

Original Article



Association of Interleukin-32 α with Interleukin-35 and Transforming Growth Factor- β Produced by the Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

Vida Sheikh¹, Zahra Sardarmelli², Mahdi Behzad^{2*}¹ Department of Internal Medicine, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran² Department of Immunology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Abstract

Article history:

Received: 22 February 2023

Revised: 13 April 2023

Accepted: 02 May 2023

ePublished: 14 June 2023

*Corresponding author: Mahdi Behzad, Department of Immunology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.
Email: m.behzad@umsha.ac.ir

Background and Objective: Cytokine production was shown to be changed in Type 2 diabetes mellitus (T2DM). Nonetheless, the relationship of pro-inflammatory interleukin (IL)-32 α with anti-inflammatory IL-35 and transforming growth factor (TGF)- β is unclear in T2DM. The present study aimed to evaluate the IL-32 α , IL-35, and TGF- β levels produced by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in patients compared to healthy controls (HCs). Correlations between the IL-32 α and IL-35 and TGF- β , as well as between those cytokines and paraclinical parameters [(fasting plasma glucose (FPG) and hemoglobin A1c (HbA1c), GFR, albumin, and creatinine)] were assessed.

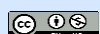
Materials and Methods: Blood samples were taken from 38 patients and 38 HCs. The PBMCs from each donor were isolated with the ficoll method and cultured with in vitro stimulator for four days. The production of IL-32 α , IL-35, and TGF- β in culture supernatants was determined with ELISA. Paraclinical parameters were evaluated by standard laboratory methods.

Results: High levels of IL-32 α and low levels of IL-35 were found in patients compared to in HCs ($P=0.006$; $P<0.001$). A negative correlation between IL-32 α and IL-35 was detected in patients ($P<0.001$). IL-32 α was positively correlated with FPG and HbA1c ($P=0.002$, $P=0.005$), whereas IL-35 was negatively correlated with them in patients (both $P<0.001$). No correlations were detected between the cytokines and BMI, GFR, albumin, and creatinine, as well as between the TGF- β levels.

Conclusion: Increased IL-32 α but diminished IL-35 production are linked with each other and with the glucose metabolism parameters in T2DM. It seems that IL-32 α and IL-35 have a potential role in T2DM pathogenesis.

Keywords: Diabetes Mellitus Type 2, Interleukin 32, Interleukin 35, Transforming Growth Factor Beta

Please cite this article as follows: Sheikh V, Sardarmelli Z, Behzad M. Association of Interleukin-32 α with Interleukin-35 and Transforming Growth Factor- β Produced by the Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. Avicenna J Clin Med. 2023; 30(1): 5-13. DOI: 10.32592/ajcm.30.1.5



ارتباط بین اینترلوکین ۳۲ آلفا با اینترلوکین ۳۵ و فاکتور رشد تغییر دهنده بتا تولید شده از سلول های تک هسته ای خون محیطی در بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع دو

ویدا شیخ^۱ ID، زهرا سردار ملی^۲، مهدی بهزاد^{۲*} ID

^۱ گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

^۲ گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: تغییرات ترشحی سایتوکاین ها در بیماری دیابت شیرین نوع دو (T2DM) مشاهده شده است. نقش و ارتباط اینترلوکین پیش التهابی ۳۲ آلفا (IL-32α) با سایتوکاین های ضد التهابی IL-35 و فاکتور رشد تغییر دهنده بتا (TGF-β) در این بیماری مشخص نیست. این مطالعه با هدف ارزیابی میزان ترشح IL-32α، IL-35 و TGF-β از سلول های تک هسته ای خون محیطی (PBMCs) در افراد بیمار و کنترل صورت گرفت. همبستگی بین IL-32α با IL-35 و TGF-β و همبستگی بین آن ها با عوامل تعیین کننده پاراکلینیکی (گلوکز پلاسمای ناشتا (FPG)، هموگلوبین A1c (HbA1c)، میزان فیلتراسیون گلومرولی (GFR)، آلبومین و کراتینین) بررسی شد.

مواد و روش ها: نمونه خون ۳۸ فرد بیمار و ۳۸ فرد کنترل جمع آوری و PBMCs هر فرد با روش فایکول جدا و با محرک آزمایشگاهی به مدت چهار روز کشت داده شد. تولید IL-32α، IL-35 و TGF-β در مایع رویی کشت با روش الایزا ارزیابی گردید. عوامل تعیین کننده پاراکلینیکی با روش های استاندارد آزمایشگاهی بررسی شد.

یافته ها: افزایش IL-32α و کاهش IL-35 ترشحی در بیماران نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($P=0/006$). همبستگی منفی بین IL-32α و IL-35 ($P<0/001$)، همبستگی مثبت بین IL-32α با FPG و HbA1c ($P=0/005$ ، $P=0/002$) و همبستگی منفی بین IL-35 با آن ها در بیماران دیده شد (هر دو $P<0/001$). ارتباط معناداری بین سایتوکاین ها و شاخص توده بدنی، GFR، آلبومینوری، کراتینین و TGF-β یافت نشد.

نتیجه گیری: در بیماری دیابت میزان افزایش IL-32α با کاهش میزان IL-35 و عوامل تعیین کننده سوخت و ساز گلوکز مرتبط است. ظاهراً IL-32α و IL-35 نقش بالقوه ای در بیماری زایی T2DM دارند.

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۰۳

ویرایش: ۱۴۰۲/۰۱/۲۴

پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۱۲

انتشار: ۱۴۰۲/۰۳/۲۴

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

* نویسنده مسئول: مهدی بهزاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.
ایمیل: m.behzad@umsha.ac.ir

واژگان کلیدی: اینترلوکین ۳۲، اینترلوکین ۳۵، دیابت شیرین نوع دو، فاکتور رشد تغییر دهنده بتا

استناد: شیخ، ویدا؛ سردار ملی، زهرا؛ بهزاد، مهدی. ارتباط بین اینترلوکین ۳۲ آلفا با اینترلوکین ۳۵ و فاکتور رشد تغییر دهنده بتا تولید شده از سلول های تک هسته ای خون محیطی در بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع دو. مجله پزشکی بالینی ابن سینا، بهار ۱۴۰۲؛ ۳۰(۱): ۵-۱۳.

مقدمه

و ترشح سایتوکاین ها دارد. گیرنده اختصاصی برای IL-32α شناسایی نشده است، اما این سایتوکاین می تواند از طریق پروتئین کیناز C و فعال کردن مسیرهای داخل سلولی مانند عامل هسته ای تقویت کننده (Nuclear factor-κB یا NFκB) به افزایش تولید میانجی های پیش التهابی مانند TNF-α منجر شود [۲]. مطالعات قبلی ارتباط این سایتوکاین با بیماری های خودایمنی و التهابی را نشان داده اند. به عنوان نمونه، افزایش سطح سرمی IL-32α و میزان

اینترلوکین ۳۲ به عنوان یک سایتوکاین پیش التهابی شناخته می شود که دارای ایزوفرم های α، β، γ، δ، ε، η، θ و ζ است. اینترلوکین ۳۲ آلفا (IL-32α) از ایزوفرم های مهم این سایتوکاین با اثرات پیش التهابی، عمدتاً از سلول های تک هسته ای خون محیطی (PBMCs) مانند لنفوسیت ها، سلول های کشنده طبیعی و مونوسیت ها تولید می شود [۱]. این سایتوکاین نوظهور عملکردهای مختلفی از جمله: القای بیان ژن های التهابی، تکثیر و تمایز سلول ها

اطلاعات کمی در خصوص نقش آن‌ها در بیماری دیابت شیرین نوع دو در دسترس است. این مطالعه با هدف سنجش میزان سطح ترشحی IL-32 α ، IL-35 و TGF- β از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی بیماران و ارزیابی ارتباط بین IL-32 α و IL-35 و TGF- β در مقایسه با افراد کنترل صورت گرفته است. ارتباط بین سایتوکاین‌های بیان شده با شاخص‌های تعیین‌کننده این بیماری شامل گلوکز پلاسما ناشتا، هموگلوبین A1c، شاخص توده بدنی، میزان فیلتراسیون گلومرولی، کراتینین سرم و آلبومین موجود در ادرار ارزیابی شده است.

روش کار

جامعه پژوهش

این مطالعه روی ۳۸ بیمار مبتلا به دیابت شیرین نوع دو بدون درمان از مراجعین بیمارستان شهید بهشتی دانشگاه علوم پزشکی همدان و ۳۸ فرد سالم انجام شد. افراد سالم بعد از معاینه بالینی در جامعه آماری کنترل قرار گرفتند و از نظر سن و جنس اختلاف معنی‌داری با بیماران نداشتند و بیماری‌هایی شامل دیابت نوع دو، بیماری‌های خودایمنی، رشد غیرطبیعی و بیش‌ازحد بافت و بیماری‌های مزمن دیگر نداشتند. جدول ۱ ویژگی‌های جمعیت‌شناسی و پاراکلینیکی شرکت‌کنندگان را نشان می‌دهد.

معیارهای ورود به مطالعه به این صورت است: الف) تشخیص بیماری توسط پزشک متخصص داخلی بر اساس شیوه‌نامه انجمن دیابت آمریکا (۲۰۲۱؛ ب) گلوکز پلاسما ناشتای بزرگ‌تر یا مساوی ۱۲۶ میلی‌گرم در دسی‌لیتر؛ ج) درصد هموگلوبین A1c بزرگ‌تر یا مساوی ۶/۵ (د) اندازه آلبومین، فیلتراسیون گلومرولی و کراتینین در محدوده طبیعی. معیارهای خروج از مطالعه به این صورت است: الف) مصرف داروهای متفورمین، گلی‌کلازید، مهارکننده‌های دی‌پپتیدیل پپتیداز ۴ مثل سیتاگلیپتین، مهارکننده‌های گلوکز سدیم مثل امپاگلیفلوزین، انسولین و دیگر داروهای ضد دیابت؛ ب) داشتن عفونت حاد یا مزمن، نرفروپاتی، رتینوپاتی، نوروپاتی، کتواسیدوز، هایپرکتونمی، نارسایی کبدی، سرطان و بیماری‌های خودایمنی؛ ج) مصرف آنتی‌بیوتیک، استروئید یا داروهای مؤثر بر سیستم ایمنی در شش ماه گذشته؛ د) مصرف مداوم الکل و سیگار؛ ه) سن بیش از ۶۰ سال.

نمونه‌گیری و جداسازی سلول

پنج میلی‌لیتر نمونه خون وریدی در لوله‌های استریل حاوی ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری شد. تخلیص PBMCs با روش فایکول (Sigma, Germany) طبق شیوه‌نامه استاندارد انجام گرفت [۱۰]: به این صورت که هر نمونه به یک لوله فاکون منتقل و به همان حجم سالین بافر فسفات (PBS) به آن اضافه شد؛ نمونه رقیق‌شده به آرامی روی فایکول استریل (نسبت ۳:۱) اضافه و به مدت ۲۵ دقیقه با دور ۲۲۰۰ سانتریفیوژ شد؛ PBMCs جمع‌آوری و سه بار با PBS شست‌وشو داده شد؛ از رنگ تریپان آبی برای

بیان ژنی آن در سلول‌های ایمنی بیماران میاستنی گراویس، گریوز و پسوریازیس گزارش شده است که میزان آن با شاخص‌های تشخیصی از جمله اتوآنتی‌بادی‌های اختصاصی رابطه معناداری داشته است [۵-۳]. همچنین تحریک آزمایشگاهی سلول‌های پوششی مغز استخوان به‌دست‌آمده از بیماران میلوم متعدد با IL-32 α نوترکیب سبب القای تولید IL-6 شده است [۶].

دیابت شیرین نوع دو (T2DM) بیماری مزمن و التهابی، شایع‌ترین نوع دیابت محسوب می‌شود که با افزایش مقاومت به انسولین، نقص در برداشت گلوکز توسط سلول‌ها و افزایش غیرطبیعی گلوکز خون شناسایی می‌شود. در بروز این بیماری، اختلال در هر دو بازوی سیستم ایمنی بدن شامل ایمنی ذاتی و ایمنی اکتسابی نقش دارد. سلول‌های ایمنی ذاتی از جمله مونوسیت‌ها و سلول‌های دندریتیک می‌توانند با ترشح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی به شکل‌گیری محیط التهابی در این بیماری کمک کنند [۷]. از طرف دیگر، سیستم ایمنی اکتسابی عمدتاً از طریق لنفوسیت‌های CD4⁺ T helper (یا Th) دارای آثار مخرب در این بیماری است. سلول‌های Th دارای زیرگروه‌های پیش‌التهابی مانند Th1 و Th17 تولیدکننده اینترفرون گاما (IFN- γ) و اینترلوکین (IL) ۱۷ و همچنین زیرگروه‌های مهارکننده سلول‌های T تنظیمی (T regulatory یا Treg) سازنده IL-35، فاکتور رشد تغییردهنده بتا (Transforming growth factor- β یا TGF- β) و اینترلوکین ۱۰ است [۸، ۹]. مطالعات حاکی از آن است که در بیماران T2DM افزایش فعالیت زیرگروه‌های پیش‌التهابی Th، افزایش سطح سرمی IFN- γ عامل نکروزدهنده تومور-آلفا (TNF- α)، IL-17 و نیز افزایش سلول‌های Th1 و Th17 نسبت به سلول‌های Treg وجود دارد که میزان آن‌ها با شاخص تشخیصی و بالینی بیماری یعنی قند خون ارتباط معناداری دارد [۱۰، ۷]. سلول‌های دیگر ایمنی اکتسابی، از جمله لنفوسیت‌های T کشنده و سلول‌های B با تولید بیش از اندازه سایتوکاین‌های پیش‌التهابی از جمله IL-6، IFN- γ و TNF- α می‌توانند از عوامل بیماری‌زا در این بیماری باشند [۱۱].

سایتوکاین‌های IL-35 و TGF- β دو نمونه شاخص از عوامل مهارکننده بدن مرتبط با بیماری‌های التهابی هستند که عمدتاً از سلول‌های تنظیمی بدن ترشح می‌شوند. این عوامل با فعال کردن مسیرهای مختلف داخل سلولی سبب مهار شکل‌گیری زیرگروه‌های التهابی Th، مهار تولید عوامل التهابی، افزایش سلول‌های T تنظیمی و در نتیجه تعدیل پاسخ‌های ایمنی می‌شوند [۱۲، ۱۳]. کاهش سطح سرمی یا بیان ژنی IL-35 در برخی از بیماری‌ها مانند التهاب مفاصل (RA) و لوپوس منتشر (SLE) گزارش شده است [۱۴، ۱۵]. اختلال در بیان TGF- β در بیماری التهابی روده، RA و مالتیپل اسکروزیس (MS) نیز مشاهده شده است [۱۳].

با توجه به مطالب ذکرشده، نقش و تغییرات سایتوکاین‌های IL-32 α پیش‌التهابی و IL-35 و TGF- β ضدالتهابی در بیماری‌زایی برخی از بیماری‌های خودایمنی و التهابی گزارش شده است. با وجود این،

جدول ۱: مشخصات گروه‌های مطالعه شده

مشخصات	گروه کنترل	گروه بیمار	سطح معناداری
تعداد کل (زن / مرد)	۳۸ (۲۱ / ۱۷)	۳۸ (۲۰ / ۱۸)	NS
سن	۵۲/۵۷ ± ۸/۰۱	۵۰/۲۱ ± ۷/۱۴	NS
گلوکز پلاسمای ناشتا (میلی گرم بر دسی لیتر)	۹۳/۰۷ ± ۱۳/۷۶	۱۹۲/۷۶ ± ۵۵/۷۸	<۰/۰۰۱
هموگلوبین A1c (%)	۴/۸۲ ± ۰/۶۰	۷/۶۵ ± ۰/۷۰	<۰/۰۰۱
شاخص توده بدنی (کیلوگرم بر مترمربع)	۲۸/۸۶ ± ۲/۲۳	۲۶/۸۲ ± ۲/۲۸	NS
میزان فیلتراسیون گلومرولی (ml/min/1.73 m2)	۹۱/۶۸ ± ۱۶/۹۸	۸۹/۲۸ ± ۱۵/۶۰	NS
کراتینین سرم (میلی گرم بر دسی لیتر)	۰/۹۹ ± ۰/۱۵	۱/۰۱ ± ۰/۱۶	NS
آلبومین (میلی گرم در روز)	۱۶/۳۶ ± ۶/۶۳	۱۷/۰۱ ± ۷/۲۸	NS

مقادیر برحسب میانگین ± انحراف از معیار بیان شده‌اند.

NS: عدم معنی داری.

Ab detection طبق استاندارد به چاهک‌ها اضافه و در دمای اتاق کشت شد. محلول جفت‌شده پراکسیداز ترب کوهی (HRP) و سپس ماده تترمتیل بنزیدین (TMB) طبق شیوه‌نامه کیت افزوده شد. بعد از دوره کشت در تاریکی، محلول متوقف‌کننده اضافه و با استفاده از دستگاه خوانش الایزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر جذب نوری نمونه‌ها خوانده و بر اساس منحنی استاندارد، غلظت نمونه‌ها محاسبه شد. زمان انکوباسیون و شست‌وشوها طبق شیوه‌نامه هر کیت دقیقاً رعایت شد.

اندازه‌گیری عوامل تعیین‌کننده پاراکلینیکی

مشخصات دموگرافیک مانند سن، جنس، سابقه بیماری و مصرف نکردن دارو از طریق پرسشنامه و با تأیید پزشک مربوط جمع‌آوری شد. عوامل تعیین‌کننده پاراکلینیکی شرکت‌کنندگان در پژوهش پس از نمونه‌گیری (پنج میلی‌لیتر) در آزمایشگاه بیمارستان وابسته به دانشگاه سنجش شد. به‌طور خلاصه، مقدار گلوکز پلاسمای ناشتا، آلبومین و کراتینین سرم بر اساس شیوه آنزیمی و با دستگاه آنالیزکننده خودکار (Mindray BS-480، چین) مطابق با شیوه‌نامه استاندارد اندازه‌گیری شد. سنجش هموگلوبین A1c با روش ایمونوتوربیدومتری با دستگاه Roche (Cobas Integra 400 plus، آلمان) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. شاخص توده بدنی از تقسیم وزن (برحسب کیلوگرم) بر مجذور قد فرد (برحسب متر) محاسبه شد. میزان فیلتراسیون گلومرولی (GFR) بر اساس فرمول استاندارد MDRD مطابق با مطالعات قبلی با توجه به سن و کراتینین محاسبه شد [۱۶].

تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ صورت گرفت. برای بررسی توزیع داده‌ها از آزمون Shapiro Wilk استفاده شد. از آزمون t مستقل برای مقایسه بین گروه‌ها و آزمون پی‌رسون برای بررسی هم‌بستگی‌ها استفاده شد. ترسیم نمودارها با نرم‌افزار Graph Pad Prism نسخه ۸،۰،۲ صورت گرفت. نتایج داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف از معیار (SD) و نمودارهای میله‌ای

شمارش تعداد سلول‌های زنده استفاده گردید؛ تمام سلول‌ها به‌طور موقت داخل محیط کشت حاوی RPMI 1640، سرم جنین گاوی (۱۰٪)، واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین و دو میلی‌مولار L-گلوتامین تا آزمایش‌های بعدی نگهداری شدند. تمام مواد کشت سلولی از شرکت Biosera کشور فرانسه تهیه شد.

کشت سلولی

۳۰۰ هزار سلول PBMC داخل هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت قرار داده شد و برای تحریک آن‌ها از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد CD3 (کلون: OKT3، BioLegend، USA) استفاده شد. این پادتن‌ها به‌صورت متصل‌شده (coating) در کف چاهک‌ها استفاده شد و اصول و غلظت استاندارد آن ۲ µg/ml با توجه به مطالعات قبلی انتخاب شد [۸، ۹]. ظروف کشت به مدت چهار روز (۹۶ ساعت) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرم‌خانه آزمایشگاهی حاوی پنج درصد CO2 نگهداری شد. سپس مایع رویی کشت سلولی جمع‌آوری شد و تا زمان اندازه‌گیری سایتوکاین‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

تعیین میزان سایتوکاین

اندازه‌گیری IL-32α (BioLegend، آمریکا، حساسیت: ۴ pg/ml)، IL-35 (Ebioscience، آمریکا، حساسیت: ۳/۵ pg/ml) و TGF-β (BioLegend، آمریکا، حساسیت: ۹/۳۸ pg/ml) انسانی توسط روش الایزا مطابق با شیوه‌نامه کیت شرکت سازنده انجام گرفت. به‌طور خلاصه، ۱۰۰ µl از محلول capture Ab به چاهک‌های ظرف کشت الایزا اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگه‌داری شد. پس از شست‌وشو، بافر مسدودکننده اضافه و چند ساعت در دمای اتاق قرار گرفت (مراحل فوق برای کیت‌های IL-35 و TGF-β به دلیل pre-coated بودن اجرا نشد). محلول‌های استاندارد و نمونه‌های

به منظور مقایسه سطح سایتوکاین‌ها در بیماران دیابت شیرین نوع دو و افراد کنترل، PBMCs هر اهداکننده به مدت چهار روز توسط محرک آزمایشگاهی فعال و تولید IL-32 α ، IL-35 و TGF- β در مایع رویی کشت اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که سطح IL-32 α در بیماران در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است ($P=0.006$ ، شکل A-1) در حالی که سطح IL-35 در بیماران نسبت به گروه کنترل دارای کاهش معناداری بوده است ($P<0.001$ ، شکل B-1). تفاوت چشمگیری از نظر آماری در میزان ترشحی TGF- β بین دو گروه مشاهده نشد (شکل C-1).

همبستگی بین میزان ترشحی IL-32 α با IL-35 و TGF- β در بیماران و گروه کنترل

بررسی ارتباط بین IL-32 α با IL-35 و TGF- β در هر یک از گروه‌های شرکت‌کننده در پژوهش صورت گرفت. همبستگی منفی معناداری بین میزان ترشحی IL-32 α و IL-35 در گروه بیماران مشاهده شد ($P<0.001$ ، جدول ۲) در حالی که ارتباط معناداری بین سطح ترشحی IL-32 α و TGF- β در گروه بیماران دیده نشد. در گروه کنترل، همبستگی بارزی بین میزان ترشح IL-32 α با مقدار IL-35 و TGF- β و همچنین، همبستگی معناداری بین ترشح TGF- β و IL-35 رؤیت نشده است.

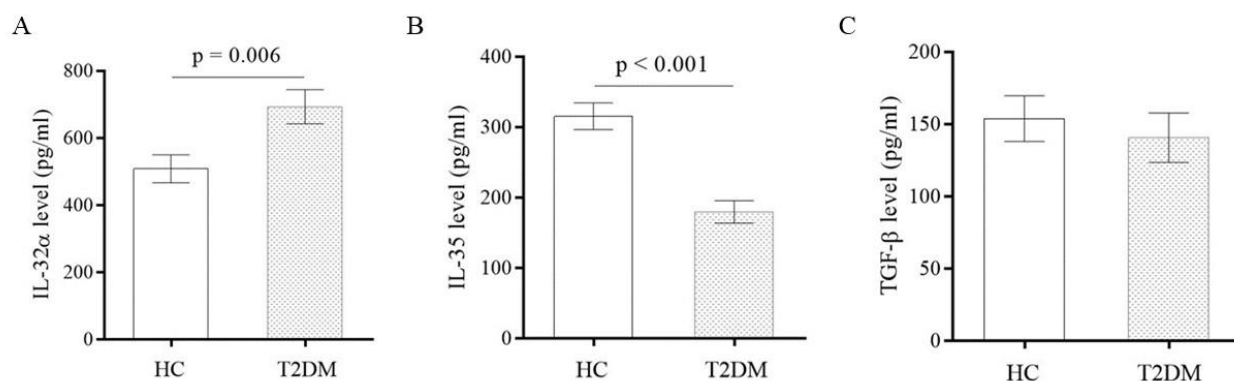
به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین (SEM) نشان داده شده است. سطح معناداری $P \leq 0.05$ است.

نتایج

مقایسه مشخصات دموگرافیک و پاراکلینیکی بیماران و کنترل

ویژگی‌های دموگرافیک و پارامترهای پاراکلینیکی دو گروه مطالعه شده در جدول ۱ مقایسه شده است. گروه بیماران دیابتی شامل ۳۸ نفر (۲۰ زن و ۱۸ مرد) با میانگین سنی 50.21 ± 7.14 و افراد کنترل نیز شامل ۳۸ نفر (۲۱ زن و ۱۷ مرد) با میانگین سنی 52.57 ± 8.01 بودند. بین عوامل سن و جنس تفاوت معناداری در گروه‌های مطالعه شده مشاهده نشد. مقدار گلوکز پلاسمای ناشتا و درصد هموگلوبین A1c در گروه بیمار، افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل نشان داد ($P<0.001$ برای هر دو). تفاوت معناداری از نظر شاخص توده بدنی (BMI)، میزان فیلتراسیون گلومرولی (GFR)، کراتینین سرم و آلبومین بین دو گروه مشاهده نشد.

مقایسه سطح ترشحی IL-32 α ، IL-35 و TGF- β بین بیماران و افراد کنترل



شکل ۱: مقایسه میزان ترشحی IL-32 α ، IL-35 و TGF- β در بیماران و کنترل

PBMCs به مدت چهار روز با محرک سلولی فعال و غلظت (A) IL-32 α ، (B) IL-35 و (C) TGF- β در مایع رویی کشت در گروه‌های مطالعه شده اندازه‌گیری شد.

جدول ۲: همبستگی بین میزان ترشح IL-32 α با IL-35 و TGF- β

میزان ترشح IL-35		میزان ترشح TGF-β	
گروه بیمار			
عدد	۰/۶۷	۰/۱۳	میزان ترشح IL-32α
عددp	<۰/۰۰۱	۰/۴۲	
گروه کنترل			
عدد	۰/۰۶۵	۰/۱۰	میزان ترشح IL-32α
عددp	۰/۶۹	۰/۵۴	

جدول ۳: هم‌بستگی بین میزان ترشح سایتوکاین‌ها با پارامترهای پاراکلینیکی

گروه بیمار	گلوکز ناشتای پلاسما	هموگلوبین A1c	شاخص توده بدنی	فیلتراسیون گlomerولی میزان	کراتینین سرم	آلبومین
میزان ترشح IL-32 α	عدد	۰/۵۸	۰/۵۴	-۰/۱۷	۰/۲۶	۰/۱۱
عدد	۰/۰۰۲	۰/۰۰۵	۰/۲۹	۰/۱۰	۰/۴۸	۰/۶۷
میزان ترشح IL-35	عدد	-۰/۶۰	-۰/۷۵	۰/۲۹	-۰/۰۲	۰/۱۴
عدد	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	۰/۰۷	۰/۸۹	۰/۳۹	۰/۸۱
میزان ترشح TGF- β	عدد	-۰/۷۰	-۰/۱۳	۰/۳۰	-۰/۰۵۶	۰/۰۹
عدد	۰/۶۴	۰/۴۱	۰/۰۶	۰/۷۳	۰/۵۸	۰/۶۳
گروه کنترل						
میزان ترشح IL-32 α	عدد	۰/۱۶	۰/۲۳	۰/۰۸	۰/۰۶۱	۰/۰۵۵
عدد	۰/۳۳	۰/۸۹	۰/۶۱	۰/۹۷	۰/۷۴	۰/۸۳
میزان ترشح IL-35	عدد	۰/۰۸	-۰/۱۵	-۰/۲۳	-۰/۰۱	-۰/۱۰
عدد	۰/۶۱	۰/۳۶	۰/۱۶	۰/۹۵	۰/۵۴	۰/۹۷
میزان ترشح TGF- β	عدد	۰/۱۳	۰/۲۲	-۰/۰۴	۰/۱۱	-۰/۲۰
عدد	۰/۴۲	۰/۱۶	۰/۷۹	۰/۵۰	۰/۲۱	۰/۳۴

هم‌بستگی بین سطح ترشحات IL-32 α ، IL-35 و TGF- β با متغیرهای تشخیصی و پاراکلینیکی

ارتباط بین میزان ترشح IL-32 α ، IL-35 و TGF- β با عوامل مؤثر تشخیصی بدن از جمله؛ گلوکز پلاسما، هموگلوبین A1c، شاخص توده بدنی، میزان فیلتراسیون گlomerولی، کراتینین سرم و آلبومین در گروه بیماران و افراد کنترل ارزیابی شد. نتایج نشان داد که هم‌بستگی مثبت و معناداری بین میزان ترشح IL-32 α با قند ناشتای پلاسما و هموگلوبین A1c در افراد مبتلا به دیابت وجود دارد ($P=0/002$ ، $P=0/005$ ، جدول ۳). از طرف دیگر هم‌بستگی منفی معناداری بین میزان ترشح IL-35 با قند ناشتای پلاسما و هموگلوبین A1c در گروه بیماران مشاهده شد (هر دو $P<0/001$ ، جدول ۳). داده‌ها ارتباط بارزی از نظر آماری بین TGF- β با قند ناشتای پلاسما و هموگلوبین A1c در گروه بیماران نشان نداد. در گروه بیماران ارتباط معناداری بین سطح ترشحی هر سه سایتوکاین با دیگر عوامل تعیین کننده پاراکلینیکی شامل شاخص توده بدنی، میزان فیلتراسیون گlomerولی، کراتینین سرم و آلبومین یافت نشد. در گروه کنترل، هم‌بستگی معناداری از نظر آماری بین سطح ترشحی سایتوکاین‌ها و عوامل تعیین کننده پاراکلینیکی افراد دیده نشد (جدول ۳).

بحث

التهاب از سازوکارهای زمینه‌ای مهم در پیشرفت بیماری

T2DM است. نفوذ، تجمع و فعال شدن سلول‌های ایمنی پیش‌التهابی از جمله سلول‌های Th1 و Th17، ماکروفاژها و نیز افزایش سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند IL-1 β ، TNF- α و IL-17 در خون محیطی و بافت‌های مرتبط با سوخت‌وساز بدن مثل پانکراس، علت اصلی التهاب مزمن در این بیماری است که به اختلال عملکرد سلول‌های بتای پانکراس و مقاومت به انسولین منجر می‌شود [۱۷]. یکی از جنبه‌های التهابی مهم دیگر، تولید سایتوکاین‌ها و کموکاین‌های پیش‌التهابی مانند IL-1 β و CCL2 از خود سلول‌های بتا و فراخوانی سلول‌های ایمنی به ناحیه پانکراس است که با آپوپتوز و کاهش سلول‌های ترشح‌کننده انسولین در ارتباط است [۱۸]. در مقابل، سایتوکاین‌های ضدالتهابی می‌توانند با جلوگیری از تکثیر و فعال شدن بیش‌ازحد التهاب به حفظ هموستازی بدن کمک کنند؛ به‌طوری‌که ارتباط معکوس آن‌ها با شدت بیماری‌های خودایمنی، نشان‌دهنده نقش حفاظتی آن‌ها در برابر عوامل بیماری‌زا در این قبیل از بیماری‌ها است [۱۹]. در این مطالعه تولید سایتوکاین پیش‌التهابی IL-32 α و سایتوکاین‌های مهاری IL-35 و TGF- β از سلول‌های ایمنی بیماران مبتلا به T2DM و ارتباط بین آن‌ها با شاخص‌های تعیین کننده بیماری بررسی شد. با توجه به اینکه ایزوفرم آلفا از IL-32 نسبت به ایزوفرم‌های دیگر این سایتوکاین بیشترین فعالیت پیش‌التهابی و فراوان‌ترین رونوشت ژنی را داخل سلول‌های ایمنی نشان می‌دهد [۳]، این سایتوکاین هدف این مطالعه انتخاب

تناقض‌هایی در مطالعات قبلی دیده می‌شود. هم‌سو با نتایج این پژوهش، برزیوی و همکاران تفاوتی در مقدار سرمی این سایتوکاین در بیماران دیابتی دارای نارسایی کلیه و بدون نارسایی کلیه نسبت به گروه کنترل مشاهده نکردند [۲۷]. این در حالی است که گزارش‌هایی مبنی بر کاهش سطح پلاسمایی $TGF-\beta$ و نیز هم‌بستگی بین کاهش سلول‌های Treg با $TGF-\beta$ در بیماران دیابت نوع دو و دارای اضافه‌وزن عنوان شده است [۲۸]. در این راستا، مطالعه قبلی ما نشان داده است که میزان ترشحی سایتوکاین‌های IL-10 از لنفوسیت‌های T، تفاوت معناداری در بیماران دیابتی نسبت به گروه کنترل ندارد و به این دلیل در این پژوهش ارزیابی دوباره نشد [۲۰]. با توجه به یافته اصلی این مطالعه در این زمینه، یعنی کاهش ترشح IL-35 و ارتباط معکوس آن با شاخص‌های تعیین‌کننده بیماری می‌توان گفت که نقص تولید این سایتوکاین در بیماری‌زایی دیابت شیرین نوع دو دخیل بوده و افزایش تولید آن را می‌توان هدفی درمانی برای سرکوب فرآیندهای التهابی موجود در دیابت پیشنهاد داد.

در بخش دیگر این مطالعه، ارتباط بین IL-32 α با دو سایتوکاین ضدالتهابی IL-35 و $TGF-\beta$ بررسی شد. به‌طور چشمگیری این پژوهش نشان‌دهنده وجود ارتباط معنادار و معکوس بین IL-32 α و IL-35 در بیماران است. در مطالعات پیشین پتانسیل تأثیر IL-32 α بر ترشح برخی از سایتوکاین‌های پیش‌التهابی عنوان شده است. به‌عنوان نمونه، اثر مخرب IL-32 α بر ترکیب بر افزایش بی‌رویه لنفوسیت‌های ترشح‌کننده IL-17 در بیماری RA دیده شده است [۲۹]. IL-32 α در القای IL-6 و تمایز سلولی نیز نقش دارد که افزایش مقدار آن سبب گسترش و تکثیر بیش‌ازاندازه سلول‌های پیوندی مغز استخوان می‌شود [۶]. اثر IL-32 α بر ترکیب بر القای بیان ژن‌های پیش‌التهابی $TNF-\alpha$ از رده ماکروفاژها نیز گزارش شده است [۳۰]. همچنین تیمار سلول‌های چربی با IL-32 α باعث القای بیان ژن‌های التهابی IL-1 β و $TNF-\alpha$ می‌شود [۲۱]. در مطالعه قبلی پژوهشگران اثر مخرب IL-32 α بر ترکیب در محیط کشت سلولی بر افزایش ترشح IL-17 و بیان ژن‌های داخل سلولی NF- κ B و عامل $ROR-\gamma$ t (عامل رونویسی Th17) در بیماران دیابتی رؤیت شده است [۲۰].

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به استفاده نکردن از سایتوکاین‌های نوترکیب برای ارزیابی دقیق ارتباط و اثر آن‌ها در محیط کشت سلولی و مدل‌های موشی اشاره کرد. توصیه می‌شود اثر IL-32 α در هر یک از زیرگروه‌های سلولی در بافت‌های مرتبط با دیابت مثل پانکراس و بافت چربی نیز بررسی گردد. در این مطالعه، بررسی تغییرات سایتوکاینی در بیماران مبتلا به دیابت شیرین نوع دو بدون درمان و بدون عارضه جانبی، هدف قرار گرفت. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، متغیرهای سایتوکاینی در بیماران مبتلا به عوارض بالینی ناشی از دیابت مانند نفروپاتی، رتینوپاتی و کتواسیدوز دیابتی به تفکیک بررسی و تأثیر داروهای ضد دیابت نیز ارزیابی شود. همچنین بررسی

شد. همچنین با توجه به اینکه PBMCs شامل بخش عمده‌ای از سلول‌های ایمنی ترشح‌کننده سایتوکاین در سیستم ایمنی و تمثیل‌کننده محیط بدن است، این سلول‌ها در این پژوهش ارزیابی شدند.

یکی از یافته‌های این مطالعه نشان داد که میزان IL-32 α ترشح‌شده از سلول‌های ایمنی بیماران نسبت به افراد کنترل، افزایش معناداری داشته و میزان آن با گلوکز ناشتای پلاسما و هموگلوبین A1c رابطه مثبتی دارد. در این راستا، افزایش IL-32 α سرمی و نقش آن در بیماری‌زایی‌های دیگر مانند میاستنی گراویس، گریوز و ارتباط مثبت آن با شاخص‌های شدت بیماری از جمله پادتن ضد گیرنده استیل کولین، گیرنده هورمون TSH و هورمون T3 آزاد گزارش شده است [۴، ۵]. افزایش بیان ژنی IL-32 α در PBMCs بیماران مبتلا به پسونیازیس نیز مشاهده شد که با التهاب مزمن افراد بیمار رابطه مثبتی داشته است [۳]. مطالعات پیشین انجام‌شده توسط ما و دیگران، افزایش سطح سرمی IL-32 α و IL-32 تام (شامل همه ایزوفرم‌های آن) در بیماران دیابتی و دارای اضافه‌وزن شدید و نیز ارتباط آن با التهاب موجود در بافت‌های چربی را نشان می‌دهد [۲۰، ۲۱]. پژوهش حاضر افزایش میزان ترشحی IL-32 α از سلول‌های ایمنی بیماران مبتلا به دیابت نوع دو را نشان داد که با در نظر گرفتن ارتباط مستقیم IL-32 α با عوامل تعیین‌کننده سوخت‌وساز گلوکز که عموماً نشان‌دهنده شدت بیماری است، اثر IL-32 α را بر عوامل بیماری‌زای دیابت بارز می‌کند که با افزایش آن، شدت بیماری نیز افزایش می‌یابد.

IL-35 و $TGF-\beta$ عمدتاً از سلول‌های T تنظیمی و به مقدار کم از سلول‌های B تنظیمی تولید می‌شود. این سایتوکاین‌ها اغلب دارای اثر محافظتی در بیماری‌های التهابی بوده و به کاهش لنفوسیت‌های T پیش‌التهابی، کاهش تولید IFN- γ و IL-17 و سرکوب تولید پادتن‌ها در بدن منجر می‌شوند [۱۳، ۲۲]. در این پژوهش، کاهش بارزی در میزان ترشح IL-35 از PBMCs بیماران دیابت نوع دو نسبت به افراد کنترل مشاهده شد که مقدار آن با FPG و HbA1c رابطه معکوسی داشت. هم‌سو با این نتایج، کاهش سطح سرمی IL-35 در بیماران RA، بیماران دیابت نوع یک و بیماران عروق کرونری قلب و نیز کاهش آن در مایع زجاجیه بیماران دارای رتینوپاتی نسبت به افراد کنترل گزارش شده است [۲۴-۲۲، ۱۴]. ارتباط بین IL-35 با غلظت C-پپتید بیماران دیابت نوع یک که شاخصی برای سنجش سطح عملکرد سلول‌های بتای پانکراس است نیز مشاهده شده است [۲۲]. کاهش در فراوانی سلول‌های B تنظیمی IL-35+ در خون محیطی بیماران دارای دیابت نوع یک و همچنین در مدل موشی مرتبط با آن دیده شده است [۲۵]. در این مطالعه، تفاوت معناداری در میزان ترشحی $TGF-\beta$ بین دو گروه پژوهش وجود نداشت. کاهش مقدار $TGF-\beta$ در برخی از بیماری‌های خودایمنی مانند لوپوس منتشر رؤیت شده است [۲۶]. ولی در خصوص تغییرات آن در بیماری دیابت،

معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه به خاطر حمایت مالی از این مطالعه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

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.1401.724 به تصویب رسیده است. همچنین از تمامی افراد شرکت‌کننده قبل از ورود به مطالعه، رضایت کتبی آگاهانه دریافت شد.

سهم نویسندگان

نویسنده اول: (پژوهشگر همکار) مشاور علمی طرح، انجام معاینات بالینی، پایش‌های آزمایشگاهی و ویرایش علمی مقاله (۴۰ درصد). نویسنده دوم: (پژوهشگر همکار) مشارکت در تدوین بخش‌های مختلف طرح، آنالیزهای آماری و نگارش مقاله (۲۰ درصد). نویسنده سوم: (پژوهشگر اصلی) مسئول مکاتبات، طراحی پروژه، اجرا و نظارت بر آن، تدوین بخش‌های مختلف طرح، آنالیزهای آماری، نگارش مقاله (۴۰ درصد).

حمایت مالی

این مطالعه را معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان پشتیبانی مالی کرده است.

REFERENCES

- Gautam A, Pandit B. IL32: The multifaceted and unconventional cytokine. *Hum Immunol*. 2021;**82**(9):659-67. PMID: 34024634 DOI: 10.1016/j.humimm.2021.05.002
- Ribeiro-Dias F, Saar Gomes R, de Lima Silva LL, Dos Santos JC, Joosten LA. Interleukin 32: a novel player in the control of infectious diseases. *J Leukoc Biol*. 2017;**101**(1):39-52. PMID: 27793959 DOI: 10.1189/jlb.4RU0416-175RR
- Al-Shobaili HA, Rasheed Z. Elevated gene expression of interleukin-32 isoforms alpha, beta, gamma, and delta in the peripheral blood of chronic psoriatic patients. *Diseases*. 2018;**6**(1):21. PMID: 29538330 DOI: 10.3390/diseases6010021
- Na SJ, So SH, Lee KO, Choi YC. Elevated serum level of interleukin-32α in the patients with myasthenia gravis. *J Neurol*. 2011;**258**:1865-70. PMID: 21487807 DOI: 10.1007/s00415-011-6036-7
- Yao Q, Wang B, Jia X, Li Q, Yao W, Zhang JA. Increased human interleukin-32 expression is related to disease activity of graves' disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;**10**:613. PMID: 31616372 DOI: 10.3389/fendo.2019.00613
- Lin X, Yang L, Wang G, Zi F, Yan H, Guo X, et al. Interleukin-32α promotes the proliferation of multiple myeloma cells by inducing production of IL-6 in bone marrow stromal cells. *Oncotarget*. 2017;**8**(54):92841-54. PMID: 29190960 DOI: 10.18632/oncotarget.21611
- Zhou T, Hu Z, Yang S, Sun L, Yu Z, Wang G. Role of adaptive and innate immunity in Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res*. 2018;**2018**:7457269. PMID: 30533447 DOI: 10.1155/2018/7457269
- Borzouei S, Mohamadtaheri M, Zamani A, Behzad M. Reduced frequency and functional potency of CD49d(-) T regulatory cells in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Immunobiology*. 2021;**226**(4):152113. PMID: 34247018 DOI: 10.1016/j.imbio.2021.152113
- Borzouei S, Moghimi H, Zamani A, Behzad M. Changes in T helper cell-related factors in patients with type 2 diabetes mellitus after empagliflozin therapy. *Hum Immunol*. 2021;**82**(6):422-8. PMID: 33771372 DOI: 10.1016/j.humimm.2021.03.004
- 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 DOI: 10.1080/08923973.2019.1593447
- Daryabor G, Atashzar MR, Kabelitz D, Meri S, Kalantar K. The effects of Type 2 Diabetes Mellitus on organ metabolism and the immune system. *Front Immunol*. 2020;**11**:1582. PMID: 32793223 DOI: 10.3389/fimmu.2020.01582
- Li X, Fang P, Yang WY, Wang H, Yang X. IL-35, as a newly proposed homeostasis-associated molecular pattern, plays three major functions including anti-inflammatory initiator, effector, and blocker in cardiovascular diseases. *Cytokine*. 2019;**122**:154076. PMID: 28648331 DOI: 10.1016/j.cyto.2017.06.003
- Sanjabi S, Oh SA, Li MO. Regulation of the immune response by TGF-β: From conception to autoimmunity and infection. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;**9**(6):a022236. PMID: 28108486 DOI: 10.1101/cshperspect.a022236
- Nakano S, Morimoto S, Suzuki S, Tsushima H, Yamanaka K, Sekigawa I, et al. Immunoregulatory role of IL-35 in T cells of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2015;**54**(8):1498-506. PMID: 25731770 DOI: 10.1093/rheumatology/keu528
- Ouyang H, Shi YB, Liu ZC, Wang Z, Feng S, Kong SM, et al. Decreased interleukin 35 and CD4+EBI3+ T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Am J Med Sci*. 2014;**348**(2):156-61. PMID: 25054737 DOI: 10.1097/MAJ.0000000000000215
- Levey AS, Coresh J, Greene T, Stevens LA, Zhang YL, Hendriksen S, et al. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2006;**145**(4):247-54. PMID: 16908915 DOI: 10.7326/0003-4819-145-4-200608150-00004

17. Rohm TV, Meier DT, Olefsky JM, Donath MY. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders. *Immunity*. 2022;**55**(1):31-55. [PMID: 35021057](#) [DOI: 10.1016/j.immuni.2021.12.013](#)
18. Eguchi K, Manabe I. Macrophages and islet inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2013;**15**:152-8. [PMID: 24003932](#) [DOI: 10.1111/dom.12168](#)
19. Eggenhuizen PJ, Ng BH, Ooi JD. Treg enhancing therapies to treat autoimmune diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;**21**(19):7015. [PMID: 32977677](#) [DOI: 10.3390/ijms21197015](#)
20. Borzouei S, Gholamian-Hamadan M, Behzad M. Impact of interleukin-32α on T helper cell-related cytokines, transcription factors, and proliferation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2022;**1**:1-9. [PMID: 36263937](#) [DOI: 10.1080/08923973.2022.2138430](#)
21. Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Ramírez B, Valentí V, Moncada R, et al. Increased interleukin-32 levels in obesity promote adipose tissue inflammation and extracellular matrix remodeling: effect of weight loss. *Diabetes*. 2016;**65**(12):3636-48. [PMID: 27630206](#) [DOI: 10.2337/db16-0287](#)
22. Ye C, Yano H, Workman CJ, Vignali DA. Interleukin-35: Structure, function and its impact on immune-related diseases. *J Interferon Cytokine Res*. 2021;**41**(11):391-406. [PMID: 34788131](#) [DOI: 10.1089/jir.2021.0147](#)
23. Lin Y, Huang Y, Lu Z, Luo C, Shi Y, Zeng Q, et al. Decreased plasma IL-35 levels are related to the left ventricular ejection fraction in coronary artery diseases. *PLoS One*. 2012;**7**(12):e52490. [PMID: 23285065](#) [DOI: 10.1371/journal.pone.0052490](#)
24. Yan A, You H, Zhang X. Levels of interleukin 27 and interleukin 35 in the serum and vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Ocul Immunol Inflamm*. 2018;**26**(2):273-9. [PMID: 27537610](#) [DOI: 10.1080/09273948.2016.1203959](#)
25. Luo Z, Lundin S, Mejia-Cordova M, Hassani I, Blixt M, Hjelmqvist D, et al. Interleukin-35 prevents development of autoimmune diabetes possibly by maintaining the phenotype of regulatory B cells. *Int J Mol Sci*. 2021;**22**(23):12988. [PMID: 34884797](#) [DOI: 10.3390/ijms222312988](#)
26. Becker-Merok A, Eilertsen G, Nossent JC. Levels of transforming growth factor-beta are low in systemic lupus erythematosus patients with active disease. *J Rheumatol*. 2010;**37**(10):2039-45. [PMID: 20682675](#) [DOI: 10.3899/jrheum.100180](#)
27. 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**(5):293-301. [PMID: 30855208](#) [DOI: 10.1089/jir.2018.0144](#)
28. Yuan N, Zhang HF, Wei Q, Wang P, Guo WY. Expression of CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells, interleukin 10 and transforming growth factor β in newly diagnosed type 2 diabetic patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2018;**126**(2):96-101. [PMID: 28954308](#) [DOI: 10.1055/s-0043-113454](#)
29. Moon YM, Yoon BY, Her YM, Oh HJ, Lee JS, Kim KW, et al. IL-32 and IL-17 interact and have the potential to aggravate osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2012;**14**(6):R246. [PMID: 23148681](#) [DOI: 10.1186/ar4089](#)
30. Kim SH, Han SY, Azam T, Yoon DY, Dinarello CA. Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNFα. *Immunity*. 2005;**22**(1):131-42. [PMID: 15664165](#) [DOI: 10.1016/j.immuni.2004.12.003](#)