده افزایش معنادار میزان TNF- $\alpha$  تولیدی از نمونه‌های خون تحریک شده با LPS (Lipopolysaccharide) در بیماران در مقایسه با افراد سالم بود [۲۷]. Mirza و همکارانش در سال ۲۰۱۲ نشان داده‌اند که سطح سرمی TNF- $\alpha$  در بیماران مبتلا به دیابت در مقایسه با گروه افراد سالم افزایش معناداری داشته است [۲۸]. نتایج این مطالعات همسو با یافته به‌دست آمده از این مطالعه مبنی بر افزایش سطح سرمی TNF- $\alpha$  در بیماران T2DM می‌باشد.

در ارتباط با اثرات ضد التهابی احتمالی سیتاگلیپتین، نتایج مطالعه Satoh-Asahara و همکارانش روی بیماران مبتلا به دیابت نوع دو که به مدت سه ماه تحت درمان با سیتاگلیپتین (۵۰ mg/day) بودند حاکی از کاهش سطح TNF- $\alpha$  و همچنین کاهش بیان ژن TNF- $\alpha$  در مونسیت‌های بیماران تحت درمان با سیتاگلیپتین در مقایسه با گروه بدون درمان بود [۲۹]. در مقابل، نتایج مطالعه Sromova و همکارانش در سال ۲۰۱۳ نشان داد که مصرف سیتاگلیپتین (۱۰۰ mg/day) در دو دوره درمانی ۴ هفته و ۱۲ ماه تاثیری بر سطح سرمی TNF- $\alpha$  در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو نداشته است [۳۰]. این در حالی است که نتایج مطالعه حاضر حاکی از کاهش معنادار سطح سرمی TNF- $\alpha$  پس از یک دوره درمانی هشت ماهه با دوز مصرفی ۱۰۰ mg/day در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو در مقایسه با گروه غیر دریافت‌کننده سیتاگلیپتین بوده است. به نظر می‌رسد درمان با سیتاگلیپتین بر اساس مدت زمان و دوز مصرفی می‌تواند اثرگذاری متفاوتی بر میزان سایتوکاین‌ها نشان دهد.

مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که آپوپتوز سلول‌های بتای پانکراس مرتبط با افزایش تولید و ترشح سایتوکاین التهابی IL-1 $\beta$  توسط این سلول‌ها می‌باشد [۳۱]. گلوکز سبب تحریک سلول‌های بتای پانکراس و تولید IL-1 $\beta$  می‌شود. از طرف دیگر IL-1 $\beta$  با اثرگذاری بر سلول‌های بتا سبب تولید و ترشح بیش‌تر این سایتوکاین می‌شود که در نهایت با پیشرفت شرایط التهابی سبب از کار افتادن سلول‌های بتا می‌شود [۳۲]. در مطالعه‌ای که Spranger و همکارانش در سال ۲۰۰۳ انجام دادند، سطح سرمی

## تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی هیئت علمی به شماره ۹۵۱۲۲۴۸۰۷۵ مصوب دانشگاه علوم پزشکی همدان می‌باشد و با حمایت مالی معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از کلیه بیماران و افرادی که در راستای این پژوهش صمیمانه همکاری نمودند، سپاس‌گزاری می‌شود.

## منابع

- [1] Sheikh V, Zamani A, Mahabadi-Ashtiyani E, Tarokhian H, Borzouei S, Alahgholi-Hajibehzad M. Decreased regulatory function of CD4(+)CD25(+)CD45RA(+) T cells and impaired IL-2 signalling pathway in patients with type 2 diabetes mellitus. *Scand J Immunol* 2018; 88: e12711.
- [2] Borzouei S, Sheikh V, Ghasemi M, Zamani A, Telikani Z, Zareighane Z, et al. 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: 293-301.
- [3] Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 98-107.
- [4] Wang C, Guan Y, Yang J. Cytokines in the Progression of Pancreatic beta-Cell Dysfunction. *Int J Endocrinol* 2010; 2010: 515136.
- [5] Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Ann Rev Immunol* 2011; 29: 415-445.
- [6] Pickup JC. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 813-823.
- [7] Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 433-442.
- [8] Dinarello CA, Donath MY, Mandrup-Poulsen T. Role of IL-1beta in type 2 diabetes. *Curr Opin Endoc Diabetes Obes* 2010; 17: 314-321.
- [9] Alahgholi-Hajibehzad M, Oflazer P, Aysal F, Durmus H, Gulsen-Parman Y, Marx A, et al. Regulatory function of CD4+CD25++ T cells in patients with myasthenia gravis is associated with phenotypic changes and STAT5 signaling: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates the suppressor activity. *J Neuroimmunol* 2015; 281: 51-60.
- [10] Alahgholi-Hajibehzad M, Kasapoglu P, Jafari R, Rezaei N. The role of T regulatory cells in immunopathogenesis of myasthenia gravis: implications for therapeutics. *Exp Rev Clin Immunol* 2015; 11: 859-870.
- [11] Alahgholi-Hajibehzad M, Durmus H, Aysal F, Gulsen-Parman Y, Oflazer P, Deymeer F, et al. The effect of interleukin (IL)-21 and CD4(+) CD25(++) T cells on cytokine production of CD4(+) responder T cells in patients with myasthenia gravis. *Clin Exp Immunol* 2017; 190: 201-207.
- [12] Sheikh V, Kasapoglu P, Zamani A, Basiri Z, Tahamoli-Roudsari A, Alahgholi-Hajibehzad M. Vitamin D3 inhibits the proliferation of T helper cells, downregulate CD4(+) T cell cytokines and upregulate inhibitory markers. *Human Immunol* 2018; 79: 439-445.
- [13] Gao M, Zhang C, Ma Y, Bu L, Yan L, Liu D. Hydrodynamic delivery of mIL10 gene protects mice from high-fat diet-induced obesity and glucose intolerance. *Mol Ther* 2013; 21: 1852-1861.
- [14] Hong EG, Ko HJ, Cho YR, Kim HJ, Ma Z, Yu TY, et al. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. *Diabetes* 2009; 58: 2525-2535.
- [15] Francisco CO, Catai AM, Moura-Tonello SC, Arruda LC, Lopes SL, Benze BG, et al. Cytokine profile and lymphocyte subsets in type 2 diabetes. *Braz J Med Biol Res* 2016; 49: e5062.
- [16] 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: 1162-1172.

نشان داد که مصرف هشت ماه سیتاگلیپتین با دوز مصرفی ۱۰۰mg/day سبب کاهش سطح سرمی IL-10 در بیماران مبتلا به دیابت نوع در مقایسه با گروه غیر دریافت‌کننده سیتاگلیپتین می‌شود. به نظر می‌رسد اثر سیتاگلیپتین به صورت مصرف خوراکی و یا اثر مستقیم آن بر سلول‌ها می‌تواند نتایج متفاوتی را نشان دهد. در مجموع به نظر می‌رسد مصرف سیتاگلیپتین با توجه به دوز و طول دوره مصرف می‌تواند اثرگذاری متفاوتی نشان دهد.

نتایج این مطالعه حاکی از افزایش سطح سرمی TNF- $\alpha$  و در مقابل کاهش سطح IL-10 در بیماران T2DM نسبت به گروه کنترل بود که نشان‌دهنده عدم تعادل در تولید سایتوکاین‌های التهابی و مهارتی در بیماران T2DM (پروفایل التهابی) می‌باشد. سیتاگلیپتین با جلوگیری از غیر فعال شدن هورمون‌های اینکریتین سبب کاهش غلظت گلوکز خون می‌شود و به عنوان یک داروی آنتی‌دیابتیک مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر آن مطالعه حاضر نشان‌دهنده اثرات ضد التهابی مصرف سیتاگلیپتین پس از یک دوره درمانی هشت ماهه با دوز ۱۰۰mg/day با کاهش سطح سرمی سایتوکاین التهابی TNF- $\alpha$  و افزایش سایتوکاین مهارتی IL-10 در بیماران T2DM بود. نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز سیتاگلیپتین باعث کاهش موثر التهاب موجود در بیماران T2DM می‌شود که یکی از مکانیسم‌های آن می‌تواند تاثیر بر تعادل سایتوکاین‌های سیستم ایمنی بدن باشد که در این مطالعه نشان داده شد.

محدودیت‌های پژوهش:

این مطالعه با توجه به جمعیت نه چندان زیاد در بیماران دیابتی نوع دو مورد بررسی صورت گرفت. به نظر می‌رسد مطالعات بیشتری می‌تواند با تاکید بر جنس، BMI و با حجم نمونه بیشتر انجام گیرد. همچنین بررسی بر روی زیرگروه‌های مختلف کلینیکی بیماری دیابت مانند نفروپاتی دیابتی، رتینوپاتی دیابتی و نوروپاتی می‌تواند در مطالعات آینده مد نظر قرار گیرد. در این مطالعه، تنها سطح سرمی سایتوکاین‌ها اندازه‌گیری شد، در حالی‌که استفاده از سلول‌های ایزوله (مانند سلول‌های T) جهت اندازه‌گیری سایتوکاین‌ها می‌تواند منبع دقیق تولید سایتوکاین را آشکار سازد که می‌تواند در مطالعات آینده مد نظر قرار گیرد. با توجه به اثرگذاری‌های متفاوت سیتاگلیپتین بر اساس دوره و دوز مصرفی، در نظر گرفتن دوزها و دوره‌های مصرف متفاوت می‌تواند در مطالعات آینده مد نظر قرار گیرد.

alpha, IL-6 and adiponectin and low levels of leptin in a population of Mexican Americans: a cross-sectional study. *Cytokine* 2012; 57: 136-142.

[29] Satoh-Asahara N, Sasaki Y, Wada H, Tochiya M, Iguchi A, Nakagawachi R, et al. A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, sitagliptin, exerts anti-inflammatory effects in type 2 diabetic patients. *Metabolism* 2013; 62: 347-351.

[30] Sromova L, Busek P, Mareckova H, Anđel M, Sedo A. The effect of dipeptidyl peptidase-IV inhibitor sitagliptin on the immune functions in patients with type 2 diabetes. *Frontiers in Immunology* 2013.02.00154.

[31] Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest* 2002; 110: 851-860.

[32] Zhao G, Dharmadhikari G, Maedler K, Meyer-Hermann M. Possible Role of Interleukin-1 $\beta$  in Type 2 Diabetes Onset and Implications for Anti-inflammatory Therapy Strategies. *PLoS Comput Biol* 2014; 10: e1003798.

[33] Spranger J, Kroke A, Mohlig 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: 812-817.

[34] Kousathana F, Georgitsi M, Lambadiari V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Dimitriadis G, Mouktaroudi M. Defective production of interleukin-1 beta in patients with type 2 diabetes mellitus: Restoration by proper glycemic control. *Cytokine* 2017; 90: 177-184.

[35] van Exel E, Gussekloo J, de Craen AJ, Frolich M, Bootsma-Van Der Wiel A, Westendorp RG. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes: the Leiden 85-Plus Study. *Diabetes* 2002; 51: 1088-1092.

[36] Pinheiro MM, Stoppa CL, Valduga CJ, Okuyama CE, Gorjao R, Pereira RM, et al. Sitagliptin inhibit human lymphocytes proliferation and Th1/Th17 differentiation in vitro. *Eur J Pharm Sci* 2017; 100: 17-24.

[17] Zeng C, Shi X, Zhang B, Liu H, Zhang L, Ding W, et al. The imbalance of Th17/Th1/Tregs in patients with type 2 diabetes: relationship with metabolic factors and complications. *J Mol Med (Berlin, Germany)* 2012; 90: 175-186.

[18] Correia S, Carvalho C, Santos MS, Seica R, Oliveira CR, Moreira PI. Mechanisms of action of metformin in type 2 diabetes and associated complications: an overview. *Mini Rev Med Chem* 2008; 8: 1343-1354.

[19] Plosker GL. Sitagliptin: a review of its use in patients with type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 2014; 74: 223-242.

[20] Sromova L, Busek P, Posova H, Potockova J, Skrha P, Anđel M, et al. The effect of dipeptidyl peptidase-IV inhibition on circulating T cell subpopulations in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2016; 118: 183-192.

[21] Tremblay AJ, Lamarche B, Deacon CF, Weisnagel SJ, Couture P. Effects of sitagliptin therapy on markers of low-grade inflammation and cell adhesion molecules in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2014; 63: 1141-1148.

[22] 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: 1-13.

[23] Barry JC, Shakibakho S, Durrer C, Simtchouk S, Jawanda KK, Cheung ST, et al. Hyporesponsiveness to the anti-inflammatory action of interleukin-10 in type 2 diabetes. *Sci Rep* 2016; 6: 21244.

[24] Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 98.

[25] Akash MSH, Rehman K, Liaqat A. Tumor Necrosis Factor-Alpha: Role in Development of Insulin Resistance and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *J Cell Biochem* 2018; 119: 105-110.

[26] Tsiotra PC, Tsigos C, Yfanti E, Anastasiou E, Vikentiou M, Psarra K, et al. Visfatin, TNF-alpha and IL-6 mRNA expression is increased in mononuclear cells from type 2 diabetic women. *Horm Metab Res* 2007; 39: 758-763.

[27] Pickup JC, Chusney GD, Thomas SM, Burt D. Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor  $\alpha$  and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life Sci* 2000; 67: 291-300.

[28] Mirza S, Hossain M, Mathews C, Martinez P, Pino P, Gay JL, et al. Type 2-diabetes is associated with elevated levels of TNF-

## Effect of sitagliptin on serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ and IL-10 in patients with type 2 diabetes mellitus

Zahra Telikani (M.Sc)<sup>1,2</sup>, Vida Sheikh (M.D)<sup>3</sup>, Alireza Zamani (Ph.D)<sup>1,2</sup>, Shiva Borzouei (M.D)<sup>3</sup>, Iraj Salehi (Ph.D)<sup>4</sup>, Mohammad Ali Amirzargar (M.D)<sup>3</sup>, Mahdi Alahgholi-Hajibehzad (Ph.D)<sup>\*1,2</sup>

1 - Dept. of Immunology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

2 - Molecular Immunology Research Group, Research Center for Molecular Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

3- Dept. of Internal Medicine, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

4- Neurophysiology Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

\* Corresponding author. +98 811 8380583 m.hajibehzad@umsha.ac.ir

Received:6 Feb 2019; Accepted:17 Jun 2019

**Introduction:** Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is an inflammatory disease with alterations in immune system. Remarkably, cytokine imbalance plays an important role in pathogenesis of T2DM. The purpose of this study was to determine the serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10 and the effects of sitagliptin on the level of these cytokines in patients with T2DM.

**Materials and Methods:** Blood samples were collected from 60 T2DM patients and 30 healthy control subjects (HCs). T2DM patients were divided into two subgroups based on their treatment; with sitagliptin treatment (100 mg/day, n=30) for 8 months and without sitagliptin treatment (n=30). The serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10 cytokines were assessed using ELISA method. ANOVA with posthoc Bonferroni were applied to statistical analysis.

**Results:** The serum level of TNF- $\alpha$  was significantly higher in T2DM patients without sitagliptin compared to HCs (p=0.002). Whereas, the serum level of TNF- $\alpha$  was significantly lower in patients with sitagliptin compared to patients without sitagliptin (p=0.01). The serum level of IL-10 showed a significant reduction in patients without sitagliptin compared to HCs (p=0.003). On the other hand, a significant elevation was observed in serum level of IL-10 between T2DM patients with and without sitagliptin (p=0.002). Considerably, no significant difference was observed in serum level of IL-1 $\beta$  between T2DM patients with and without sitagliptin and also in comparison to HCs.

**Conclusion:** Sitagliptin treatment significantly decreased the level of pro-inflammatory TNF- $\alpha$  and increased anti-inflammatory IL-10 in T2DM patients. It seems that sitagliptin had an anti-inflammatory effect on immune system of the patients.

**Keywords:** Diabetes Mellitus Type 2, Cytokines, Sitagliptin Phosphate, TNF- $\alpha$ , Interleukin-1, Interleukin-10.