

Effect of Sitagliptin and Vitamin D3 on Secretion of IL-6 and TNF- α Inflammatory Factors in Patients with Type 2 Diabetes

Elham Mahabadi-Ashtiyani¹, Vida Sheikh², Shiva Borzouei², Iraj Salehi³, Mahdi Alahgholi-Hajibehzad^{4,*}

¹ MSc Student of Immunology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

² Assistant Professor, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

³ Professor of Physiology, Neurophysiology Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

* **Corresponding Author:** Mahdi Alahgholi-Hajibehzad, Department of Immunology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. Email: mhajibehzad@yahoo.com

Abstract

Received: 14.07.2018

Accepted: 10.11.2018

How to Cite this Article:

Mahabadi-Ashtiyani E, Sheikh V, Borzouei S, Salehi I, Alahgholi-Hajibehzad M. Effect of Sitagliptin and Vitamin D3 on the Secretion of IL-6 and TNF- α Inflammatory Factors in Patients with Type 2 Diabetes. *Avicenna J Clin Med.* 2018; 25(3): 134-141. DOI: 10.21859/ajcm.25.3.134

Background and Objective: Diabetes mellitus is one of the most commonly reported diseases that is associated with insulin resistance and increased blood glucose levels. The aim of this study was to determine the probable anti-inflammatory effects of sitagliptin and vitamin D3 (VitD3) on pro-inflammatory IL-6 and TNF- α in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM).

Materials and Methods: In this case-control study, 20 blood samples of patients with T2DM and healthy controls (HCs) were collected (n=20). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated using the Ficoll-Paque method and cultured with Phytohemagglutinin (PHA) in the presence or absence of sitagliptin and VitD3 for 4 days. The enzyme-linked immunosorbent assay was used to analyze the levels of IL-6 and TNF- α produced by PBMCs.

Results: After PHA stimulation, the production of IL-6 was increased significantly in T2DM patients compared to HCs (P=0.03). Compared to PHA cultures, sitagliptin and VitD3 resulted in the reduction of IL-6 production in patients (P \leq 0.001, P \leq 0.001), and HCs (P=0.03, P=0.02), respectively. Moreover, with regard to the cultures with sitagliptin or VitD3, sitagliptin with VitD3 reduced the level of IL-6 in both groups of patients (P=0.02, P=0.002) and HCs (P=0.002, P=0.03). There was a significant reduction in the level of TNF- α by sitagliptin with VitD3 in patients (P=0.04, P=0.002) and HCs (P=0.04, P=0.03), compared to cultures with sitagliptin or VitD3.

Conclusion: According to the results, it can be concluded that the combined use of sitagliptin and VitD3 is more influential regarding the anti-inflammatory effects on patients. In addition, the reduction of sitagliptin dose may result in decreasing its possible side effects.

Keywords: Diabetes Mellitus Type 2, Sitagliptin, Vitamin D3

اثر سیتاگلیپتین و ویتامین D3 بر ترشح فاکتورهای التهابی TNF- α و IL-6 در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو

الهام مه‌آبادی آشتیانی^۱، ویدا شیخ^۲، شیوا برزویی^۲، ایرج صالحی^۲، مهدی اله‌قلی حاجی‌بهزاد^{۳*}

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

^۲ استادیار، گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

^۳ استادیار، گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

^۴ استادیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

* نویسنده مسئول: مهدی اله‌قلی حاجی‌بهزاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

ایمیل: mhajibehzad@yahoo.com

چکیده

سابقه و هدف: دیابت یکی از شایع‌ترین بیماری‌هایی است که با مقاومت انسولینی و افزایش میزان قند خون مشخص می‌شود. در این راستا، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر ضد التهابی احتمالی سیتاگلیپتین (Sitagliptin) و ویتامین D3 (VitD3) بر سایتوکاین‌های پیش‌التهابی IL-6 و TNF- α در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو (T2DM: Type 2 Diabetes Mellitus) انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد-شاهدی نمونه‌های خون از ۲۰ بیمار دیابتی نوع دو و ۲۰ فرد سالم جمع‌آوری شدند. سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی به روش فایکول جدا گشته و با PHA (Phytohemagglutinin) در حضور و عدم حضور سیتاگلیپتین و ویتامین D3 به مدت چهار روز کشت داده شدند. در ادامه، سطح IL-6 و TNF- α تولیدشده توسط سلول‌ها به روش الیزا اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها: تولید IL-6 در گروه بیماران پس از تحریک با PHA در مقایسه با افراد گروه کنترل افزایش معناداری را نشان داد ($P=0/03$). همچنین، سیتاگلیپتین باعث کاهش سطح IL-6 در بیماران ($P\leq 0/01$) و افراد گروه کنترل ($P=0/03$) در مقایسه با کشت‌های حاوی PHA گردید و ویتامین D3 منجر به کاهش سطح IL-6 در بیماران ($P\leq 0/01$) و گروه کنترل ($P=0/02$) در مقایسه با کشت‌های حاوی PHA شد. علاوه بر این، سیتاگلیپتین به همراه ویتامین D3 باعث کاهش IL-6 در مقایسه با کشت‌های دارای سیتاگلیپتین یا ویتامین D3 هم در گروه بیمار ($P=0/02$, $P=0/02$) و هم در گروه کنترل ($P=0/03$, $P=0/02$) گردید. شایان ذکر است که سیتاگلیپتین به همراه ویتامین D3 باعث کاهش مضاعف TNF- α در مقایسه با کشت‌های دارای سیتاگلیپتین یا ویتامین D3 هم در گروه بیمار ($P=0/04$, $P=0/02$) و هم در گروه کنترل ($P=0/04$, $P=0/03$) گشت.

نتیجه‌گیری: مصرف ویتامین D3 به همراه سیتاگلیپتین، اثر ضد التهابی بیشتری در بیماران دارد و ممکن است با کاهش دوز مصرفی سیتاگلیپتین به کاهش اثرات جانبی احتمالی این دارو کمک کند.

واژگان کلیدی: دیابت شیرین نوع دو، سیتاگلیپتین، ویتامین D3

مقدمه

متفورمین و دسته سولفونیل اوره‌ها نظیر گلیکلازید آغاز می‌کنند. متفورمین سبب کاهش گلوکونئوز و افزایش مصرف محیطی گلوکز شده و گلیکلازید باعث تحریک و آزاد شدن مقادیر بیشتر انسولین از پانکراس و تنظیم میزان قند خون محیطی می‌گردد. اخیراً از مهارکننده‌های دی‌پپتیدیل پپتیداز-۴ (DPP-4: Dipeptidyl Peptidase-4) مانند سیتاگلیپتین

دیابت نوع دو (T2DM) یکی از شایع‌ترین بیماری‌هایی است که با مقاومت انسولینی و افزایش میزان قند خون مشخص می‌شود [۱]. با توجه به نقش سلول‌های ایمنی در تولید سایتوکاین و ایجاد شرایط التهابی می‌توان این سلول‌ها را در روند بیماری‌زایی دیابت در نظر گرفت [۲]. پزشکان معمولاً روند درمانی T2DM را با تجویز داروهای آنتی‌دیابتیک مانند

تولید سلول‌های Th17 و مهار سلول‌های T تنظیمی تولیدکننده TGF- β به‌عنوان فاکتوری مهم در حفظ تعادل Th17/Treg و در نهایت حفظ تعادل سیستم ایمنی بدن مطرح می‌باشد [۱۰، ۱۵].

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که سطح سرمی سایتوکاین‌های التهابی مانند IL-6 و TNF- α در بیماران مبتلا به دیابت نوع یک افزایش می‌یابد [۱۶، ۱۷]. علاوه بر این، تحقیقات متنوعی نشان از افزایش میزان سطح سرمی فاکتورهای التهابی مانند CRP، IFN- γ و IL-17 و همچنین فعال شدن آن‌ها در دیابت نوع دو دارند. شایان ذکر است که لوکوسیت‌های افزایش‌یافته ممکن است منبع اصلی ترشح این فاکتورها باشند. این مطالعات سطح سرمی این فاکتورهای التهابی را در بیماران مبتلا به دیابت نوع یک یا دو بررسی نموده‌اند. در مطالعه حاضر به‌صورت *in vitro* و در محیط کشت سلولی، میزان تولید سایتوکاین‌های TNF- α و IL-6 توسط سلول‌های سیستم ایمنی بررسی گردید. بر مبنای نتایج، سلول‌های T بیشترین نقش را در تولید فاکتورهای التهابی و پاتوژن بیماری دیابت نوع دو دارند. از آنجایی که محرک مورد استفاده در این مطالعه PHA بود، بیشتر سلول‌های T موجود در Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) مد نظر قرار گرفتند. اطلاعات بسیار کمی در ارتباط با تأثیر داروی سیتاگلیپتین بر فاکتورهای التهابی ترشح‌شده از سلول‌های سیستم ایمنی در بیماری دیابت در دسترس می‌باشد و مطالعه‌ای در ارتباط با تأثیر همزمان ویتامین D3 و سیتاگلیپتین بر شرایط التهابی در بیماران دیابت نوع دو انجام نشده است؛ از این رو مطالعه حاضر با هدف تعیین میزان اثر سیتاگلیپتین و ویتامین D3 به‌صورت جداگانه و همچنین تأثیر همزمان این دو ماده بر ترشح سایتوکاین‌های التهابی IL-6 و TNF- α از سلول‌های سیستم ایمنی بدن در بیماران دیابتی نوع دو و گروه کنترل انجام شد.

مواد و روش‌ها

جامعه و نمونه پژوهش

در این مطالعه مورد-شاهدی بیماران دیابتی نوع دو از بین مراجعه‌کنندگان به بیمارستان شهید بهشتی دانشگاه علوم پزشکی شهر همدان وارد مطالعه شدند. پس از توضیح اهداف و اخذ رضایت‌نامه کتبی، ۲۰ بیمار مبتلا به دیابت نوع دو که داروهای متفورمین با دوز ۱۵۰۰ میلی‌گرم در روز و گلیکلازید با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در روز را دریافت می‌کردند و واجد معیارهای زیر بودند، توسط پزشک وارد مطالعه شدند: تشخیص بیماری توسط پزشک متخصص براساس معیار American Diabetes Association سال ۲۰۱۶؛ میزان قند ناشتای پلاسمای مساوی و یا بیشتر از ۱۲۶ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر و میزان قند خون پس از غذای مساوی و یا بیشتر از ۲۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر؛ شاخص HbA1c (Hemoglobin A1c) مساوی و یا بیشتر از ۶/۵ درصد؛

به‌عنوان عوامل ضد دیابتیک با اثرات محافظتی بر کلیه در درمان T2DM استفاده می‌شود. سیتاگلیپتین با تحریک ترشح انسولین از پانکراس باعث کاهش غلظت گلوکز خون گشته و با مهار بازجذب توپولار سدیم موجب کاهش فشار گلوومرول و آلبومینوری می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که مصرف سیتاگلیپتین به‌عنوان داروی کاهنده قند خون باعث مهار پاسخ التهابی سیستم ایمنی بدن نیز می‌شود [۲]. علاوه بر این، مطالعات مختلف گویای آن هستند که تجویز خوراکی داروی سیتاگلیپتین باعث کاهش سطح سرمی برخی از سایتوکاین‌های التهابی مانند IFN- γ در بیماران T2DM می‌گردد [۴]. از سوی دیگر، مطالعات مختلف حاکی از کاهش فاکتورهای التهابی مانند CRP (C-reactive Protein) و ESR (Erythrocyte Sedimentation Rate) در اثر مصرف داروی سیتاگلیپتین در بیماران T2DM می‌باشند [۵، ۶]. در مطالعه‌ای که توسط آسو و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام شد، سطح داخل سلولی سایتوکاین‌های التهابی IL-17 پس از چهار هفته درمان با سیتاگلیپتین در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو کاهش یافت [۳]. همچنین در مطالعه پینهر و همکاران مشخص شد که افزودن سیتاگلیپتین به محیط کشت سلولی باعث کاهش سطح IFN- γ و IL-17 تولیدشده از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی می‌گردد [۷].

فرم فعال ویتامین D یا ویتامین D3 دارای خاصیت ایمنومودولاتوری می‌باشد که با تأثیر بر سلول‌های سیستم ایمنی بدن نظیر لنفوسیت‌ها و منوسیت‌ها سبب کاهش ترشح سایتوکاین‌های التهابی مانند IFN- γ و افزایش سایتوکاین‌های مهاری مانند IL-4 می‌شود [۸]. کمبود ویتامین D با تغییرات غلظت گلوکز و انسولین خون و میزان حساسیت به انسولین در ارتباط است [۹]. باید خاطر نشان ساخت که اثرات مفید مصرف ویتامین D3 به‌عنوان یک مکمل ایمن و کاهش‌دهنده پاسخ التهابی و بهبود علائم و پارامترهای کلینیکی در بیماری‌های خودایمن مانند میاستنیا گراویس مشاهده شده است [۱۰]. در بیماری مالتیپل اسکلروزیس (MS: Multiple Sclerosis) مصرف ویتامین D باعث کاهش IFN- γ می‌شود [۱۱]. برخی از پژوهشگران نیز بر این باور هستند که مصرف مکمل ویتامین D در بیماران مبتلا به لوپوس منجر به کاهش درصد سلول‌های التهابی Th1 و Th17 می‌گردد [۱۲].

TNF- α یک سایتوکاین التهابی است که به‌طور عمده توسط لنفوسیت‌های T و ماکروفاژها تولید می‌شود و موجب ایجاد تغییرات متابولیکی و سلولی در بسیاری از بیماری‌های التهابی نظیر T2DM می‌گردد [۱۳]. این سایتوکاین در مقاومت به انسولین افزایش می‌یابد که این امر نشان‌دهنده نقش احتمالی آن در بروز و پیشبرد بیماری دیابت می‌باشد (۱۴). IL-6 نیز یک سایتوکاین التهابی است که توسط سلول‌های سیستم ایمنی تولید می‌شود و میزان آن در بدن با میزان حساسیت به انسولین و تحمل گلوکز در ارتباط است [۱۴]. این سایتوکاین با القای

تحریک و کشت سلول‌ها

سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (تعداد 2×10^5 سلول) درون پلیت‌های استریل کشت سلولی قرار داده شدند و به مدت چهار روز با محرک PHA (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، ویتامین D3 (10^{-8} مولار) و سیتاگلیپتین (۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تحریک گردیدند. ذکر این نکته ضرورت دارد که دوز مواد مورد استفاده مطابق با مطالعات پیشین انتخاب شد [۱۹، ۲۰]. به‌منظور کنترل از چاهک‌های بدون سیتاگلیپتین و ویتامین D3 استفاده گردید. کلیه مراحل کشت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس و CO₂ ۵ درصد انجام شد. پس از چهار روز مایع رویی کشت سلولی جمع‌آوری گردید و در دمای ۷۰- درجه نگهداری شد.

اندازه‌گیری فاکتورهای التهابی

سطح فاکتورهای التهابی IL-6 و TNF- α تولیدشده از سلول‌های کشت‌داده‌شده توسط کیت الایزا (Biolegend, USA) و براساس دستورالعمل کیت سازنده اندازه‌گیری شد. با توجه به پراکندگی داده‌ها به‌منظور مقایسه گروه‌های مورد مطالعه از آزمون‌های آماری Mann-Whitney U و Wilcoxon استفاده گردید. علاوه‌براین، برای تحلیل داده‌ها نرم‌افزار SPSS 21 و جهت رسم نمودارها نرم‌افزار Graph Pad Prism 6.07 مورد استفاده قرار گرفت. سطح معناداری نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

ویژگی‌های کلینیکی و دموگرافیک افراد مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، گروه کنترل و بیمار به لحاظ سن، جنس، طول دوره بیماری، میزان کراتینین

نداشتن بیماری خودایمن، نئوپلازی خونی و بافتی و پانکراتیت؛ عدم مصرف استروئید، انسولین و داروهای مهارکننده سیستم ایمنی. معیارهای خروج نیز عبارت بودند از: سن زیر ۱۸ سال و بالای ۶۰ سال، میزان HbA1c کمتر از ۶/۵ درصد و بیشتر از ۹ درصد و مصرف الکل و سیگار. از سوی دیگر، ۲۰ فرد سالم به‌عنوان گروه کنترل پس از معاینه بالینی و آزمایشگاهی توسط پزشک، در صورت نداشتن بیماری دیابت نوع دو، بیماری‌های خودایمن و نئوپلازی و بیماری مزمن دیگر و همچنین عدم مصرف سیگار و الکل وارد مطالعه شدند. باید خاطرنشان ساخت که گروه کنترل تا حد ممکن به لحاظ سن و جنس با گروه بیمار مطابقت داده شد.

خون‌گیری و جداسازی سلول‌های خون محیطی

در ابتدای مطالعه ۱۰ میلی‌لیتر خون وریدی از بازوی بیماران و گروه کنترل در شرایط ناشتا و در لوله‌های استریل حاوی EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid) گرفته شد. برای جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی از پروتکل استاندارد استفاده شد [۱۸]. به‌طور خلاصه، خون به نسبت یک به یک با بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) استریل مخلوط گردید و سپس به نسبت سه به یک به فایکول استریل منتقل شد. پس از سانتریفیوژ، سلول‌های تک‌هسته‌ای جداشده در محیط کشت استاندارد سلولی حاوی RPMI 1640 (France, Biosera)، پنی‌سیلین (۱۰۰۰۰ واحد بر میلی‌لیتر، France, Biosera)، استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، France, Biosera)، ال‌گلوتامین (۲ میلی‌متر، France, Biosera) و سرم گاوی غیرفعال ۱۰ درصد (FBS, France, Biosera) نگهداری گردیدند [۱۹]. شایان ذکر است که شمارش سلول‌های زنده توسط تریپان بلو در زیر میکروسکوپ انجام شد.

جدول ۱: ویژگی‌های جمعیت‌شناسی و بالینی بیماران و افراد سالم مورد مطالعه

سطح معناداری	گروه بیمار	گروه کنترل	
NS	۱۴ به ۶	۱۲ به ۸	جنسیت (زن به مرد)
NS	۴۸/۱۵±۸/۵۲	۴۵/۴۲±۹/۷۲	سن (سال)
NS	۷۴/۳۶±۶/۸۵	۷۰±۹/۷	وزن (کیلوگرم)
NS	۱/۶۸±۰/۲	۱/۷۲±۰/۱	قد (متر)
NS	۲۴/۸۱±۲/۸	۲۳/۲±۲/۵	BMI (کیلوگرم/مترمربع)
≤۰/۰۰۱	۱۵۴/۵۴±۵۴/۷۱	۸۲/۲۵±۷/۱۲	قند ناشتای پلاسما (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)
≤۰/۰۰۱	۲۳۷/۲۵±۹۸/۵	۱۰۱/۵۴±۱۵/۶۵	قند بعد از غذای پلاسما (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)
≤۰/۰۰۱	۷/۴±۰/۷۷	۴/۷±۰/۵۸	HbA1c (درصد)
NS	۱۱/۵۴±۶/۲۱	۹/۳۶±۵/۲	آلبومینوری (میلی‌گرم در روز)
NS	۱/۰۲±۰/۱۵	۰/۹۸±۰/۱	کراتینین سرم (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)
NS	۷۲/۶۷±۸/۰۱	۷۵/۶۲±۱۱	GFR (میلی‌لیتر در دقیقه بر ۱/۷۳ متر مربع)
NS	۴/۵۰±۲/۱۶	-	طول دوره بیماری (سال)

BMI: Body Mass Index; HbA1C: Hemoglobin A1C; GFR: Glomerular filtration rate; NS: Not Significant

مقادیر بر حسب میانگین±انحراف معیار بیان شده‌اند.

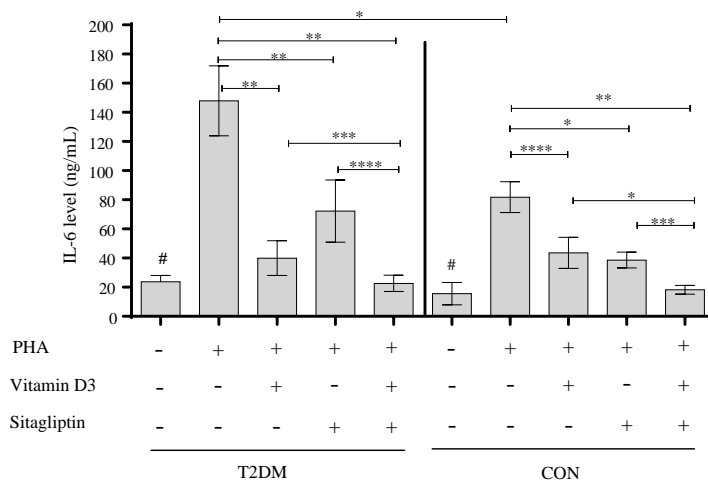
(شکل‌های ۱ و ۲).

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، سطح پایه IL-6 (تنها تحریک با PHA) در بیماران T2DM به شکل معناداری بالاتر از گروه کنترل می‌باشد ($P=0/03$). بر مبنای نتایج با اضافه کردن سیتاگلیپتین به محیط کشت سلولی، سطح IL-6 تولیدشده توسط سلول‌های ایمنی در گروه‌های کنترل ($P=0/03$) و بیمار ($P\leq 0/001$) نسبت به سطح پایه کاهش معناداری پیدا کرده است. همچنین، افزودن ویتامین D3 سبب کاهش IL-6 در گروه کنترل ($P=0/02$) و بیمار ($P\leq 0/001$) نسبت به سطح پایه شده است. افزودن همزمان ویتامین D3 به همراه سیتاگلیپتین در محیط کشت سلولی نیز باعث کاهش مؤثر میزان IL-6 تولیدشده در سطح پایه در هر دو گروه کنترل ($P\leq 0/001$) و بیمار ($P\leq 0/001$) شده است. شایان ذکر می‌باشد که اثر همزمان سیتاگلیپتین و ویتامین D3 بر کاهش سطح IL-6 تولیدشده از سلول‌های ایمنی بیشتر از تأثیر هر کدام از این

سرم، آلبومینوری، GFR (Glomerular Filtration Rate)، قد و وزن تفاوت معناداری نداشته‌اند. میزان قند خون ناشتا، قند بعد از غذا و HbA1c نیز در گروه بیمار افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل داشته است ($P\leq 0/001$).

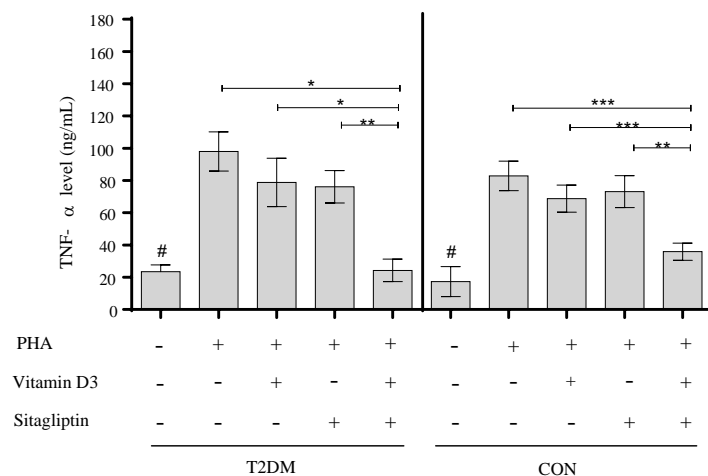
اثر سیتاگلیپتین و ویتامین D3 بر تولید IL-6 و TNF- α

به منظور بررسی اثر سیتاگلیپتین و ویتامین D3 بر تولید فاکتورهای التهابی، لنفوسیت‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی بیماران و افراد سالم پس از تحریک با PHA در حضور و عدم حضور سیتاگلیپتین و ویتامین D3 کشت داده شدند. پس از چهار روز مایع حاصل از کشت سلولی جمع‌آوری گردید و میزان سایتوکاین‌های IL-6 و TNF- α اندازه‌گیری شد. پس از تحریک با PHA، سطح IL-6 و TNF- α تولیدشده توسط سلول‌های ایمنی در گروه‌های بیمار و کنترل افزایش پیدا کرد که این امر نشان‌دهنده تحریک مؤثر این ماده می‌باشد ($P\leq 0/001$).



شکل ۱: اثر سیتاگلیپتین، ویتامین D3 و اثر همزمان این دو ماده بر سطح سایتوکاین IL-6

$P\leq 0/001$ در مقایسه با کشت‌های حاوی PHA؛ $P=0/03^*$ ؛ $P\leq 0/001^{**}$ ؛ $P=0/002^{***}$ ؛ $P=0/00002^{****}$



شکل ۲: اثر سیتاگلیپتین، ویتامین D3 و اثر همزمان این دو ماده بر سطح سایتوکاین TNF- α

$P\leq 0/001$ در مقایسه با کشت‌های حاوی PHA؛ $P=0/002^*$ ؛ $P=0/0004^{**}$ ؛ $P=0/00003^{***}$

مواد به تنهایی است.

با توجه به شکل ۲ افزودن سیتاگلیپتین یا ویتامین D3 به محیط کشت سلولی تفاوت معناداری را در سطح TNF- α در گروه‌های کنترل و بیمار ایجاد نکرده است. از سوی دیگر، استفاده از ویتامین D3 به همراه سیتاگلیپتین در محیط کشت سلولی منجر به کاهش مؤثر میزان TNF- α تولیدشده در هر دو گروه کنترل ($P=0/03$) و بیمار ($P=0/002$) شده است. بر مبنای نتایج اثر همزمان سیتاگلیپتین و ویتامین D3 بر کاهش سطح TNF- α بیشتر از تأثیر هر یک از این دو ماده به تنهایی می‌باشد؛ اما سطح پایه TNF- α (پس از تحریک با PHA) در گروه بیمار و گروه کنترل تفاوت معناداری را نشان نمی‌دهد.

بحث

دیابت نوع دو یک بیماری التهابی مزمن است که پاتوژنز آن در ارتباط با سلول‌های سیستم ایمنی، فعال شدن مسیرهای التهابی و تولید برخی از سایتوکاین‌های التهابی می‌باشد [۲]. در این مطالعه به‌منظور تعیین میزان سایتوکاین‌های التهابی IL-6 و TNF- α در بیماران T2DM، سطح پایه این سایتوکاین‌ها در بیماران مبتلا به T2DM و گروه کنترل اندازه‌گیری شد. همچنین، تأثیر جداگانه سیتاگلیپتین و ویتامین D3 بر میزان تولید این دو سایتوکاین در محیط کشت سلولی و نیز اثر همزمان این دو ماده بر بهبود شرایط التهابی در بیماران بررسی گردید.

نتایج به‌دست‌آمده نشان‌دهنده افزایش سطح IL-6 در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل می‌باشد. تولید سایتوکاین IL-6 نیز تحت تأثیر سیتاگلیپتین و ویتامین D3 کاهش یافته است. باید خاطر نشان ساخت که استفاده همزمان سیتاگلیپتین و ویتامین D3 بر کاهش مضاعف سطح این سایتوکاین مؤثر می‌باشد. مطالعات پیشین بیانگر افزایش فاکتورهای التهابی در بیماران مبتلا به T2DM هستند. مطالعات نشان داده‌اند که سطح CRP در بیماران مبتلا به T2DM افزایش می‌یابد [۵،۲۱]. فاکتور پیش‌التهابی CRP یک پروتئین فاز حاد است که به‌عنوان یک مارکر فیزیولوژیک حساس در التهابات افزایش می‌یابد. در این ارتباط در مطالعه‌ای که توسط ژنگ و همکاران صورت گرفت، مشخص شد که سطح IL-17 و IFN- γ تولید شده در محیط کشت سلولی در اثر تحریک با میتوزن در بیماران مبتلا به T2DM نسبت به گروه کنترل بیشتر می‌باشد [۲۲]. همچنین سطح سرمی سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند IL-1 β ، IFN- γ و IL-17 در بیماران دیابتی نوع دو افزایش نشان می‌دهد [۲۳]. یکی از ویژگی‌های بارز بیماری‌های التهابی مانند دیابت نوع دو، ارتشاح سلول‌های سیستم ایمنی مانند لنفوسیت‌های T و ماکروفاژها به بافت‌های ملتهب می‌باشد. این لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها با تولید مقادیر زیادی از سایتوکاین‌های التهابی مانند IL-6 و TNF- α باعث ایجاد آسیب بافتی می‌شوند [۲۴]. علاوه‌براین، در مطالعات پیشین ارتباط میان افزایش IL-6 با

پاتوژنز و پیشبرد بیماری T2DM نشان داده شده است [۲۵]. در مطالعه حاضر سطح IL-6 به‌عنوان یک مارکر التهابی در گروه بیماران T2DM بالاتر از گروه کنترل بود. در این راستا، در مطالعه پیکاپ و همکاران افزایش سطح IL-6 در پلاسما و همچنین سوپرناتانت کشت سلولی بیماران T2DM در تحریک با LPS (Lipopolysaccharides) نسبت به گروه کنترل نشان داده شد [۲۶]. از سوی دیگر، در متآنالیزی در سال ۲۰۱۷ گزارش گردید که IL-6 در بیماران مبتلا به دیابت نوع یک افزایش می‌یابد و این سایتوکاین در پاتوژنز این بیماری نقش مهمی را ایفا می‌کند [۲۷]. IL-6 باعث مقاومت انسولینی از طریق اختلال در فسفریلاسیون گیرنده‌های انسولین و مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی در هپاتوسیت‌ها و آدیپوسیت‌ها می‌شود [۲۸]؛ از این رو ممانعت از فعالیت و سیگنالینگ IL-6 می‌تواند در جلوگیری از بیماری‌های التهابی به‌ویژه T2DM و بهبود علائم این بیماری‌ها مؤثر باشد.

سیتاگلیپتین که به‌عنوان دارویی جهت کاهش قند خون در درمان بیماران دیابتی استفاده می‌شود، دارای اثرات ایمونومدولاتوری نیز می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سطح سایتوکاین IL-6 در بیماران و گروه کنترل پس از تحریک با سیتاگلیپتین به‌صورت *in vitro* کاهش می‌یابد. در این راستا در مطالعه‌ای که توسط ویچنسکی و همکاران انجام شد، سطح پلاسمایی فاکتورهای التهابی مانند IL-6 پس از درمان با سیتاگلیپتین به‌صورت *in vivo* کاهش یافت [۲۹]. ماکدوسی و همکاران نیز در مطالعات خود نشان دادند که سطح IL-6 پس از ۱۲ هفته درمان با سیتاگلیپتین در سرم افراد دیابتی و گروه کنترل کاهش می‌یابد [۳۰]. شایان ذکر است که ویتامین D3 دارای اثرات تنظیمی در سیستم ایمنی می‌باشد. چندین مطالعه نشان داده‌اند که ویتامین D3 به‌عنوان تنظیم‌کننده منفی TNF- α و IL-6 هم در *in vitro* و هم در *in vivo* در بیماری‌های خودایمن مانند مالتهپیل اسکروزیس و بیماری التهابی روده عمل می‌کند. در این مطالعه مشاهده شد که ویتامین D3 باعث کاهش سطح IL-6 تولیدشده توسط سلول‌های ایمنی در بیماران T2DM و گروه کنترل می‌گردد. در این ارتباط، شب‌بیدار و همکاران نشان دادند که مصرف مکمل خوراکی ویتامین D3 به مدت ۱۲ هفته باعث کاهش معنادار میزان CRP و IL-6 در بیماران T2DM می‌شود [۳۱].

TNF- α یک سایتوکاین التهابی مهم است که در ایجاد مقاومت انسولینی نقش دارد. این سایتوکاین با اختلال در بیان یکی از ترانسپورترهای گلوز (GLUT4) و مهار فسفریلاسیون گیرنده انسولین باعث ایجاد مقاومت انسولینی می‌شود [۳۲]. در مطالعه پیکاپ افزایش سطح TNF- α در بیماران مبتلا به T2DM در اثر تحریک با LPS در محیط کشت سلولی مشاهده گردید [۲۶]. همچنین مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۷ نشان داد که سطح سرمی TNF- α در بیماران دیابتی نوع یک نسبت به

یکی از محدودیت‌های مطالعه حاضر استفاده از دوزهای ثابت سیتاگلیپتین و مکمل ویتامین D3 بود؛ از این رو توصیه می‌شود در مطالعات بعدی از دوزهای مختلف این مواد استفاده گردد. دیگر محدودیت این مطالعه عدم تفکیک جنسیتی گروه‌های مطالعه به دلیل حجم کم نمونه بود. در این راستا، گروه‌بندی بیماران براساس زن و مرد می‌تواند در مطالعات بعدی مد نظر قرار گیرد. علاوه بر این، در این مطالعه اثر سیتاگلیپتین و مکمل ویتامین D3 بر سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در بیماران دیابتی نوع دو مورد بررسی قرار گرفت. در این ارتباط، توصیه می‌شود در مطالعات آینده اثر این مواد بر سلول‌های TCD4⁺ ایزوله و در زیرگروه‌های بالینی بیماری مانند نفروپاتی دیابتی، رتینوپاتی دیابتی و نوروپاتی دیابتی بررسی گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده همزمان از مکمل ویتامین D3 و سیتاگلیپتین به‌طور مؤثرتری باعث کاهش پاسخ‌های التهابی (کاهش تولید سایتوکاین‌های IL-6 و TNF- α) می‌شود؛ از این رو مصرف مکمل ویتامین D3 به همراه داروی سیتاگلیپتین جهت کاهش دوز مصرفی دارو و جلوگیری از عوارض احتمالی آن در درمان بیماری توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی هیأت علمی مصوب دانشگاه علوم پزشکی همدان به شماره ۹۶۰۸۱۶۵۱۳۷ می‌باشد. بدین‌وسیله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان به دلیل تأمین منابع مالی و نیز از تمامی بیماران و افرادی که در راستای انجام این پژوهش همکاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد. شایان ذکر است که نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان در تعارض نمی‌باشد.

REFERENCES

- Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Med J*. 2012;27(4):269-73. PMID: 23071876 DOI: 10.5001/omj.2012.68
- 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(4):e12711. PMID: 30270447 DOI: 10.1111/sji.12711
- Aso Y, Fukushima M, Sagara M, Jojima T, Iijima T, Suzuki K, et al. Sitagliptin, a DPP-4 inhibitor, alters the subsets of circulating CD4+ T cells in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2015;110(3):250-6. PMID: 26508675 DOI: 10.1016/j.diabres.2015.10.012
- Sromova L, Busek P, Posova H, Potockova J, Skrha P, Andel 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;118:183-92. PMID: 27388675 DOI: 10.1016/j.diabres.2016.06.020
- Yokota K, Igaki N. Sitagliptin (DPP-4 inhibitor)-induced rheumatoid arthritis in type 2 diabetes mellitus: a case report. *Intern Med*. 2012;51(15):2041-4. PMID: 22864134
- 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(9):1141-8. PMID: 25034387 DOI: 10.1016/j.metabol.2014.06.004
- 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. PMID: 28065853 DOI: 10.1016/j.ejps.2016.12.040
- 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. *Hum Immunol*. 2018;79(6):439-45. PMID: 29522785 DOI: 10.1016/j.humimm.2018.03.001
- Borissova AM, Tankova T, Kirilov G, Dakovska L, Kovacheva R. The effect of vitamin D3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *Int J Clin Pract*. 2003;57(4):258-61. PMID: 12800453
- Alahgholi-Hajibehzad M, Kasapoglu P, Jafari R, Rezaei N.

- The role of T regulatory cells in immunopathogenesis of myasthenia gravis: implications for therapeutics. *Expert Rev Clin Immunol*. 2015;**11**(7):859-70. [PMID: 25973691](#) [DOI: 10.1586/1744666X.2015.1047345](#)
11. Aivo J, Hanninen A, Ilonen J, Soilu-Hanninen M. Vitamin D3 administration to MS patients leads to increased serum levels of latency activated peptide (LAP) of TGF-beta. *J Neuroimmunol*. 2015;**280**:12-5. [PMID: 25773149](#) [DOI: 10.1016/j.jneuroim.2015.01.005](#)
 12. Terrier B, Derian N, Schoindre Y, Chaara W, Geri G, Zahr N, et al. Restoration of regulatory and effector T cell balance and B cell homeostasis in systemic lupus erythematosus patients through vitamin D supplementation. *Arthritis Res Ther*. 2012;**14**(5):R221. [PMID: 23075451](#) [DOI: 10.1186/ar4060](#)
 13. Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2008;**19**(3):433-42. [PMID: 18256353](#) [DOI: 10.1681/ASN.2007091048](#)
 14. Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;**280**(6):E827-47. [PMID: 11350765](#) [DOI: 10.1152/ajpendo.2001.280.6.E827](#)
 15. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*. 2010;**40**(7):1830-5. [PMID: 20583029](#) [DOI: 10.1002/eji.201040391](#)
 16. Qiao YC, Chen YL, Pan YH, Tian F, Xu Y, Zhang XX, et al. The change of serum tumor necrosis factor alpha in patients with type 1 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017;**12**(4):e0176157. [PMID: 28426801](#) [DOI: 10.1371/journal.pone.0176157](#)
 17. Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes*. 2005;**54**(Suppl 2):S114-24. [PMID: 16306329](#)
 18. 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**(2):201-7. [PMID: 28671717](#) [DOI: 10.1111/cei.13006](#)
 19. Zamani A, Salehi I, Alahgholi-Hajibehzad M. Moderate exercise enhances the production of interferon-gamma and interleukin-12 in peripheral blood mononuclear cells. *Immune Netw*. 2017;**17**(3):186-91. [PMID: 28680380](#) [DOI: 10.4110/in.2017.17.3.186](#)
 20. Mahdavinjad L, Alahgholi-Hajibehzad M, Eftekharian MM, Zaerighaneh Z, Salehi I, Hajilooi M, et al. Extremely low frequency electromagnetic fields decrease serum levels of interleukin-17, transforming growth factor-beta and downregulate foxp3 expression in the spleen. *J Interferon Cytokine Res*. 2018;**38**(10):457-62. [PMID: 30328796](#) [DOI: 10.1089/jir.2018.0048](#)
 21. Belfki H, Ben Ali S, Bougatef S, Ben Ahmed D, Haddad N, Jmal A, et al. Association between C-reactive protein and type 2 diabetes in a Tunisian population. *Inflammation*. 2012;**35**(2):684-9. [PMID: 21769439](#) [DOI: 10.1007/s10753-011-9361-1](#)
 22. 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 (Berl)*. 2012;**90**(2):175-86. [PMID: 21964948](#) [DOI: 10.1007/s00109-011-0816-5](#)
 23. 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;**2016**:3694957. [PMID: 27777959](#) [DOI: 10.1155/2016/3694957](#)
 24. Kim JH, Bachmann RA, Chen J. Interleukin-6 and insulin resistance. *Vitam Horm*. 2009;**80**:613-33. [PMID: 19251052](#) [DOI: 10.1016/S0083-6729\(08\)00621-3](#)
 25. Wang X, Bao W, Liu J, Ouyang YY, Wang D, Rong S, et al. Inflammatory markers and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*. 2013;**36**(1):166-75. [PMID: 23264288](#) [DOI: 10.2337/dc12-0702](#)
 26. 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**(3):291-300. [PMID: 10983873](#)
 27. Chen YL, Qiao YC, Pan YH, Xu Y, Huang YC, Wang YH, et al. Correlation between serum interleukin-6 level and type 1 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Cytokine*. 2017;**94**:14-20. [PMID: 28283222](#) [DOI: 10.1016/j.cyt.2017.01.002](#)
 28. Rehman K, Akash MS, Liaqat A, Kamal S, Qadir MI, Rasul A. Role of interleukin-6 in development of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2017;**27**(3):229-36. [PMID: 29199608](#) [DOI: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2017019712](#)
 29. Wiciński M, Wódkiewicz E, Slupski M, Walczak M, Socha M, Malinowski B, et al. Neuroprotective activity of sitagliptin via reduction of neuroinflammation beyond the incretin effect: focus on alzheimer's disease. *Biomed Res Int*. 2018;**2018**:6091014. [PMID: 30186862](#) [DOI: 10.1155/2018/6091014](#)
 30. Makdissi A, Ghanim H, Vora M, Green K, Abuaysheh S, Chaudhuri A, et al. Sitagliptin exerts an antiinflammatory action. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;**97**(9):3333-41. [PMID: 22745245](#) [DOI: 10.1210/jc.2012-1544](#)
 31. Shab-Bidar S, Neyestani TR, Djazayeri A, Eshraghian MR, Houshiarrad A, Kalayi A, et al. Improvement of vitamin D status resulted in amelioration of biomarkers of systemic inflammation in the subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012;**28**(5):424-30. [PMID: 22344966](#) [DOI: 10.1002/dmrr.2290](#)
 32. 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**(1):105-10. [PMID: 28569437](#) [DOI: 10.1002/jcb.26174](#)
 33. 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**(3):347-51. [PMID: 23062489](#) [DOI: 10.1016/j.metabol.2012.09.004](#)
 34. Atkin SL, Katsiki N, Banach M, Mikhailidis DP, Pirro M, Sahebkar A. Effect of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on circulating tumor necrosis factor-alpha concentrations: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. *J Diabetes Complications*. 2017;**31**(9):1458-64. [PMID: 28647512](#) [DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2017.05.016](#)
 35. Shih EM, Mittelman S, Pitukcheewanont P, Azen CG, Monzavi R. Effects of vitamin D repletion on glycemic control and inflammatory cytokines in adolescents with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2016;**17**(1):36-43. [PMID: 25524404](#) [DOI: 10.1111/pedi.12238](#)