Avicenna Journal of Clinical Medicine No 98, Volume 27, Issue 4, Winter 2021, Pages: 193-200

Original Article

doi: 10.29252/ajcm.27.4.193

Evaluation of the Effect of Empagliflozin Therapy on T Helper 22 Cell-Related Factors in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

Hamid Moghimi[1], Shiva Borzouei[2], Alireza Zamani[3], Mahdi Behzad[4,*]

[1] *MSc in Immunology, Department of Immunology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran*
[2] *Associate Professor, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran*
[3] *Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran*
[4] *Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran*

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

Received: 02.11.2020
Accepted: 28.01.2021

How to Cite this Article:
Moghimi H, Borzouei S, Zamani A, Behzad M. Evaluation of the Effect of Empagliflozin Therapy on T Helper 22 Cell-Related Factors in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Avicenna J Clin Med.* 2021; 27(4): 193-200. DOI: 10.29252/ajcm.27.4.193

Abstract

Background and Objective: The increased response of T helper (Th) 22 cells might be involved in the pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM). The present study aimed to investigate the transcription factor of Th22 cells (aryl hydrocarbon receptor [AHR]) and interleukin 22 (IL-22) in $CD4^+$ T cells as well as the impact of oral empagliflozin treatment. The correlation between the aforementioned factors and clinical parameters was also determined among the patients.

Materials and Methods: In this case-control study, 50 patients under the treatment of metformin and gliclazide were divided into two equal groups, including the patients receiving empagliflozin ($EMPA^+$) and not receiving empagliflozin (EMPA, as the control group). The peripheral blood $CD4^+$ T cells were isolated on the initiation day of the study and after 6 months of therapy, and the gene expression levels of AHR and IL-22 were evaluated by real-time polymerase chain reaction. In addition, the production of IL-22 after activation was measured using enzyme-linked immunosorbent assay.

Results: The levels of fasting plasma glucose and hemoglobin A1c diminished in the $EMPA^+$ group after empagliflozin therapy, compared to those reported at the baseline (initiation day; $P<0.001$ and $P=0.04$). The gene expression level of IL-22 and production of IL-22 significantly reduced after 6 months of empagliflozin therapy ($P=0.011$ and $P=0.001$). A significant positive correlation between IL-22 production and its gene expression with AHR as well as between fasting plasma glucose and hemoglobin A1c was observed in the $EMPA^+$ patients after therapy ($P<0.05$).

Conclusion: In addition to antidiabetic effects, empagliflozin has anti-inflammatory impacts on the immune system, especially on Th22 cell-related factors.

Keywords: Diabetes Mellitus Type 2, Empagliflozin, Interleukin 22, T Helper 22 Cell

Copyright © 2021 Avicenna Journal of Clinical Medicine

مقاله پژوهشی

doi: 10.29252/ajcm.27.4.193

بررسی اثر درمان با امپاگلیفلوزین بر فاکتورهای مرتبط با سلول‌های T کمکی ۲۲ در بیماران مبتلابه دیابت شیرین نوع ۲

حمید مقیمی[۱]، شیوا برزویی[۲]، علیرضا زمانی[۳]، مهدی بهزاد[۴،*]

[۱] کارشناس ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
[۲] دانشیار، گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
[۳] استاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
[۴] دانشیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

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

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۸/۱۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۱۱/۰۹

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

چکیده

سابقه و هدف: ازدیاد پاسخ سلول‌های T کمکی ۲۲ (T helper 22, Th22) در پاتوژنز دیابت ملیتوس نوع ۲ (T2DM) دخیل است. در این مطالعه، فاکتور رونویسی سلول‌های Th22 (AHR) و اینترلوکین ۲۲ (IL-22) در سلول‌های $CD4^+$ T و نیز تأثیر مصرف خوراکی امپاگلیفلوزین بررسی شد. همچنین همبستگی بین فاکتورهای یادشده و پارامترهای بالینی در بیماران تعیین شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد-شاهدی ۵۰ بیمار تحت درمان با متفورمین و گلیکلازید به دو گروه مساوی دریافت‌کننده امپاگلیفلوزین ($EMPA^+$) و غیر دریافت‌کننده امپاگلیفلوزین ($EMPA^-$، گروه شاهد) تقسیم شدند. سلول‌های $CD4^+$ T خون محیطی در روز شروع و ۶ ماه بعد از درمان از بیماران جداسازی و میزان بیان ژنی AHR و IL-22 با استفاده از Real-time PCR و میزان ترشح IL-22 بعد از تحریک با استفاده از تکنیک الایزا سنجیده شد.

یافته‌ها: میزان گلوکز پلاسمای ناشتا و هموگلوبین A1c در گروه $EMPA^+$ پس از دوره درمان با امپاگلیفلوزین در مقایسه با روز شروع کاهش داشت ($P<۰/۰۰۱$ و $P=۰/۰۴$). کاهش میزان بیان ژنی IL-22 و ترشح IL-22 پس از ۶ ماه از آغاز درمان با امپاگلیفلوزین دیده شد ($P=۰/۰۱۱$ و $P=۰/۰۰۱$). همبستگی مثبت معنی‌داری میان ترشح IL-22 و بیان ژنی آن با AHR و گلوکز پلاسمای ناشتا و هموگلوبین A1c در بیماران $EMPA^+$ بعد از درمان مشاهده شد ($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: امپاگلیفلوزین علاوه بر خواص ضددیابتی، اثرات ضدالتهابی روی سیستم ایمنی بدن به‌خصوص فاکتورهای مربوط به سلول‌های Th22 دارد.

واژگان کلیدی: امپاگلیفلوزین، اینترلوکین ۲۲، دیابت شیرین نوع ۲، سلول T کمکی ۲۲

مقدمه

دیابت شیرین نوع ۲ (Type 2 diabetes mellitus, T2DM) با مقادیر زیاد گلوکز در گردش خون و مقاومت به انسولین در بیماران مشخص می‌شود و با التهاب مزمن سیستم ایمنی بدن در ارتباط است [۱،۲]. لنفوسیت‌های T کمکی (T helper cells, Th) با مارکر $CD4^+$ شناسایی می‌شوند و بخش عمده‌ای از سیستم ایمنی اکتسابی را تشکیل می‌دهند. این سلول‌ها با ترشح سایتوکاین‌های مختلف نقش مؤثری در ایجاد و پیشبرد التهاب در بیماران دارند [۱]. سلول‌های Th بسته به خصوصیات و عملکرد منحصربه‌فرد آن‌ها به زیرگروه‌های پیش‌التهابی (مانند Th1، Th17 و Th22) و ضدالتهابی (مانند سلول‌های T تنظیم‌کننده) تقسیم می‌شوند [۱،۳].

در سیستم ایمنی بدن لنفوسیت‌های Th22 با بیان فاکتور رونویسی آریل هیدروکربن (Aril Hydrocarbon Receptor, AHR) و ترشح اینترلوکین ۲۲ (Interleukin 22, IL-22) مشخص می‌شوند [۴]. این سلول‌ها نقش فعالی در پاتوژنز بیماری‌های خودایمن و التهابی همانند لوپوس اریتماتوز، آرتریت

روماتوئیت و دیابت ملیتوس نوع ۱ و ۲ ایفا می‌کنند؛ به‌طور مثال، برخی از مطالعات پیشین نشان داده است درصد و غلظت گردشی سلول‌های Th22 و IL-22 در بیماران مبتلابه لوپوس، آرتریت روماتوئیت و دیابت نوع ۱ نسبت به افراد سالم افزایش معنی‌داری داشته است و به‌عنوان فاکتور فعال در پاتوژنز بیماری‌های ذکرشده ایفای نقش می‌کنند [۵-۷]. مطالعات انجام شده روی افراد مبتلابه T2DM نشان داده است در پاتوژنز بیماری، سلول‌های Th22 رابطه مستقیمی با میزان مقاومت به انسولین دارند [۸]. از طرف دیگر، فراوانی سلول‌های Th22 ($CD4^+IL\text{-}22^+$) در خون محیطی و سطح سرمی IL-22 در بیماران T2DM نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است [۸، ۹]. همچنین درصد سلول‌های $CD4^+IL\text{-}22^+$ در بافت چربی افراد چاق و دیابتی نسبت به افراد سالم بیشتر است [۱۰].

تجویز داروهای روتین ضددیابتی مانند متفورمین و گلیکلازید به‌عنوان خط اول درمانی در بیماری T2DM مطرح است که با سرکوب گلوکونئوژنز و افزایش جذب گلوکز سبب بهبود بیماری می‌شود [۱۱، ۱۲]. گروه دیگری از داروهای ضددیابتی مهارکننده‌های پمپ هم‌انتقالی سدیم و گلوکز نوع دو (Sodium glucose cotransporter-2, SGLT2) هستند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به امپاگلیفلوزین اشاره کرد که اخیراً در درمان بیماران T2DM استفاده می‌شود. این دارو با مهار پمپ SGLT2 در قسمت پروگزیمال نفرون‌ها، مانع بازجذب گلوکز دفعی به خون و در مسیری مستقل از انسولین، باعث کاهش قند خون می‌شود [۱۳]. برخی از مطالعات اخیر نشان داده است مصرف امپاگلیفلوزین اثر ضدالتهابی نیز دارد؛ مثلاً مصرف این دارو باعث کاهش میزان سطح سرمی برخی از فاکتورهای التهابی مانند C-reactive protein (CRP)، Tumor necrosis factor-α (TNF-α) و IL-6 در مدل موش دیابتی شده است [۱۴]. همچنین تجویز امپاگلیفلوزین سبب کاهش سطح سرمی CRP و افزایش غلظت سرمی سایتوکاین ضدالتهابی IL-10 در بیماران دیابتی می‌شود [۱۵].

با درنظرگرفتن مطالب عنوان‌شده، تغییرات سلول‌های Th22 نقشی کلیدی در پاتوژنز بیماری T2DM ایفا می‌کند. طبق دانش نویسندگان و بر اساس جست‌وجوهای به‌عمل‌آمده در پایگاه‌های اطلاعاتی و استنادی، مطالعه‌ای در رابطه با تغییرات فاکتور رونویسی Th22 و سایتوکاین IL-22 ترشح‌شده از سلول‌های T $CD4^+$ جداشده از بیماران T2DM در دسترس نیست. از طرف دیگر، اثرات احتمالی مصرف امپاگلیفلوزین روی سلول‌های Th22 و فاکتورهای مرتبط در بیماران ناشناخته است. به همین منظور مطالعه حاضر با هدف تعیین میزان بیان ژنی فاکتور رونویسی سلول‌های Th22 (AHR) و IL-22 و نیز میزان ترشح IL-22 از سلول‌های T $CD4^+$ در بیماران مبتلابه T2DM انجام گرفت و تأثیر تجویز ۱۰ میلی‌گرم در روز امپاگلیفلوزین خوراکی بر فاکتورهای مربوط به Th22 در بیماران در مقایسه با گروه شاهد بررسی شد. تعیین همبستگی بین فاکتورهای بیان‌شده و پارامترهای بالینی از اهداف دیگر مطالعه حاضر است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورد-شاهدی ۵۰ بیمار مبتلابه T2DM به‌طور تصادفی از بخش داخلی بیمارستان شهید بهشتی همدان انتخاب و به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول ۲۵ بیمار (۷ زن و ۱۸ مرد) T2DM با میانگین سنی ۷/۶۴ ± ۵۱/۳۶ سال و طول دوره بیماری ۳/۲۳ ± ۶/۲۵ بودند که در طول مطالعه داروی امپاگلیفلوزین دریافت نکردند ($EMPA^-$). گروه دوم شامل ۲۵ بیمار (۹ زن و ۱۶ مرد) T2DM با میانگین سنی ۵/۹۴ ± ۵۴/۶۸ سال و طول دوره بیماری ۳/۰۱ ± ۶/۵۶ بودند که از ابتدای مطالعه به مدت ۶ ماه داروی امپاگلیفلوزین با دُز درمانی ۱۰ میلی‌گرم در روز دریافت کردند.

دو گروه مطالعه‌شده از لحاظ میانگین سنی، جنسیت و طول مدت بیماری تا حد ممکن همسان‌سازی شدند و تفاوت معناداری بین آن‌ها مشاهده نشد. تمامی افراد دو گروه به‌صورت یکسان ۶ ماه قبل از شروع مطالعه داروهای ضددیابتی متفورمین (۵۰۰ میلی‌گرم در روز) و گلیکلازید (۸۰ میلی‌گرم در روز) دریافت می‌کردند و در طول مطالعه نیز درمان پایه خود با متفورمین و گلیکلازید را ادامه دادند. تشخیص بیماری توسط پزشک متخصص و بر اساس معیارهای انجمن دیابت آمریکا سال ۲۰۱۹ انجام شد.

معیارهای ورود بیماران به مطالعه شامل این موارد بود: ۱) گلوکز پلاسمای ناشتا (Fasting Plasma glucose, FPG) بیشتر از ۱۲۵ میلی‌گرم بر دسی لیتر؛ ۲) هموگلوبین A1c (HbA1c) بیشتر از ۶/۵ درصد؛ ۳) آلبومینوری کمتر از ۳۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر؛ ۴) میزان فیلتراسیون گلومرولی (GFR) بیشتر از ۶۰ میلی‌لیتر بر دقیقه (۱/۷۳ مترمربع)؛ ۵) محدوده سنی ۱۸ تا ۶۰ سال. معیارهای خروج بیماران از مطالعه شامل این موارد بود: ۱) بیماران مبتلابه بیماری‌های دیگر مانند دیابت نوع ۱، آلرژی، نارسایی کبدی، اختلالات خودایمن و نئوپلازی‌ها؛ ۲) بیماران با علائم نفروپاتی، نوروپاتی، رتینوپاتی و عوارض قلبی-عروقی، عفونت حاد یا مزمن؛ ۳) HbA1c بیشتر از ۹ درصد؛ ۴) مصرف داروهایی مانند انسولین، مهارکننده‌های دیپپتیدیل پپتیداز-IV، استروئیدها، داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی و آنتی‌بیوتیک‌ها (حداقل ۶ ماه قبل از شروع مطالعه).

نمونه‌گیری و جداسازی سلول‌های ایمنی

از بیماران هر دو گروه در روز شروع و ۶ ماه بعد، ۱۰ میلی‌لیتر خون وریدی از بازو گرفته شد و نمونه‌های خون در لوله‌های استریل حاوی EDTA ریخته شد. سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (Peripheral blood mononuclear cell, PBMCs) با استفاده از روش فایکول (Sigma, Germany) جدا شدند.

جدول ۱: پرایمرهای استفاده‌شده

نام ژن	شماره ژن	پرایمر پیشرو 5′ to 3′	پرایمر معکوس 5′ to 3′	منبع
IL-22	NM_020525.5	GCTTGACAAGTCCAACTTCCA	GCTCACTCATACTGACTCCGTG	[۱۷]
AHR	NM_001621.5	ATACCGAAGACCGAGCTGAAT	CCAGCAGACACCTTAGACGAC	[۱۸]
GAPDH	NM_001289746.1	GCCATCAATGACCCCTTCATT	TTGACGGTGCCATGGAATTT	[۱۹]

برای جداسازی PBMCها، خون کامل به نسبت ۱:۱ با بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) استریل رقیق شد. سپس به‌آرامی روی فایکول استریل منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه با ۲۲۰۰ دور در دقیقه‌در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. PBMCها پس از جداسازی شسته و در محیط کشت سلولی حاوی RPMI ۱۶۴۰، L-گلوتامین (۲ میلی‌مولار) پنی‌سیلین (هزار واحد در میلی‌لیتر) استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و سرم جنین گاوی ۱۰ درصد نگهداری شدند. تمام مواد استفاده‌شده در محیط کشت سلولی از شرکت Biosera کشور فرانسه تهیه شدند.

برای جداسازی سلول‌های $CD4^+$ T از روش انتخاب مثبت تکنیک جداسازی سلول بیدهای مغناطیسی فعال‌شده (Magnetic activated cell sorting, MACS) طبق پروتکل کیت شرکت (Miltenyi, Germany) سازنده استفاده شد. در این روش PBMCها به مدت ۳۰ دقیقه با میکروبیدهای ضد $CD4^+$ انکوبه و در مجاورت میدان مغناطیسی از ستون‌های MACS عبور داده شدند. سلول‌های $CD4^+$ ایزوله‌شده برای استفاده در محیط کشت سلولی نگهداری شدند.

بررسی بیان ژن

RNA تام از نمونه سلول‌های $CD4^+$ تمامی بیماران در دو نوبت، روز شروع مطالعه و ۶ ماه بعد بر اساس دستورالعمل کیت شرکت سازنده (Qiagen, USA) استخراج و غلظت آن با دستگاه نانودراپ (Thermo scientific, USA) اندازه‌گیری شد. برای بررسی کیفیت RNA استخراج‌شده و نیز به‌منظور بررسی میزان آلودگی RNA با پروتئین و DNA نسبت OD ۲۶۰/۲۸۰ بررسی و نمونه‌هایی وارد مطالعه شدند که در محدوده نرمال و بیشتر از ۱/۸ بودند. سپس سنتز cDNA طبق دستورالعمل کیت سازنده (SMOBIO, Taiwan) صورت گرفت.

ارزیابی بیان ژن‌های IL-22 و AHR با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Real-time PCR) حاوی سایبرگرین انجام شد و طبق پروتکل دمایی زیر صورت گرفت: مرحله فعال‌سازی آنزیم (۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد)، مرحله واسرشت (دناتوراسیون) (۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد)، مرحله اتصال پرایمر (۳۰ ثانیه در دمای ۶۱ درجه سانتی‌گراد) و فاز تکثیر (۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد). از ژن GAPDH به‌عنوان ژن مرجع و فرمول $2^{-\Delta Cq}$ ($\Delta Cq=Cq$ target gene – Cq reference gene) برای تعیین بیان نسبی ژن‌ها استفاده شد [۱۶]. پرایمرهای استفاده‌شده در جدول ۱ آورده شده است.

کشت سلولی

سلول‌های $CD4^+$ T خالص‌شده داخل پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای (Jet Biofil, China) قرار داده و با استفاده از محرک anti-CD3 (Biolegend, USA) با غلظت ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر و anti-CD28 با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر به مدت ۴ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO2 ۵ درصد تحریک شدند. سپس مایع رویی (Supernatant) کشت سلولی جمع‌آوری و تا زمان اندازه‌گیری میزان IL-22 در دمای ۸۰- درجه نگهداری شد.

بررسی سایتوکاین

میزان IL-22 در مایع رویی کشت سلولی با استفاده از تکنیک الایزا طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Biolegend, USA) سنجیده شد. برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها و ترسیم نمودارها به ترتیب از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۱) و GraphPad Prism استفاده شد. نرمال‌بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو ویک بررسی شد. تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون‌های پارامتریک (آزمون تی مستقل برای مقایسه بین‌گروهی و آزمون تی جفت برای مقایسه درون‌گروهی) صورت گرفت. از آزمون همبستگی پیرسون برای مقایسه ارتباط بین متغیرها استفاده شد. سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی تأثیر مصرف امپاگلیفلوزین بر پارامترهای دیابت

اطلاعات بالینی هر دو گروه بیماران غیر دریافت‌کننده ($EMPA^-$) و دریافت‌کننده امپاگلیفلوزین ($EMPA^+$) در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج به‌دست‌آمده کاهش قابل توجهی را در میزان FPG و درصد HbA1c در گروه $EMPA^+$ پس از ۶ ماه درمان با امپاگلیفلوزین در مقایسه با روز شروع نشان داد (به ترتیب P<۰/۰۰۱ و P=۰/۰۴). در مقایسه بین‌گروهی، میزان FPG و درصد HbA1c در گروه غیر دریافت‌کننده امپاگلیفلوزین در مقایسه با گروه دریافت‌کننده آن، بعد از ۶ ماه کاهش معنی‌داری را نشان داد (به ترتیب P=۰/۰۰۴ و P=۰/۰۰۱). در سایر پارامترهای بالینی ازجمله شاخص توده بدنی، آلبومینوری، GFR و کراتینین در بیماران تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ۲: مشخصات پایه گروه‌های مطالعه‌شده

	بیماران غیر دریافت‌کننده امپاگلیفلوزین EMPA (-)		بیماران دریافت‌کننده امپاگلیفلوزین EMPA (+)	
	روز شروع	۶ ماه بعد	روز شروع	۶ ماه بعد
گلوکز پلاسما ناشتا (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	۱۶۳/۴۴ ± ۳۹/۲۳	۱۵۲/۸۸ ± ۳۳/۶۱	۱۶۸/۷۶ ± ۳۹/۷۲	۱۲۷/۵۶ ± ۲۱/۵۴ [a, b]
HbA1c (درصد)	۷/۵۱ ± ۰/۸۸	۷/۲۴ ± ۰/۸۱	۷/۷۹ ± ۰/۷۹	۶/۸۱ ± ۰/۶۹ [c, d]
GFR (میلی‌لیتر در دقیقه/ ۱/۷۳ مترمربع)	۷۸/۰۹ ± ۱۴/۷۵	۷۹/۰۹ ± ۱۲/۳۰	۷۵/۹۲ ± ۱۶/۷۳	۷۴/۳۵ ± ۱۱/۷۱
آلبومینوری (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	۱۶/۲۲ ± ۷/۵۷	۱۴/۳۳ ± ۶/۰۷	۱۶/۸۱ ± ۸/۸۲	۱۸/۰۷ ± ۸/۳۸
کراتینین سرم (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	۰/۹۰ ± ۰/۱۷	۰/۸۸ ± ۰/۱۸	۰/۹۴ ± ۰/۲۳	۰/۹۶ ± ۰/۱۸
شاخص توده بدنی (کیلوگرم بر مترمربع)	۲۷/۲۰ ± ۳/۴۴	۲۷/۹۷ ± ۳/۸۷	۲۷/۸۱ ± ۴/۰۴	۲۷/۳۱ ± ۳/۹۱

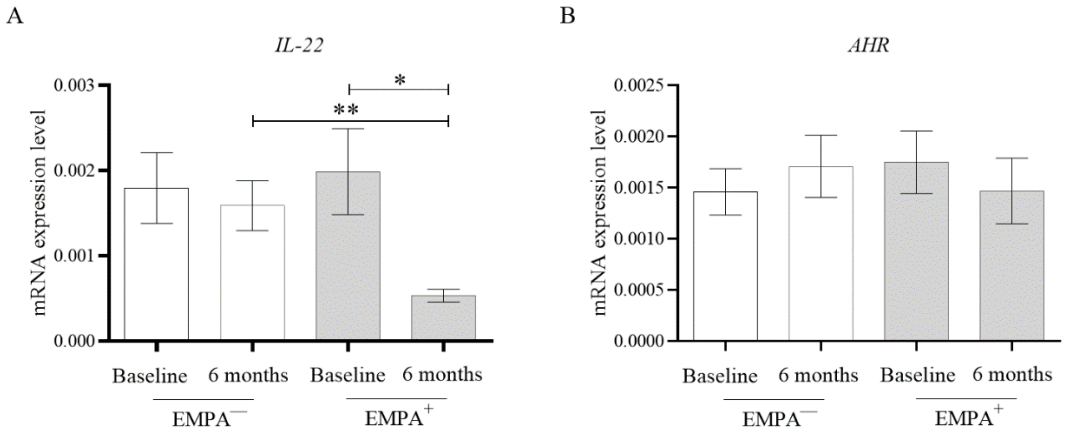
مقادیر بر حسب میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند. [a] در مقایسه با روز شروع بیماران دریافت‌کننده امپاگلیفلوزین (P<۰/۰۰۱). [b] در مقایسه با ۶ ماه بعد بیماران غیر دریافت‌کننده امپاگلیفلوزین (P=۰/۰۰۴). [c] در مقایسه با روز شروع بیماران دریافت‌کننده امپاگلیفلوزین (P=۰/۰۴). [d] در مقایسه با ۶ ماه بعد بیماران غیر دریافت‌کننده امپاگلیفلوزین (P=۰/۰۰۱).

بررسی تأثیر مصرف امپاگلیفلوزین بر بیان ژن‌های IL-22 و AHR

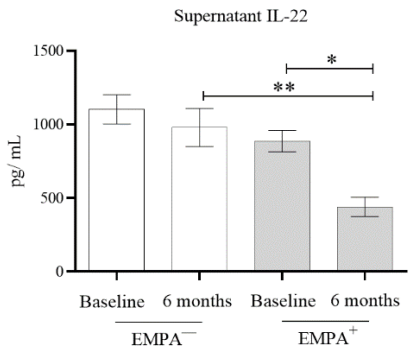
برای بررسی تأثیر امپاگلیفلوزین بر بیان ژنی فاکتور رونویسی و سایتوکاین اصلی Th22، میزان بیان ژن IL-22 و AHR بررسی شد. یافته‌ها حاکی از آن است که میزان بیان ژنی IL-22 در گروه $EMPA^+$ پس از ۶ ماه از آغاز درمان (Baseline) کاهش معنی‌داری داشت (P=۰/۰۱۱، شکل A۱). افزون بر این، در مقایسه بین‌گروهی، میزان بیان ژنی IL-22 در گروه بیماران $EMPA^-$ در مقایسه با گروه $EMPA^+$ بعد از ۶ ماه درمان کاهش قابل توجهی مشاهده شد (P=۰/۰۰۳، شکل A۱). در طول دوره مطالعه هیچ تغییر معنی‌داری در بیان ژن AHR در هر دو گروه $EMPA^-$ و $EMPA^+$ یافت نشد (شکل B۱).

بررسی تأثیر مصرف امپاگلیفلوزین بر میزان ترشح IL-22

به منظور بررسی تأثیر امپاگلیفلوزین بر میزان ترشح IL-22، سلول‌های $CD4^+$ T ایزوله شده از بیماران در محیط کشت سلولی تحریک و سطح IL-22 با تکنیک الایزا اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد میزان ترشح IL-22 در بیماران $EMPA^+$ پس از ۶ ماه درمان با امپاگلیفلوزین در مقایسه با روز شروع کاهش یافته است (P=۰/۰۰۱)؛ اما چنین تغییری در بیماران $EMPA^-$ مشاهده نشد. تحلیل بین‌گروهی نیز نشان داد میزان ترشح IL-22 در بیماران $EMPA^+$ کمتر از بیماران $EMPA^-$ بعد از ۶ ماه درمان است (P=۰/۰۰۴). این در حالی است که تفاوت معنی‌داری در مقایسه بین دو گروه $EMPA^-$ و $EMPA^+$ در حالت پایه (روز شروع) وجود نداشت (شکل ۲).



شکل ۱: تأثیر مصرف امپاگلیفلوزین بر بیان ژن‌های IL-22 و AHR



شکل ۲: بررسی تأثیر مصرف امپاگلیفلوزین بر میزان ترشح IL-22

بررسی همبستگی بین IL-22 با AHR و پارامترهای دیابت

همان‌طور که در جدول ۳ آمده، نتایج حاکی از آن است که در بیماران $EMPA^+$ بعد از ۶ ماه درمان، بین میزان ترشح IL-22 با بیان ژن‌های IL-22 و AHR و پارامترهای FPG و HbA1c همبستگی مثبت معنی‌داری وجود دارد (به ترتیب P<۰/۰۰۱، P<۰/۰۰۱، P<۰/۰۰۱ و P=۰/۰۰۲). علاوه بر این، همبستگی مثبت معنی‌داری میان بیان ژنی IL-22 با بیان AHR و پارامترهای FPG و HbA1c در بیماران $EMPA^+$ مشاهده شد (P<۰/۰۰۱، P<۰/۰۰۱ و P=۰/۰۰۴).

جدول ۳: همبستگی بین متغیرهای مطالعه‌شده در بیماران دریافت‌کننده امپاگلیفلوزین بعد از ۶ ماه

		میزان بیان ژن *IL-22*	میزان بیان ژن *AHR*	میزان FPG	درصد HbA1c
میزان ترشح IL-22	عدد r	۰/۹۳	۰/۷۵	۰/۸۷	۰/۵۷
	عدد P	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	۰/۰۰۲
میزان بیان ژن *IL-22*	عدد r	-	۰/۷۷	۰/۸۹	۰/۵۵
	عدد P	-	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	۰/۰۰۴

بحث

مطالعات پیشین شواهدی محکم مبنی بر عدم تنظیم مناسب سیستم ایمنی در بیماران مبتلابه T2DM را ارائه کرده‌اند [۱] و در این راستا نشان داده‌اند سلول‌های پیش‌التهابی Th22 در پاتوژنز بیماری T2DM نقش اساسی دارد و افزایش بیش‌ازاندازه فعالیت آن‌ها گزارش شده است [۸]. بااین‌حال، تأثیر داروی امپاگلیفلوزین بر زیرمجموعه Th22 در T2DM مطالعه نشده است. مطالعه حاضر با هدف تعیین تغییرات فاکتورهای رونویسی و سایتوکاین اصلی سلول‌های Th22 و ارتباط آن‌ها با پارامترهای بالینی در بیماران قبل و بعد از درمان با امپاگلیفلوزین انجام شد.

سلول‌های Th22 سلول‌های التهابی از لنفوسیت‌های $CD4^+$ T هستند که به‌طور اختصاصی IL-22 تولید می‌کنند، اما مولد IL-17 یا IFN-γ نیستند. این سلول‌ها فاکتور رونویسی AHR را بیان می‌کنند که نقش مهمی در تمایز این سلول‌ها و نیز بیان IL-22 از آن‌ها دارد [۴]. در حالت طبیعی عملکرد اصلی این سلول‌ها تنظیم سیستم ایمنی با القای تولید انواع سایتوکاین‌ها و تقویت دفاع میزبان در قبال پاتوژن‌هاست، ولی افزایش بی‌رویه آن‌ها در بیماری‌ها سبب تداخل در عملکرد سیستم ایمنی بدن و بروز التهاب می‌شود [۲۰, ۴].

برخی از مطالعات شواهدی ارائه داده‌اند که نشان می‌دهد درصد و عملکرد سلول‌های Th22 در بیماران دیابتی غیرطبیعی است؛ برای مثال Guo و همکاران نشان دادند غلظت IL-22 در سرم و نیز درصد این سلول‌های Th22 با فنوتایپ $CD4^+IFN\text{-}\gamma^-$ $IL\text{-}17A^-IL\text{-}22^+$ در خون محیطی بیماران T2DM در مقایسه با افراد سالم بیشتر است و ارتباط مستقیمی با شاخص مقاومت به انسولین دارد [۹]. در مطالعه دیگری Zhao و همکاران نشان دادند درصد سلول‌های Th22 در میان سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی و نیز سطح سرمی IL-22 در بیماران T2DM و افراد چاق در مقایسه با افراد سالم بیشتر است [۸]. همچنین تعداد این سلول‌ها در بافت چربی افراد دیابتی چاق نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است [۱۰].

از طرف دیگر، افزایش درصد سلول‌های Th22 و سطح سرمی IL-22 در بیماری‌های خودایمنی به دلیل خاصیت پیش‌التهابی ذاتی آن به‌عنوان یک عامل آسیب‌زا گزارش شده است [۲۱]؛ برای مثال، جمعیت سلول‌های Th22 و همچنین IL-22 در بیماران مبتلابه بیماری لوپوس اریتماتوز سیستمیک در مقایسه با افراد شاهد به‌شدت افزایش داشته است [۲۲, ۵]. Zhao و همکاران نشان دادند بین سلول‌های Th22 و Th17 (از عوامل دیگر مؤثر در التهاب) همبستگی مثبتی وجود دارد [۵]. علاوه بر این، da Rocha و همکاران نشان داده‌اند سلول‌های IL-22 در خون محیطی بیماران مبتلابه روماتوئید آرتریت افزایش داشته است که ارتباط مثبتی با فاکتور روماتوئید و شدت بیماری دارد [۶]. همچنین نشان داده شده است درصد سلول‌های Th22 در بیماران مبتلابه T1DM در مقایسه با افراد سالم به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است. یافته‌ها نشان داد Th22 ممکن است به پاتوژنز T1DM کمک کند [۷].

با توجه به مطالب عنوان‌شده، افزایش فاکتورهای مربوط به سلول‌های Th22 در بیماران مبتلابه T2DM مشاهده می‌شود. نتایج این مطالعه نشان داد امپاگلیفلوزین به‌عنوان یک داروی ضددیابتی، مقدار FPG و HbA1c را پس از ۶ ماه تجویز خوراکی کاهش می‌دهد. همچنین مصرف داروی امپاگلیفلوزین به مدت ۶ ماه، بیان ژنی IL-22 و تولید IL-22 از سلول‌های T کمکی را کاهش داد. میزان بیان ژنی و تولید IL-22 با بیان فاکتور

رونویسی AHR و پارامترهای بالینی (FPG و HbA1c) رابطه مثبت معنی‌داری داشت. در این مطالعه هر دو گروه دریافت‌کننده امپاگلیفلوزین و غیر دریافت‌کننده امپاگلیفلوزین، داروهای پایه متفورمین و گلیکلازید را با دُز یکسان دریافت کردند. این در حالی است که تغییرات قابل توجهی در ارتباط با فاکتورهای مرتبط با Th22 در گروه کنترل دیابتی بعد از ۶ ماه درمان مشاهده نشد که نشان‌دهنده تأثیرنداشتن داروهای متفورمین و گلیکلازید بر سلول‌های ذکرشده است.

هم‌راستا با نتایج این مطالعه، تحقیقات پیشین خاصیت ضدالتهابی امپاگلیفلوزین را بر سایر فاکتورهای التهابی نشان داده‌اند. در مطالعه‌ای، Iannantuoni و همکاران کاهش التهاب و فاکتور التهابی CRP را در بیماران T2DM بعد از ۲۴ هفته درمان با امپاگلیفلوزین مشاهده کردند [۱۵]. افزون بر این، یک مطالعه روی موش‌های دیابتی آشکار کرد که تجویز امپاگلیفلوزین باعث کاهش غلظت پلاسمایی IL-6 و TNF-α (از دیگر عوامل مؤثر در التهاب) در مقایسه با گروه شاهد می‌شود [۱۴].

یافته‌های قبلی نشان داده‌اند IL-22 نقش فعالی در التهاب مزمن دارد و موجب ایجاد مقاومت به انسولین، اختلالات متابولیکی و نیز عوارض مرتبط با بیماری همانند رتینوپاتی و بیماری عروق کرونری می‌شود. همچنین همبستگی مثبت معنی‌داری بین فراوانی سلول‌های Th22 و مقاومت به انسولین گزارش شده است [۹, ۲۳, ۲۴]. مطالعات نشان می‌دهد IL-22 با اتصال به گیرنده خود و فعال‌سازی پروتئین‌های Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) سبب مقاومت به انسولین و اختلال سلول‌های β پانکراس می‌شود [۸]. از طرف دیگر، برخی از مطالعات به شواهدی اشاره کرده‌اند که نشان می‌دهد مصرف امپاگلیفلوزین باعث بهبود التهاب، مقاومت به انسولین و عملکرد سلول‌های بتای پانکراس در افراد T2DM می‌شود [۲۵, ۲۶].

بااین‌وجود مطالعه حاضر صرفاً اثرات ضدالتهابی داروی امپاگلیفلوزین را بر فاکتورهای مرتبط با سلول‌های Th22 آشکار می‌سازد. با توجه به مطالب ذکرشده و اثبات نقش تعیین‌کننده Th22 در پاتوژنز T2DM و همچنین تأثیر مهار Th22 در بهبود التهاب و وجود ارتباط مستقیم بین کاهش IL-22 با مصرف امپاگلیفلوزین، شاید بتوان نتیجه گرفت که مصرف این دارو از طریق کاهش فاکتورهای مرتبط با Th22 (در کنار کاهش گلوکز خون) سبب کاهش مقاومت به انسولین و جلوگیری از پیشرفت بیماری می‌شود. بااین‌حال، ارزیابی‌های بیشتری در زمینه اثرات مستقیم این دارو و مکانیسم تغییرات سلول‌های Th22 در ارتباط با مقاومت به انسولین و اختلال سلول‌های بتای پانکراس نیاز است.

از محدودیت‌های این مطالعه اینکه در این طرح صرفاً اثر داروی امپاگلیفلوزین بر سلول‌های Th22 بررسی شد. مطالعات آینده می‌توانند اثر این دارو را روی سایر زیرگروه‌های سلول‌های T مانند Th1، Th17، Treg، Th9 و Th2 بررسی کنند. همچنین در این مطالعه IL-22 در مایع رویی کشت سلول‌های T کمکی بررسی شد، ولی برای تأیید نتایج آن اندازه‌گیری فلوسایتومتریک سایتوکاین‌های داخل‌سلولی می‌تواند در تحقیقات آینده صورت پذیرد. علاوه بر این، در تحقیقات آینده بررسی تغییرات سلول‌های Th22 و ژن‌های مرتبط در زیرگروه‌های مختلف بیماری مانند نفروپاتی دیابتی، رتینوپاتی دیابتی و نوروپاتی دیابتی می‌تواند مدنظر باشد. همچنین مطالعه مکانیسم مولکولی امپاگلیفلوزین روی سیستم ایمنی در بافت‌های مرتبط با دیابت مثل پانکراس می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، خواص ضدالتهابی مصرف داروی امپاگلیفلوزین به مدت ۶ ماه بر فاکتورهای اصلی سلول‌های Th22 با کاهش هم‌زمان بیان ژنی و تولید IL-22 نشان داده شد. از طرف دیگر، همبستگی مثبتی میان IL-22 با بیان ژنی فاکتور رونویسی سلول‌های Th22 (AHR) مشاهده شد. در بیماران درمان‌شده با امپاگلیفلوزین، ارتباط مستقیم فاکتورهای Th22 (تغییرات ژنی و سایتوکاینی) با گلوکز پلاسمای ناشتا و هموگلوبین A1c رؤیت شد. احتمالاً این نتایج نشان می‌دهد درمان با امپاگلیفلوزین به‌عنوان یک داروی ضددیابتی برای تعدیل وضعیت التهاب در بیماران T2DM از طریق کاهش Th22 مفید است.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد ایمونولوژی پزشکی مصوب دانشگاه علوم پزشکی همدان به شماره ۹۸۰۸۲۸۶۲۴۵ است. از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه به‌خاطر حمایت مالی از این مطالعه قدردانی می‌شود. همچنین از تمامی بیمارانی که در پیشبرد پژوهش همکاری داشتند، بسیار سپاسگزاری می‌کنیم.

تضاد منافع

نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان تعارض ندارد.

ملاحظات اخلاقی

این پروژه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان با کد اخلاق IR.UMSHA.REC.1398.648 تصویب شده است. همچنین از تمام بیماران قبل از ورود به مطالعه رضایت‌نامه آگاهانه کتبی گرفته شده است.

سهم نویسندگان

نویسنده اول: (پژوهشگر اصلی) تدوین پروپوزال، انجام تست‌های آزمایشگاهی و مشارکت در نگارش مقاله (۳۰ درصد)؛

نویسنده دوم: (پژوهشگر همکار) مشاور علمی، معرفی بیماران، انجام معاینات و تست‌های بالینی، ویرایش مقاله (۲۵ درصد)؛ نویسنده سوم: (پژوهشگر همکار) مشاور علمی، مشارکت در نگارش و ویرایش مقاله (۱۵ درصد)؛ نویسنده چهارم: (پژوهشگر اصلی) مسئول مکاتبات، طراحی پروژه، اجرا و نظارت بر آن، انجام تحلیل‌های آماری، نگارش مقاله (۳۰ درصد).

حمایت مالی

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

REFERENCES

1. 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
2. Calle MC, Fernandez ML. Inflammation and type 2 diabetes. *Diabetes Metab*. 2012;**38**(3):183-91. PMID: 22252015 DOI: 10.1016/j.diabet.2011.11.006
3. Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2010;**130**(5):1373-83. PMID: 20032993 DOI: 10.1038/jid.2009.399
4. Jia L, Wu C. The biology and functions of Th22 cells. *Adv Exp Med Biol*. 2014;**841**:209-30. PMID: 25261209 DOI: 10.1007/978-94-017-9487-9_8
5. Zhao L, Jiang Z, Jiang Y, Ma N, Wang K, Zhang Y, et al. IL-22+CD4+ T-cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013;**238**(2):193-9. PMID: 23576801 DOI: 10.1177/1535370213477597
6. da Rocha LF Jr, Duarte AL, Dantas AT, Mariz HA, Pitta Ida R, Galdino SL, et al. Increased serum interleukin 22 in patients with rheumatoid arthritis and correlation with disease activity. *J Rheumatol*. 2012;**39**(7):1320-5. PMID: 22589261 DOI: 10.3899/jrheum.111027
7. Xu X, Zheng S, Yang F, Shi Y, Gu Y, Chen H, et al. Increased Th22 cells are independently associated with Th17 cells in type 1 diabetes. *Endocrine*. 2014;**46**(1):90-8. PMID: 23928796 DOI: 10.1007/s12020-013-0030-z
8. Zhao R, Tang D, Yi S, Li W, Wu C, Lu Y, et al. Elevated peripheral frequencies of Th22 cells: a novel potent participant in obesity and type 2 diabetes. *PLoS One*. 2014;**9**(1):e85770. PMID: 24465695 DOI: 10.1371/journal.pone.0085770
9. Guo H, Xu BC, Yang XG, Peng D, Wang Y, Liu X B, et al. A high frequency of peripheral blood IL-22(+) CD4(+) T cells in patients with new onset type 2 diabetes mellitus. *J Clin Lab Anal*. 2016;**30**(2):95-102. PMID: 25425169 DOI: 10.1002/jcla.21821
10. Dalmas E, Venteclef N, Caer C, Poitou C, Cremer I, Aron-Wisnewsky J, et al. T cell-derived IL-22 amplifies IL-1β-driven inflammation in human adipose tissue: relevance to obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2014;**63**(6):1966-77. PMID: 24520123 DOI: 10.2337/db13-1511
11. Fujita Y, Inagaki N. Metformin: new preparations and nonglycemic benefits. *Curr Diab Rep*. 2017;**17**(1):5. PMID: 28116648 DOI: 10.1007/s11892-017-0829-8
12. Araújo AA, Morais HB, Medeiros C, Brito GA, Guedes PM, Hiyari S, et al. Gliclazide reduced oxidative stress, inflammation, and bone loss in an experimental periodontal disease model. *J Appl Oral Sci*. 2019;**27**:e20180211. PMID: 30810635 DOI: 10.1590/1678-7757-2018-0211
13. Frampton JE. Empagliflozin: a review in type 2 diabetes. *Drugs*. 2018;**78**(10):1037-48. PMID: 29946963 DOI: 10.1007/s40265-018-0937-z
14. Han JH, Oh TJ, Lee G, Maeng HJ, Lee DH, Kim KM, et al. The beneficial effects of empagliflozin, an SGLT2 inhibitor, on atherosclerosis in ApoE (-/-) mice fed a western diet. *Diabetologia*. 2017;**60**(2):364-76. PMID: 27866224 DOI: 10.1007/s00125-016-4158-2
15. Iannantuoni F, Diaz-Morales N, Falcon R, Bañuls C, Abad-Jimenez Z, Victor VM, etal. The SGLT2 inhibitor empagliflozin ameliorates the inflammatory profile in type 2 diabetic patients and promotes an antioxidant response in leukocytes. *J Clin Med*. 2019;**8**(11):1814. PMID: 31683785 DOI: 10.3390/jcm8111814
16. 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
17. Jiang R, Wang H, Deng L, Hou J, Shi R, Yao M, etal. IL-22 is related to development of human colon cancer by activation of STAT3. *BMC Cancer*. 2013;**13**:59. PMID: 23379788 DOI: 10.1186/1471-2407-13-59
18. Cheng L, Qian L, Tan Y, Wang GS, Li XM, Li XP, et al. Unbalanced expression of aryl hydrocarbon receptor in peripheral blood CCR6(+)CD4(+) and CD4(+)CD25(+) T cells of rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reumatol Engl Ed*. 2017;**57**(3):190-6. PMID: 28535889 DOI: 10.1016/j.rbre.2016.07.002
19. Hoseini-Aghdam M, Sheikh V, Eftekharian MM, Rezaeepoor M, Behzad M. Enhanced expression of TIGIT but not neuropilin-1 in patients with type 2 diabetes mellitus. *Immunol Lett*. 2020;**225**:1-8. PMID: 32540486 DOI: 10.1016/j.imlet.2020.06.003
20. Sabat R, Ouyang W, Wolk K. Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;**13**(1):21-38. PMID: 24378801 DOI: 10.1038/nrd4176
21. Azizi G, Yazdani R, Mirshafiey A. Th22 cells in autoimmunity: a review of current knowledge. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2015;**47**(4):108-17. PMID: 26159476
22. Zhong W, Jiang Y, Ma H, Wu J, Jiang Z, Zhao L. Elevated levels of CCR6(+) T helper 22 cells correlate with skin and renal impairment in systemic lupus erythematosus. *Sci Rep*. 2017;**7**(1):12962. PMID: 29021537 DOI: 10.1038/s41598-017-13344-w
23. Chen H, Wen F, Zhang X, Su SB. Expression of T-helper-associated cytokines in patients with type 2 diabetes mellitus with retinopathy. *Mol Vis*. 2012;**18**:219-26. PMID: 22312190
24. Gong F, Wu J, Zhou P, Zhang M, Liu J, Liu Y, et al. Interleukin-22 might act as a double-edged sword in type 2 diabetes and coronary artery disease. *Mediators Inflamm*. 2016;**2016**:8254797. PMID: 27829708 DOI: 10.1155/2016/8254797
25. Ferrannini E, Muscelli E, Frascerra S, Baldi S, Mari A, Heise T, et al. Metabolic response to sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in type 2 diabetic patients. *J Clin Invest*. 2014;**124**(2):499-508. PMID: 24463454 DOI: 10.1172/jci72227
26. Al Jobori H, Daniele G, Adams J, Cersosimo E, Solis-Herrera C, Triplitt C, etal. Empagliflozin treatment is associated with improved β-cell function in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;**103**(4):1402-7. PMID: 29342295 DOI: 10.1210/jc.2017-01838