

## ***DRD2 Dopamine Receptor and IL-1 $\beta$ Gene Expression Changes Involved in Wound Healing in Type 2 Diabetic Patients with Foot Ulcer***

Neda Ebrahimzadeh<sup>1</sup>,  
Hajar Vaseghi<sup>2</sup>,  
Garshasb Rigi<sup>3</sup>,  
Gholamreza Esmaeeli Djavid<sup>2</sup>,  
Shahla Mohammad Ganji<sup>4</sup>,  
Amirreza Farhoud<sup>5</sup>,  
Majid Pornour<sup>2</sup>

<sup>1</sup>MSc Student in Genetics, Department of Biology, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran

<sup>2</sup>Assistant Professor, Photo Healing and Regeneration Group, Medical Laser Research Center, ACECR, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Basic Science, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran

<sup>4</sup>Assistant Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

<sup>5</sup>Assistant Professor, Department of Orthopedics, Imam Khomeini Hospital Complex, Tehran University of Medical Sciences (TUMS), Tehran, Iran

(Received September 19, 2017 ; Accepted December 11, 2017)

### ***Abstract***

**Background and purpose:** Diabetic foot ulcer is a complication of type 2 diabetes. Various factors, such as changes in the level of cytokines (especially IL-1 $\beta$ ) can interfere with the development of diabetic foot ulcer. Several factors affect the level of IL-1 $\beta$  levels, including the rate of neurotransmitter, especially dopamine and its receptors. The aim of this study was to investigate the changes in IL-1 $\beta$  and dopamine DRD2 receptor in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in diabetic foot ulcers.

**Materials and methods:** In a cross sectional comparative study, peripheral blood samples were collected from 31 subjects with diabetic foot ulcer, 29 without ulcer, and 25 healthy individuals (control). Total mRNA was extracted from PBMCs and cDNA was synthesized to study the DRD2 and il-1 $\beta$  gene expression variations by real time PCR. Concentration of il-1 $\beta$  was also investigated in sera.

**Results:** Significant decrease was seen in gene expression and sera concentration of il-1 $\beta$  in PBMCs in diabetic patients with foot ulcer. There was also a significant reduction in the expression of DRD2 receptor gene in patients with and without foot ulcer.

**Conclusion:** Reduction of IL-1 $\beta$  expression seems to be related to changes in the expression of DRD2 receptor gene. Therefore, after supplementary studies, reducing the expression of DRD2 could be regarded as a prognostic factor and as an effective factor in the spread of diabetic foot ulcer.

**Keywords:** diabetes, foot ulcer, dopamine receptor, gene expression changes, Il-1 $\beta$

**J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (162): 47-58 (Persian).**

\* **Corresponding Author: Majid Pornour** - Medical Laser Research Center, ACECR, Tehran, Iran (Email: pornour@acecr.ac.ir)

# تغییرات بیان گیرنده DRD2 دوپامین و سیتوکین IL-1 $\beta$ دخیل در روند بهبود زخم های دیابتی در مبتلایان دیابت نوع ۲

ندا ابراهیم زاده<sup>۱</sup>هاجر واثقی<sup>۲</sup>گرشاسب ریگی<sup>۳</sup>غلامرضا اسماعیلی جاوید<sup>۲</sup>شهلا محمد گنجی<sup>۴</sup>امیررضا فرهود<sup>۵</sup>مجید پرنور<sup>۲</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** زخم پای دیابتی یکی از معضلات بیماری دیابت نوع ۲ می باشد. عوامل مختلفی از جمله تغییرات میزان سیتوکین هایی مثل اینترلوکین- $\beta$  ۱ (IL-1 $\beta$ ) می تواند در روند بهبود زخم پای دیابتی اختلال ایجاد کند. فاکتورهای مختلفی در تغییرات میزان IL-1 $\beta$  می تواند مؤثر باشد که از جمله آن ها می توان به تغییرات میزان نوروترانسمیترها (خصوصاً دوپامین) و گیرنده های آن ها اشاره نمود. هدف از انجام این مطالعه بررسی تغییرات IL-1 $\beta$  و گیرنده دوپامین DRD2 در سلول های تک هسته ای خون محیطی (PBMC) در زخم دیابت بوده است.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه مقطعی و مقایسه ای در سال ۱۳۹۶، نمونه خون محیطی از ۳۱ بیمار دیابتی دارای زخم پا و ۲۹ بیمار دیابتی بدون زخم و ۲۵ نفر غیر مبتلا به دیابت به عنوان گروه کنترل جمع آوری شد. پس از جدا سازی سلول های PBMCs از آن ها RNA کلی استخراج و cDNA سنتز و در نهایت میزان تغییرات بیان ژن های IL-1 $\beta$  و گیرنده DRD2 با تکنیک real time PCR اندازه گیری شد. هم چنین غلظت سرمی IL-1 $\beta$  در سرم این بیماران مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته ها:** کاهش معنی داری در بیان ژن IL-1 $\beta$ ، هم چنین کاهش غلظت سرمی این سیتوکین در افراد دیابتی با زخم پا دیده شد. هم چنین کاهش معنی دار بیان ژن گیرنده DRD2 در بیماران با و بدون زخم پا مشاهده شد.

**استنتاج:** به نظر می رسد کاهش بیان IL-1 $\beta$  در ارتباط با تغییرات بیان ژن گیرنده DRD2 می باشد. بنابراین بعد از انجام مطالعات تکمیلی شاید بتوان چنین اظهار داشت که کاهش بیان DRD2 را به عنوان یک عامل پیش آگهی معرفی کرده و به عنوان عاملی مؤثر در گسترش زخم پای دیابتی دانست.

**واژه های کلیدی:** دیابت، زخم پا، گیرنده های دوپامین، تغییرات بیان ژن، IL-1 $\beta$

## مقدمه

در مسیر پیام رسانی انسولین و تخریب انتخابی سلول های  $\beta$  با واسطه سیتوکین ها می شود (۱) زخم پای دیابتی

دیابت نوع ۲ (Type 2 Diabetes (T2D) به عنوان یک بیماری با واسطه سیستم ایمنی است که منجر به اختلال

E-mail: pornour@acecr.ac.ir

**مؤلف مسئول:** مجید پرنور - تهران: جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

۲. استادیار، گروه پژوهشی ترمیم نوری مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۴. استادیار، پژوهشگاه ملی و مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، تهران، ایران

۵. استادیار، گروه ارتوپدی، مجتمع بیمارستانی امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۲۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۷/۳۰ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۹/۲۰

(Diabetic Foot Ulcer (DFU)) یکی از آسیب‌ها و پاتولوژی که نتیجه مستقیم دیابت و یا عوارض مزمن دیابت می‌باشد و از معضلات مهم بهداشتی با عوارض و مرگ و میر ناشی از این بیماری است. گرچه نوروپاتی، بیماری عروق و تروما عامل اصلی توسعه DFU است، اما ضعف بهبود زخم عامل اصلی ایجاد زخم‌های مزمن و قطع انتهایی عضو می‌باشد (۲). تقریباً تمام سلول‌های هسته‌دار، به ویژه سلول‌های اندو/ اپیتلیال و ماکروفاژها توانایی تولید سیتوکین‌های اینترلوکین-۱ (IL-1)، اینترلوکین-۶ (IL-6) و فاکتور نکروزه‌کننده تومور-آلفا (TNF- $\alpha$ ) را دارند. خانواده IL-1 یک گروه از سیتوکین‌ها است که نقش اصلی را در تنظیم پاسخ‌های ایمنی و التهابی بازی می‌کند (۳). IL-1 $\beta$  یکی از سیتوکین‌های پیش التهابی اصلی است که به‌طور گسترده فرآیندهای التهابی را تحت تاثیر قرار می‌دهد و کنترل دقیق تولید آن در سطوح رونویسی و پس از ترجمه مورد نیاز است (۴). غلظت‌های بالای گلوکز، تولید IL-1 $\beta$  را در سلول‌های پانکراس انسانی القا می‌کند و منجر به اختلال در ترشح انسولین، کاهش تکثیر سلولی و مرگ و میر سلول‌های بتا از طریق آپوپتوز می‌شود (۵). سلول‌های بتای تولیدکننده IL-1 $\beta$  در ترشحات پانکراس به دست آمده از بیماران T2D مشاهده شده‌اند (۶). شواهد نشان می‌دهد که نه تنها عملکرد سلول‌های بتا، بلکه کاهش پیش‌رونده در توده این سلول‌ها به تظاهر T2D منجر می‌شود، که ممکن است به دلیل افزایش آپوپتوز سلول‌های بتا باشد (۷). در نتیجه با فراخوانی سلول‌های ایمنی، التهاب بافت آغاز شده و باعث آزادسازی سیتوکین‌ها و کموکاین‌ها از بافت چربی به گردش خون و در نتیجه افزایش التهاب در بافت‌های دیگر می‌شود (۸). از طرفی دوپامین یکی از بزرگ‌ترین انتقال‌دهنده‌های عصبی مغز است و انواع مختلفی از رفتارهای فیزیولوژیک مانند شناخت، رفتار تغذیه‌ای، کنترل حرکت و ترشح هورمون‌های غدد درون‌ریز مختلف را کنترل می‌کند (۹). مطالعات مختلف نمایان‌گر

تاثیرات متفاوت دوپامین روی انواع سلول‌ها و بافت‌ها می‌باشد که به واسطه وجود گیرنده‌های مختلف آن در سلول‌ها اتفاق می‌افتد (۱۰). بروز تغییرات در پروفایل بیانی این گیرنده‌ها باعث بروز انواع اختلالات فیزیولوژیک و بیماری‌های مختلف می‌شود (۱۱، ۱۲). سیستم دوپامینرژیک نیز در تنظیم مرکزی و محیطی سوخت‌های کل بدن و هوموستاز انرژی دخیل است. تغییرات این مسیر تنظیم مرکزی در مدل‌های مقاوم به انسولین جوندگان (۱۳) و بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ گزارش شده است (۱۲). مسیر پیام‌رسانی دوپامین به وسیله دو نوع مختلف گیرنده G- پروتئینی مرتبط با خانواده‌های D1 و D2 (D1 و D2) و D3، D4) می‌باشد (۱۴).

جالب توجه است که تمام این گیرنده‌ها در سلول‌های بتای پانکراس بیان می‌شوند، و این نشان می‌دهد که برخی از این ترشح انسولین تحریک شده توسط گلوکز می‌تواند، در تنظیم ترشح انسولین دخیل باشد (۱۵). بر این اساس، دوپامین و هم‌چنین گیرنده‌های مختلف گیرنده دوپامین D2 (DRD2) مانند کینیپرول و بروموکریپتین، مانع ترشح انسولین در هر دو سلول بتا و سلول‌های جدا شده از جوندگان می‌شود (۱۶). علاوه بر این، یک فرم انتشار زمان بروموکریپتین اخیراً برای درمان دیابت نوع ۲ تایید شده است (۱۷)، که نشان می‌دهد DRD2 احتمالاً در تنظیم فرآیندهای متابولیک کلیدی دخیل باشد، اگر چه مکانیسم دقیق عمل هنوز معلوم نیست. علاوه بر این، فقط ناک داون DRD2 توسط siRNA، و نه سایر زیر پروتئین‌های گیرنده دوپامین، بر ترشح انسولین تحریک شده توسط گلوکز در سلول‌های INS-IE بر انسداد انسولین تأثیر می‌گذارد (۱۸). هم‌چنین در سال‌های گذشته مطالعاتی مبنی بر تاثیر گیرنده‌های دوپامینی در سلول‌های مختلف ایمنی و بیان فاکتورها و سایتوکین‌های پیش التهابی انجام شده است. گیرنده‌های دوپامینی D2 باعث تغییر در میزان سیتوکین‌ها به خصوص سیتوکین‌های پیش التهابی و ضد التهابی در مونوسیت‌های مشتق شده از

ماکروفاژها در شرایط التهابی می شوند (۱۹)، در حالی که علی‌رغم اهمیت IL-1 $\beta$  و نقش آن به عنوان یک فاکتور پیش التهابی در ترمیم زخم (به خصوص در مراحل اولیه ترمیم) و نقش گیرنده‌های دوپامین به ویژه DRD2 در تحریک سیتوکین‌ها (به خصوص IL-1 $\beta$ )، به نظر می‌رسد که مطالعاتی در مورد ارزیابی میزان IL-1 $\beta$  در زخم‌های دیابتی، نقش آن در بهبود این زخم‌ها و ارتباط آن با بیان گیرنده DRD2 در سلول‌های تک هسته‌ای انجام نشده است. بنابراین هدف از انجام این مطالعه ارزیابی تغییرات IL-1 $\beta$  و گیرنده DRD2 دوپامین در سلول‌های PBMC در بیماران مبتلا به زخم‌های دیابتی در مقایسه با افراد دیابتی بدون زخم یا و افراد غیردیابتی بوده است.

## مواد و روش ها

مطالعه حاضر یک مطالعه مقطعی و مقایسه‌ای در سه گروه بیماران دیابتی بدون زخم مزمن پای دیابتی، بیماران دیابتی با زخم مزمن پای دیابتی و افراد سالم انجام شده است. نمونه‌گیری به صورت غیرتصادفی در دسترس از بین مراجعه‌کننده به درمانگاه تخصصی دیابت مرکز جامع ترمیم زخم جهاد دانشگاهی علوم پزشکی تهران بین سال‌های ۱۳۹۴ لغایت ۱۳۹۶ انجام شد. معیار ورود در خصوص بیماران مبتلا به دیابت، تشخیص قطعی دیابت بر اساس دستورالعمل کشوری (قندخون ناشتای بیش از 126 mg/dl) که تحت درمان با انسولین بودند. در گروه بیماران دیابتی مبتلا به زخم مزمن دیابتی، بیماران دیابتی تحت درمان انسولین که مبتلا به زخم مزمن پای دیابتی (بیش از ۶ هفته) با درجه و گتر ۲ (بدون شواهدی مبنی بر استئومیلیت) که از نظر سنی و سابقه دیابتی با گروه دیابتی همسان شده بودند، انتخاب شدند. افراد سالم نیز از بین همراهان مراجعه‌کننده که به لحاظ سنی و جنسی همسان بودند، انتخاب شدند. در صورت وجود عفونت فعال یا درگیری استخوان، شواهدی مبنی بر مصرف داروهای ضد افسردگی و یا

مواد اپیوئیدی طی شش ماه گذشته این بیماران از مطالعه کنار گذاشته شدند. از تمامی بیماران جهت نمونه خون و اطلاعات بالینی رضایت‌نامه کتبی براساس کمیته اخلاق در پژوهش علوم زیستی و پزشکی جهاد دانشگاهی (کد کمیته اخلاق ir.acecr.ibcrrc.rec.1394.38) اخذ گردید. با توجه به این که در خانواده D2 سه گیرنده دوپامینی مدنظر می‌باشد لذا برای محاسبه حجم نمونه از روش تخمین برآورد رگرسیونی براساس تعداد متغیرهای مستقل استفاده می‌شود و به ازای هر خانواده D2 ده بیمار در هر گروه مورد نیاز است. لذا با توجه به این که این خانواده شامل سه عضو می‌باشد لذا در هر گروه مقایسه ۳۰ بیمار مورد در نظر گرفته شد. در نهایت ۳۱ بیمار مبتلا به زخم پای دیابتی با میانگین سنی ۵۸ سال (بین ۵۰ تا ۷۵ سال)، ۲۹ بیمار دیابتی بدون زخم پا با میانگین سنی ۵۹ سال (بین ۴۸ تا ۷۶ سال) و ۲۵ نفر افراد غیردیابتی با میانگین سنی ۵۳ سال (بین ۴۷ تا ۷۰ سال) مورد مطالعه قرار گرفتند. تعدادی از نمونه‌ها در گروه بیماران دیابتی بدون زخم و افراد سالم به دلیل مشکلات تکنیکی و مشخص شدن سابقه مثبت مصرف داروهای ضدافسردگی از مطالعه کنار گذاشته شدند.

### جداسازی سلول

جداسازی سلول‌های PBMC با استفاده از روش شیب غلظت فایکول انجام شد (۱۱) نمونه‌های خون محیطی (۵ میلی‌لیتر) از ورید به دست آمد و در لوله‌های آماده‌سازی سلولی حاوی ماده ضد انعقاد (هپارین) جمع‌آوری شد. ابتدا نمونه‌های خون به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰ سانتریفوژ شدند و سرم نمونه‌ها برای ارزیابی IL-1 $\beta$  نگهداری شد. سپس نمونه‌های خون با حجم مساوی محلول نمکی فسفات بافر (PBS) رقیق شدند. سلول‌های محیطی تک هسته خون (PBMCs) از ۵ میلی‌لیتر هر نمونه خون توسط شیب غلظت فایکول، (Pharmacia, Uppsala, Sweden) جدا شدند. تراکم سلول و اسمولیت به ترتیب  $0.01 \pm 0.01$  گرم در

حاوی ۲-۲/۵ میلی مولار  $MgCl_2$ ، ۰/۵ میلی مولار از هر نوع dNTPs، ۰/۸-۱ پیکومول پرایمر، ۲/۵ میکرولیتر DNA پلیمراز Taq (سیناژن، ایران) و ۱ میکرولیتر از cDNA به عنوان یک الگو در هر واکنش RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت. به منظور تکثیر ژن‌های DRD2، IL-1 $\beta$  و  $\beta$ -actin، PCR در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه آغاز شد و در طول ۳۵ سیکل در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۰ درجه سانتی گراد (برای DRD2) و ۶۲ درجه سانتی گراد (برای IL-1 $\beta$  و  $\beta$ -actin) به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و سپس یک مرحله طولی سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه ادامه یافت. در نهایت محصولات PCR با استفاده از آگارز ۲ درصد در ژل الکتروفورز مشاهده شد. علاوه بر این، تکثیر کنترل مثبت به منظور بررسی عملکرد پرایمرها استفاده شد. از کیت فلوروژنیک نوکلئوتید سایبرگرین (Roche، آلمان) برای نظارت بر تکثیر cDNA برای انجام Real time PCR استفاده شد. این کار با اندازه‌گیری شدت فلورسانس و با استفاده از جفت پرایمرها برای DRD2، IL-1 $\beta$  و  $\beta$ -actin به عنوان کنترل داخلی با تکنیک Real Time-PCR انجام شد (Corbett, Germany). Real time PCR برای هر نمونه در ۱۰ میکرولیتر محلول، شامل محلول ۲ میلی لیتر Fast Start Master و ۰/۳ میکرومولار از هر پرایمر انجام شد. در مجموع ۹ میکرولیتر از این مخلوط واکنش در ویال با حجم ۰/۱ میلی لیتر قرار داده شد و ۱ میکرولیتر از cDNA به عنوان الگو اضافه شد. چرخه حرارتی شامل یک مرحله اولیه و اسرشت سازی در ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱۰ دقیقه و سپس یک برنامه تکثیر (اتصال پرایمر اولیه، تکثیر و اندازه‌گیری) برای ۴۵ سیکل تکرار شد. برنامه طولی سازی به مدت ۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد (DRD2) و ۶۲ درجه سانتی گراد (IL-1 $\beta$  و  $\beta$ -actin) و ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۱۰ ثانیه با اندازه‌گیری فلورسانس در پایان هر مرحله از فاز

میلی لیتر (۲۰ درجه سانتی گراد) و  $15 \pm 290$  گرم بود. برای جداسازی سلول، سانتریفیوژ در مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. لایه ابری تشکیل شده (لایه‌ای که در آن لنفوسیت‌ها قرار دارند) جمع‌آوری شد و سانتریفیوژ با دور ۳۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در آخر پلت سلولی با محلول PBS شسته شد (۱۱).

#### RT-PCR

مجموع mRNA تام از سلول‌های PBMC با استفاده از کیت استخراج RNA (Roche، آلمان)، بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، جدا شد. برای یکسان‌سازی غلظت تمام نمونه‌های استخراج شده RNA و بررسی خلوص و غلظت RNA از دستگاه NanoDrop استفاده شد. یک  $\mu g$  از RNA در هر نمونه برای سنتز cDNA توسط کیت سنتز cDNA (Fermentase، آلمان) استفاده شد. پرایمرها با استفاده از نرم افزار oligo5 (www.oligo.net) برای DRD2، IL-1 $\beta$  و  $\beta$ -actin به عنوان ژن خانه‌دار، بر اساس توالی‌های ثبت شده در GenBank طراحی شدند. علاوه بر این، جستجوی پایگاه داده BLAST از پایگاه داده مرجع نوکلئوتیدی NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) برای نظارت بر اختصاصیت آن‌ها از لحاظ نظری استفاده شد (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای RT-PCR

Product length	Accession number	Primers sequences	Genes
161bp	NM_001101.3	5'-AGACGCAGGATGGCATGGG-3'	$\beta$ -actin- Forward
		5'-GAGACCTTCAACACCCACGCC-3'	$\beta$ -actin- Reverse
127bp	NM_016574.3	5'-TGTACAATACGCGCTACAGCTCCA-3'	drd2- Forward
		5'-ATGCACTCGTCTCGGTCTGCGTTA-3'	drd2- Reverse
115bp	NM_000576.2	5'-TGGCAGAAGTACCTGAGCTCG-3'	IL-1 $\beta$ - Forward
		5'-AGGTCCTGGAAGGAGCACTTC-3'	IL-1 $\beta$ - Reverse

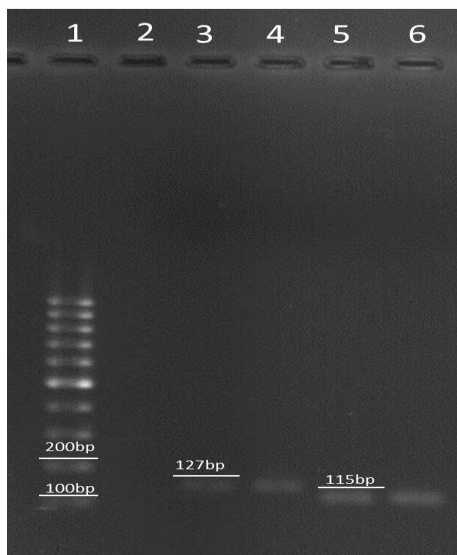
برای ارزیابی بیان ژن‌های DRD2 و IL-1 $\beta$  در سلول‌های PBMC، یک روش PCR معمولی برای تمام نمونه‌ها در حجم نهایی ۲۰ میلی لیتر با یک واحد DNA پلیمراز Taq (سیناژن، ایران) انجام شد. مخلوط واکنش

انجام شد. برای تعیین همبستگی بین تغییرات در نرخ سرم IL-1 $\beta$  و DRD2، هم چنین تعیین همبستگی بیان این ژن ها در PBMCs، نرم افزار SPSS 18 مورد استفاده قرار گرفت. در مطالعه حاضر، مقدار p کم تر از ۰/۰۵ (<math>p < 0/05</math>) به لحاظ آماری معنی دار می باشد.

## یافته ها

### RT-PCR

در این مطالعه، بیان ژن های DRD2 و IL-1 $\beta$  در سلول های PBMC افراد مبتلا به دیابت با و بدون زخم پا و افراد غیر مبتلا به دیابت به عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج RT-PCR نشان داد که گیرنده دوپامین و سیتوکین IL-1 $\beta$  در سلول های PBMC هر دو گروه دیابتی با زخم پا و بدون زخم و هم چنین کل افراد غیر مبتلا به دیابت بیان می شوند (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: نشان دهنده بیان ژن های DRD2 و IL-1 $\beta$  در سلول های PBMC افراد مبتلا است. چاهک ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی محصول شرکت فرمتاز، چاهک ۲: نمونه کنترل منفی PCR، چاهک ۳ و ۴: محصول ژن DRD2، چاهک ۵ و ۶: محصول ژن IL-1 $\beta$ .

### توالی یابی

نتایج به دست آمده از توالی یابی مؤید اختصاصیت قطعات تکثیر شده، مربوط به DRD2 و IL-1 $\beta$  است.

طویل سازی می باشد. گام سوم شامل یک برنامه منحنی ذوب اجرا شده توسط برنامه پیش فرض دستگاه Real time PCR بود. تجزیه و تحلیل منحنی ذوب، تنها یک پیک برای هر واکنش را نشان داد و این توسط الکتروفورز محصولات PCR تایید شد و فقط یک باند با اندازه مورد انتظار مشاهده شد.

### توالی یابی

برای تایید توالی های تکثیر شده، قطعات DRD2، IL-1 $\beta$  و  $\beta$ -actin با استفاده از سیستم تعیین توالی مویرگی ABI 3700 (Applied Bio System, USA) توالی یابی شدند.

### آزمایش ELIS

برای ارزیابی غلظت سرمی IL-1 $\beta$  برای هر نمونه، از کیت ارزیابی IL-1 $\beta$  (eBioscience, USA) استفاده شد. غلظت IL-1 $\beta$  با تکنیک ELISA با استفاده از دستگاه ELISA plate reader (ELX800TM, USA) بر اساس پروتکل شرکت مذکور مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از یک روش ایمونواسی آنزیمی رقابتی ساندویچ کمی که در آن شدت گسترش رنگ در طول موج ۴۵۰ نانومتر متناسب با غلظت IL-1 $\beta$  در سرم اندازه گیری شد.

### تجزیه و تحلیل آماری

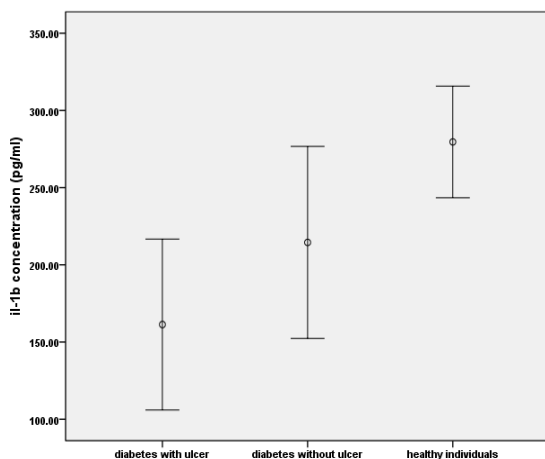
تعداد نمونه ها به وسیله نرم افزار Minitab 16.1 تعیین شد و بازده هر واکنش به وسیله نرم افزار Linreg مورد ارزیابی قرار گرفت. داده های Real time PCR با استفاده از روش  $\Delta\Delta Ct$  و نرم افزار Rest (۲۰۰۵ و ۲۰۰۹) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۲۰). تغییرات نسبی بیان سرمی IL-1 $\beta$  و DRD2، هم چنین بیان ژن های آن ها در سلول های PBMC با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) و در صورت معنی داری به روش Post Hoc Tukey مورد مقایسه

## آنالیز بیان ژن

استفاده برای تعیین روند کاهش ژن در هر سه گروه در مقایسه با یکدیگر را تایید کرد. هم چنین تمام قطعات توالی یابی شده در پایگاه داده BLAST در مقابل پایگاه داده نوکلئوتید مرجع NCBI مورد بررسی قرار گرفت و توالی قطعه تایید شد.

## تجزیه و تحلیل آزمون Elisa

داده های حاصل از تجزیه و تحلیل الیزا نشان داد که غلظت سرمی IL-1 $\beta$  در گروه بیماران دیابتی مبتلا به زخم نسبت به افراد غیر مبتلا در حال کاهش است ( $p < 0.05$ ). در افراد مبتلا به زخم پای دیابتی در مقایسه با افراد گروه غیر مبتلا به دیابت میزان غلظت سرمی IL-1 $\beta$ ، ۱/۶۳ برابر کاهش داشته است (تصویر شماره ۲).



**تصویر شماره ۲:** غلظت سرمی IL-1 $\beta$  در بیماران دیابتی با زخم پا، بدون زخم پا و هم چنین افراد گروه غیر مبتلا. روی محور X بیماران و گروه کنترل و روی محور Y میزان غلظت سرمی IL-1 $\beta$  نمایش داده شده است.

## تحلیل و تحلیل آماری

آزمون همبستگی بین بیان IL-1 $\beta$  و گیرنده DRD2، نشان دهنده ارتباط معنی دار بین کاهش بیان این دو ژن (با ضریب همبستگی ۰/۶۴۵ و  $p \leq 0.03$ ) است.

در این مطالعه، بیان ژن های DRD2 و IL-1 $\beta$  در سلول های PBMC بیماران دیابتی با و بدون زخم و نیز افراد غیر مبتلا به دیابت به عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفت. تمام ژن ها در PBMCs هر ۳ گروه بیان داشتند. تجزیه و تحلیل داده های مشتق شده از Real time PCR با نرم افزار rest نشان داد که تفاوت قابل توجهی در میزان بیان ژن بین گروه ها وجود دارد. در مورد بیان ژن DRD2 در سلول های PBMC از بیماران مبتلا به دیابت با و بدون زخم یا در مقایسه با افراد گروه غیر مبتلا به دیابت کاهش قابل ملاحظه ای (معنی دار) مشاهده شد. با این حال، تغییرات قابل توجهی در بیان ژن DRD2 بین دو گروه مبتلایان به دیابت با زخم پا و بدون زخم پا دیده نشد (جدول شماره ۲). علاوه بر این، در مورد تغییرات بیان ژن IL-1 $\beta$  در هر ۳ گروه کاهش بیان مشاهده شد. میزان این کاهش در سلول های PBMC افراد مبتلا به دیابت با زخم یا در مقایسه با افراد غیر مبتلا به دیابت معنی دار بود؛ در حالی که بین مبتلایان به دیابت بدون زخم پا و افراد غیر مبتلا به دیابت، هم چنین بین افراد دیابتی با زخم و بدون زخم یا تغییرات معنی دار نبود.

**جدول شماره ۲:** میزان تغییرات بیان ژن های DRD2 و IL-1 $\beta$  در بیماران مبتلا به زخم پای دیابتی و مبتلایان بدون زخم در مقایسه با افراد غیر مبتلا به دیابت. (آنالیز با rest ۲۰۰۵ و ۲۰۰۹).

تغییرات	سطح معنی داری	انحراف معیار	نرخ تغییرات (x چند برابر شدگی)	مقایسه بیان ژن های این گروه
بی معنی	۰/۱۳۶	$\pm 0.11435$	2.47ms	DRD2-u/n
کاهش	۰/۰۰۰۱	$\pm 0.01542$	10.16*	DRD2-u/i
کاهش	۰/۰۰۰۲	$\pm 0.01241$	۷/۶۹*	DRD2-n/i
بی معنی	۰/۰۷۷	$\pm 0.575574$	۱/۴۹۹	IL-1 $\beta$ -u/n
کاهش	۰/۰۳۷	$\pm 0.688842$	۲/۷۶**	IL-1 $\beta$ -u/i
بی معنی	۰/۲۱۶۳	$\pm 0.926858$	۱/۲۷	IL-1 $\beta$ -n/i

u: دیابت با زخم، n: دیابت بدون زخم، i: افراد غیر مبتلا به دیابت  
 \* significant at  $p\text{-value} \leq 0.001$   
 \*\* significant at  $p\text{-value} \leq 0.01$   
 ns no significant

آنالیز داده های مربوط به Real time PCR توسط  $\Delta\Delta Ct$ ، تجزیه و تحلیل های قبلی و  $\Delta Ct$  هر نمونه مورد

## بحث

با توجه به فرضیه، تغییرات قابل توجهی در غلظت سرمی IL-1 $\beta$  بین افراد مبتلا به دیابت با زخم پا و افراد غیر مبتلا به دیابت وجود دارد. هم چنین تغییرات قابل ملاحظه ای در گیرنده های دوپامین DRD2 در PBMCs مبتلا به دیابت با و بدون زخم پا دیده شد. مطالعات قبلی نقش گیرنده های دوپامین، به ویژه DRD2 را در تحریک سیتوکین های ضد التهابی توضیح داده اند. مطالعات متعددی نشان دادند که غلظت چندین پروتئین فاز حاد، سیتوکین ها و کموکین ها در بیماران T2D نسبت به افراد غیر مبتلا افزایش می یابد. به طور خاص، سیتوکین پروتئین التهابی IL-1 $\beta$  باعث مهار عملکرد سلول بتا و گسترش مرگ برنامه ریزی شده سلولی می شود. علاوه بر این، نقش IL-1 $\beta$  در T2D نیز به اثبات رسیده است (۲۲،۲۱).

Eizirik و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که تحت شرایط آزمایشگاهی، با قرار گرفتن سلول های ترشح کننده انسولین (جزایر پانکراس) در معرض IL-1 $\beta$  به تنهایی و یا در ترکیب با IFN- $\gamma$  و یا TNF- $\alpha$  منجر به اختلال در عملکرد سلول های بتا و القا مرگ برنامه ریزی شده آن ها می شود (۲۳). هم چنین دو مطالعه Palmi و همکاران و Recasens و همکاران به ترتیب در سال های ۲۰۰۲ و ۲۰۰۵ نشان دادند که روند بیماری زایی دیابت نوع ۲ شامل التهاب درجه پایین می باشد. این التهاب به علت فعال شدن سیستم ایمنی ذاتی توسط غلظت های بالایی از نشانگرهای التهابی مختلف در گردش خون مانند IL-6، IL-1 $\beta$ ، TNF- $\alpha$ ، گیرنده های TNF- $\alpha$  محلول، واکنش C پروتئین و سیستم کمپلمان که واکنش های التهابی را کنترل می کند، است (۲۴،۲۵).

در همین راستا دو تیم Lobmann و همکاران و Siqueira و همکاران در سال های ۲۰۰۵ و ۲۰۱۰ گزارشات مشابهی مبنی بر این که در زخم پای دیابتی، افزایش مرگ برنامه ریزی شده سلول های فیبروبلاست، کاهش پرولیفراسیون این سلول ها و گسترش واکنش های التهابی، که نشان دهنده تعداد زیادی از گرانولوسیت های

نوتروفیل در زخم است، ارائه دادند. نوتروفیل ها ترشح سیتوکین های پروتئین التهابی، به ویژه TNF- $\alpha$  و IL-1 $\beta$  را به عهده دارند. هر دو این سیتوکین ها سنتز متالوپروتیناز ماتریکس (MMP) را تحریک می کنند، باعث کاهش تجزیه پروتئین ماتریکس و فاکتور رشد می شوند به طوری که بهبود زخم متوقف و یا غیر هماهنگ می شود (۲۶،۲۷) Mirza و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه ای نشان دادند که مهار مسیر IL-1 $\beta$  با استفاده از یک آنتی بادی خنثی کننده و ماکروفاژها از موش های ناک اوت شده گیرنده IL-1، مانع تنظیم افزایش مقادیر ژن های پیش التهابی ایجاد شده توسط محیط کشت و باعث تنظیم کاهش بیان فاکتورهای پیش بهبودی می شود. مهم این است که مهار مسیر IL-1 $\beta$  در زخم موش های دیابتی با استفاده از یک آنتی بادی خنثی کننده باعث سوئیچ بین فاکتورهای پیش التهابی و فنوتیپ های ماکروفاژی مرتبط با بهبودی و هم چنین افزایش سطح فاکتور رشد زخم و بهبود زخم ها می شود. این یافته ها نشان می دهد که احتمالاً هدف قرار دادن مسیر IL-1 $\beta$  می تواند یک روش درمانی جدید برای بهبود زخم های دیابتی باشد (۲۸). در حالی که بیش تر مطالعات افزایش غلظت سرمی و بیان ژن IL-1 $\beta$  و اثرات جانبی آن بر بهبود زخم های دیابت را نشان دادند (۲۹)، نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده روند کاهش بیان IL-1 $\beta$  در مبتلایان به دیابت با بیش از ۵۰ سال سن داشته و سابقه بیماری آن ها به بیش از ۱۰ سال رسیده و دارای زخم پای دیابتی هستند، می باشد. بر اساس اطلاعات ما، مطالعات قابل توجهی سطح بالاتری از سیتوکین های پیش التهابی را چه در سرم و چه در مناطق موضعی در بیماران مبتلا به زخم پای دیابتی در مقایسه با افراد سالم نشان ندادند (۳۰) مطالعه قبلی این گروه نشان می دهد که تغییرات بیان گیرنده DRD2 در سلول های PBMC افراد مبتلا به زخم پای دیابتی در ارتباط با کاهش بیان سیتوکین التهابی TNF- $\alpha$  می باشد، که نتایج حاصل از مطالعه اخیر نیز بیان گر کاهش بیان ژن DRD2 و ارتباط مستقیم آن با



کاهش بیان دیگر فاکتور پیش التهابی یعنی IL-1 $\beta$  می‌باشد (۳۱).

در مقایسه با مطالعات نشان دهنده افزایش سطح IL-1 $\beta$  در دیابت، با آنالیز بیان ژن مربوط به این مطالعه، روند نزولی بیان ژن IL-1 $\beta$  در جمعیت سلول‌های تک هسته‌ای (منبع اصلی سیتوکین‌های پروتئین‌های التهابی) در مبتلایان به دیابت با زخم پا در مقایسه به افراد غیر مبتلا به دیابت مشاهده شد. جالب توجه است که سطح سرمی IL-1 $\beta$  در گروه مبتلایان به دیابت با زخم کم‌تر از افراد غیر مبتلا است.

این در حالیست که نتایج مطالعه‌ای که توسط Seth و همکاران در سال ۲۰۱۳ که روی یک مدل زخم تجربی در موش‌ها انجام شد، مشابه نتایج مطالعه حاضر است. گرچه مطالعه آن‌ها بر اساس بیماری‌های مزمن کلیوی (CKD) در منطقه قاعده گلو مرفولی کلیه، بافت شناسی و ایمونوفلورسانس، اندازه‌گیری عددی بافتی و واکنش زنجیره‌های پلیمرز بود، اما نتیجه آن به درک ما کمک کرد. از نظر تکثیر سلولی و رگ زایی، این فعالیت‌ها در مراحل اولیه بهبود زخم‌ها به طور قابل توجهی کاهش یافت. در همان زمان، حالت التهابی به مدت ۱۴ روز حفظ و افزایش یافت. به‌طور شگفت‌انگیز، این تحقیق نشان داد که بین IL-1 $\beta$ ، TNF- $\alpha$  و بهبود زخم هیچ ارتباط معنی‌داری بین موش‌های مدل و گروه کنترل وجود ندارد (۳۲). این ممکن است بیان‌گر این نکته باشد که IL-1 $\beta$  و TNF- $\alpha$  در پیشرفت دیابت مهم هستند و نه در زخم. ولی با توجه به نقش مؤثر بیان این فاکتورهای پیش التهابی در مراحل اولیه ترمیم زخم سطح پایین این سیتوکین‌ها در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ را می‌توان عاملی مؤثر در عدم آغاز فرآیند ترمیم زخم در این افراد دانست. هم‌چنین در سایر مراحل ترمیم زخم سطوح پایین بیان این فاکتورهای پیش التهابی به دلیل خاصیت مهاري آن‌ها روی سلول‌های دخیل در فرآیند ترمیم مانند فیبرو بلاست‌ها و کراتینوسیت‌ها می‌باشد (۳۵-۳۳). بنابراین، در توجیح این تناقض می‌توان

چنین اشاره نمود که پایین بودن سطح میزان عوامل التهابی مانند IL-1 $\beta$ ، دلیلی برای اختلالات ناشی از مراحل ترمیم زخم، خصوصاً در مراحل آغازین ترمیم (یعنی مرحله التهاب)، به خصوص اختلال در کموتاکسی و در نهایت بهبود زخم در دیابت باشد. از جمله عوامل دیگر که می‌توانند ترشح انواع مختلف سیتوکین‌ها را ایجاد کنند، گیرنده‌های دوپامین هستند (۳۶). تغییرات در پروفایل بیانی گیرنده‌های دوپامین می‌تواند در پاتوژنز بیماری‌های مختلف با ایجاد تغییرات در شرایط فیزیولوژیکی و ایمونولوژیک مؤثر باشد (۱۱). در سال ۲۰۱۳ طبق مطالعه Shao و همکاران، به نظر می‌رسد، مسیر پیام‌رسانی DRD2 می‌تواند رونویسی از سیتوکین‌های پروتئین التهابی، از جمله pro-IL-1 $\beta$  و TNF- $\alpha$  را تحت تاثیر قرار دهد (۳۷). نتایج مطالعه Yan و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان می‌دهد که سیگنال‌های DRD1 و DRD2 نقش مهمی در سرکوب التهاب دارند: مسیر پیام‌رسانی DRD2 باعث رونوشت سیتوکین‌های پیش التهابی می‌شود، در حالی که مسیر پیام‌رسانی DRD1 باعث مهار پردازش و ترشح IL-1 $\beta$  و IL-18 از طریق سرکوب التهاب می‌شود (۳۸). نتایج مطالعه حاضر در این زمینه بیان‌گر آن است که در کنار IL-1 $\beta$ ، DRD2 نیز در PBMCهای بیماران دیابتی بیان شده‌اند. اما نرخ بیان ژن DRD2 در بیماران مبتلا به دیابت با یا بدون زخم پا در مقایسه با افراد سالم روند نزولی معنی‌داری نشان داد. بنابراین، می‌توان توضیح داد که کاهش بیان IL-1 $\beta$  در افراد دارای زخم پای دیابتی با تغییر DRD2 همراه است. در نهایت ممکن است این گونه استنباط شود که این گیرنده‌ها در بهبود زخم‌ها به واسطه القای بیان سیتوکین‌های التهابی به ویژه IL-1 $\beta$  نقش دارند. در نتیجه، با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، اهمیت IL-1 $\beta$  در روند بهبود زخم با القای مهاجرت سلولی و پتانسیل DRD2 در تحریک این سیتوکین، پس از انجام برخی از مطالعات مکمل، ممکن است توضیح دهد که تغییرات DRD2 می‌تواند نشان‌گر پیش‌آگهی

## سپاسگزاری

این مطالعه در راستای اجرای بخشی از طرح پژوهشی جهاد دانشگاهی علوم پزشکی تهران با شماره ۲۳۳۷ و با حمایت مالی این مجموعه انجام شد که نویسندگان مراتب سپاسگزاری خود را اعلام می نمایند.

دهنده و مؤثر در توسعه دیابت و زخم های آن ها باشد. هم چنین می توان با مقایسه جامع تری از تغییرات بیان سیتوکین های دیگر به نتایج دقیق تری دست یافت. با این حال، تحقیقات پیش تر با استفاده از آگونیست ها و آنتاگونیست های گیرنده های دوپامین به عنوان عوامل جدید درمانی در بهبود زخم های دیابت پیشنهاد می شود.

## References

1. Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, et al. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52(3): 812-817.
2. Tecilazich F, Dinh T, Pradhan-Nabzdyk L, Leal E, Tellechea A, Kafanas A, et al. Role of endothelial progenitor cells and inflammatory cytokines in healing of diabetic foot ulcers. *PloS one* 2013; 8(12): e83314.
3. Banerjee M, Saxena M. Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: role in type 2 diabetes. *Clin Chim Acta* 2012; 413(15): 1163-1170.
4. Dinarello CA. The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N Engl J Med* 2000; 343(10): 732-734.
5. Rhodes CJ. Type 2 diabetes-a matter of  $\beta$ -cell life and death? *Science* 2005; 307(5708): 380-384.
6. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature reviews. Nat Rev Immunol* 2011; 11(2): 98-107.
7. LeRoith D.  $\beta$ -cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes: role of metabolic and genetic abnormalities. *Am J Med* 2002; 113(6): 3s-11s.
8. Guigas B, de Leeuw van Weenen JE, van Leeuwen N, Simonis-Bik AM, van Haeften TW, Nijpels G, et al. Sex-specific effects of naturally occurring variants in the dopamine receptor D2 locus on insulin secretion and Type 2 diabetes susceptibility. *Diabetic Med* 2014; 31(8): 1001-1008.
9. Berthoud HR, Morrison C. The brain, appetite, and obesity. *Annu Rev Psychol* 2008; 59: 55-92.
10. Pornour M, Ahangari G, Hejazi SH, Deezagi A. New perspective therapy of breast cancer based on selective dopamine receptor D2 agonist and antagonist effects on MCF-7 cell line. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2015; 10(2): 214-223.
11. Pornour M, Ahangari G, Hejazi SH, Ahmadvani HR, Akbari ME. Dopamine receptor gene (DRD1-DRD5) expression changes as stress factors associated with breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 15(23): 10339-10343.
12. Barnard ND, Noble EP, Ritchie T, Cohen J, Jenkins DJ, Turner-McGrievy G, et al., D2 dopamine receptor Taq1A polymorphism, body weight, and dietary intake in type 2 diabetes. *Nutrition*. 2009; 25(1): 58-65.
13. Anderzhanova E, Covasa M, Hajnal A. Altered basal and stimulated accumbens dopamine release in obese OLETF rats as a function of age and diabetic status. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293(2): R603-R611.
14. Beaulieu JM, Gainetdinov RR, The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 2011; 63(1): 182-217.

15. Rubí, B, Ljubicic S, Pournourmohammadi S, Carobbio S, Armanet M, Bartley C, et al. Dopamine D2-like receptors are expressed in pancreatic beta cells and mediate inhibition of insulin secretion. *J Biol Chem* 2005; 280(44): 36824-3632.
16. de Leeuw van Weenen JE, Parlevliet ET, Maechler P, Havekes LM, Romijn JA, Ouwens DM, et al. The dopamine receptor D2 agonist bromocriptine inhibits glucose-stimulated insulin secretion by direct activation of the  $\alpha$ 2-adrenergic. *Biochem Pharmacol* 2010; 79(1): 1827-1836.
17. DeFronzo RA. Bromocriptine: a sympatholytic, D2-dopamine agonist for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2011; 34(4): 789-794.
18. Wu W, Shang J, Feng Y, Thompson CM, Horwitz S, Thompson JR, et al., Identification of glucose-dependent insulin secretion targets in pancreatic  $\beta$  cells by combining defined-mechanism compound library screening and siRNA gene silencing. *J Biomol Screen* 2008; 13(2): 128-134.
19. García-Tornadú I, Ornstein AM, Chamson-Reig A, Wheeler MB, Hill DJ, et al. Disruption of the dopamine d2 receptor impairs insulin secretion and causes glucose intolerance. *Endocrinology* 2010; 151(4): 1441-1450.
20. Mehdi A, Arabi N, Pornour M, Vaseghi H, Ganji SM, Alivand MR, et al. The diversity in the expression profile of caveolin II transcripts, considering its new transcript in breast cancer. *J Cell Biochem* 2018; 119(2): 2168-2178.
21. Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, et al. Glucose-induced  $\beta$  cell production of IL-1 $\beta$  contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest* 2002; 110(6): 851-860.
22. Fève B, Bastard JP. The role of interleukins in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 2009; 5(6): 305-311.
23. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death—the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* 2001; 44(12): 2115-2133.
24. Palmi M, Meini A. Role of the nitric oxide/cyclic GMP/Ca<sup>2+</sup> signaling pathway in the pyrogenic effect of interleukin-1 $\beta$ . *Mol Neurobiol* 2002; 25(2): 133-147.
25. Recasens M, López-Bermejo A, Ricart W, Vendrell J, Casamitjana R, Fernández-Real JM. An inflammation score is better associated with basal than stimulated surrogate indexes of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(1): 112-116.
26. Lobmann R, Schultz G, Lehnert H. Proteases and the diabetic foot syndrome: mechanisms and therapeutic implications. *Diabetes Care* 2005; 28(2): 461-471.
27. Siqueira MF, Li J, Chehab L, Desta T, Chino T, Krothpali N, et al. Impaired wound healing in mouse models of diabetes is mediated by TNF- $\alpha$  dysregulation and associated with enhanced activation of forkhead box O1 (FOXO1). *Diabetologia* 2010; 53(2): 378-388.
28. Mirza RE, Fang MM, Ennis WJ, Koh TJ. Blocking interleukin-1 $\beta$  induces a healing-associated wound macrophage phenotype and improves healing in type 2 diabetes. *Diabetes* 2013; 62(7): 2579-2587.
29. Oncul O, Yildiz S, Gurer US, Yeniiz E, Qyrdedi T, Top C, Gocer P, et al. Effect of the function of polymorphonuclear leukocytes and interleukin-1 beta on wound healing in patients with diabetic foot infections. *J Infect* 2007; 54(3): 250-256.
30. Schram MT, Chaturvedi N, Schalkwijk C, Giorgino F, Ebeling P, Fuller JH, et al.

- Vascular risk factors and markers of endothelial function as determinants of inflammatory markers in type 1 diabetes : the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetes Care* 2003; 26(7): 2165-2173.
31. Vaseghi H, Pornour M, Djavid GE, Rigi G, Ganji SM, Novin L. Association of the gene expression variation of tumor necrosis factor- $\alpha$  and expressions changes of dopamine receptor genes in progression of diabetic sever foot ulcer. *Iran J Basic Med Sci* 2017; 20(11): 1213-1219.
32. Seth AK, De la Garza M, Fang RC, Hong SJ, Galiano RD. Excisional wound healing is delayed in a murine model of chronic kidney disease. *PloS one* 2013; 8(3): e59979.
33. Reinke J, Sorg H. Wound repair and regeneration. *European Surgical Research* 2012; 49(1): 35-43.
34. Rückert R, Lindner G, Bulfone-Paus S, Paus R. High-dose proinflammatory cytokines induce apoptosis of hair bulb keratinocytes in vivo. *British Journal of Dermatology* 2000; 143(5): 1036-1039.
35. Petrache I, Otterbein LE, Alam J, Wiegand GW, Choi AM. Heme oxygenase-1 inhibits TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278(2): L312-L319.
36. Besser MJ, Ganor Y, Levite M. Dopamine by itself activates either D2, D3 or D1/D5 dopaminergic receptors in normal human T-cells and triggers the selective secretion of either IL-10, TNF $\alpha$  or both. *J Neuroimmunol* 2005; 169(1): 161-171.
37. Shao W, Zhang SZ, Tang M, Zhang XH, Zhou Z, Yin YQ, et al. Suppression of neuroinflammation by astrocytic dopamine D2 receptors via [alpha] B-crystallin. *Nature* 2013; 494(7435): 90-94.
38. Yan Y, Jiang W, Liu L, Wang X, Ding C, Tian Z ,et al. Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome. *Cell* 2015; 160(1-2): 62-73.