واحد علوم پزشکی تهران
معاونت پژوهش و فناوری

جمهوری اسلامی ایران

گزارش نهایی طرح:

مقایسه بیان گیرنده های دوپامین D2 و D3 و TNF-α در سلولهای خون محیطی در مبتلایان به زخم مزمن پای دیابتی و افراد دیابتی بدون زخم پا در مقایسه با افراد سالم

کد

۲۳۳۷

مسئول طرح

دکتر مجید پرنور

محل اجرا:
جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران
گروه پژوهشی ترمیم نوری

بهمن ۱۳۹۵

Archive of SID

www.SID.ir

واحد علوم پزشکی تهران
معاونت پژوهش و فناوری

گزارش نهایی طرح:

مقایسه بیان گیرنده های دوپامین D2 و D3 و TNF-α در سلولهای خون محیطی در مبتلایان به زخم مزمن پای دیابتی و افراد دیابتی بدون زخم پا در مقایسه با افراد سالم

کد

۲۳۳۷

مسئول طرح

دکتر مجید پرنور

همکاران طرح:

دکتر شهلا محمد گنجی

دکتر غلامرضا اسماعیلی جاوید

دکتر حسین بختو

هاجرواثقی

مریم جهانشیری مقدم

محل اجرا:

جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران

گروه پژوهشی ترمیم نوری

بهمن ۱۳۹۵

Archive of SID

www.SID.ir

مشخصات مسئول و همکاران طرح

ردیف	نام و نام خانوادگی	مسئولیت در طرح	تخصص	رتبه علمی	جمع کل نفر ساعت همکاری در طرح
	مجید پرنور	مجری اول	بیوتکنولوژی پزشکی	استادیار	۶۲۴
	شهلا محمد گنجی	همکار اصلی طرح و مشاور	ژنتیک مولکولی	استادیار	۹۰
	حسین بختو	مشاور	ژنتیک مولکولی	مربی پژوهش	۲۰
	غلامرضا اسماعیلی جاوید	متدولوژی و بخش بالینی و نمونه گیری	بیوفیزیک	استادیار	۳۰
	هاجر واثقی	بخش مولکولی طرح	ژنتیک	-	۶۲۴
	مریم جهانشیری	تهیه لوازم آزمایشگاهی و در بخش جداسازی سلول-های PBMCs	شیمی	-	۲۰

Archive of SID

www.SID.ir

واحد علوم پزشکی تهران
معاونت پژوهش و فناوری

جمهوری اسلامی ایران

گزارش نهایی طرح:

مقایسه بیان گیرنده های دوپامین D2 و D3 و TNF-α در سلولهای خون محیطی در مبتلایان به زخم مزمن پای دیابتی و افراد دیابتی بدون زخم پا در مقایسه با افراد سالم

کد

۲۳۳۷

مسئول طرح

دکتر مجید پرنور

همکاران طرح:

دکتر شهلا محمد گنجی

دکتر غلامرضا اسماعیلی جاوید

دکتر حسین بختو

هاجرواثقی

مریم جهانشیری مقدم

محل اجرا:

جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران

گروه پژوهشی ترمیم نوری

۱۳۹۵

Archive of SID

www.SID.ir

چکیده

زمینه و هدف: مدارک زیادی در چند دهه ی گذشته ثابت می‌کند که سیستم‌های عصبی و ایمنی با یکدیگر ارتباط دوطرفه و تنگاتنگ دارند. میزان ارتباط این دو سیستم به حدی است که بعضاً آن دو را سوپرسیستم بدن نامیده‌اند. درگفتمان و تأثیرات متقابل سیستم عصبی و سیستم ایمنی در انسان انواع مولکول‌های انتقال دهنده پیام دخالت دارند که شامل سیتوکاین‌ها و نوروترانسمیترها می‌باشند. نوروترانسمیترها به عنوان مواد انتقال دهنده پیام هستند و در گذشته منحصراً به عنوان واسطه بین سلول‌های درون سیستم عصبی شناخته شده بودند. ولی امروزه معتقدند آن‌ها علاوه بر سیستم عصبی در تنظیم سیستم ایمنی نیز دخالت دارند. مکانیسم این تنظیم کلاسیک به طور کامل شناخته شده نیست. مطالعات روانشناسی، نوروبیولوژی و ایمونولوژی، مدارک محکمی ارائه می‌کنند که سیستم ایمنی و به خصوص وقوع التهاب که نقش موثری در ترمیم انواع زخم ها در بیماری‌های مختلف دارد به طور خود به خودی تنظیم نمی‌شود بلکه به وسیله فاکتورهای خارجی هدایت شده در سیستم عصبی تحت عنوان نوروترانسمیترها یا انتقال دهنده عصبی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. تنظیم فاکتورهای پیش التهابی نظیر TNF-α که قابلیت ترشح شدن توسط سلول‌های سیستم ایمنی را ندارد می‌توانند از طریق القای گیرنده‌های این نوروترنسمیترها (به خصوص گیرنده های دوپامینی DRD2 و DRD3) در این سلول‌ها اتفاق بیافتند. این مطالعه در راستای بررسی تغییرات بیان ژن‌های گیرنده‌های دوپامینی در افراد دیابتی، مطالعه نقش احتمالی آن‌ها در بروز زخم‌های افراد دیابتی می‌باشد.

نخست پس از اخذ رضایت نامه کتبی خون‌گیری از ۳۱ فرد دارای زخم پای دیابتی و ۳۰ نفر بیمار دیابتی بدون زخم پا و ۳۰ نفر فرد غیر مبتلا به‌عنوان گروه کنترل انجام شد. سپس سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی این افراد جداسازی شد. جهت بررسی تغییرات بیان ژن‌های DRD2، DRD3 وTNF-α ، RNA این نمونه‌ها استخراج و cDNA شان سنتز شد. بیان و تغییرات بیان این ژن‌ها توسط تکنیک‌های PCR و real time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت و نهایتا محصولات PCR جهت تعیین اختصاصیت، تعیین توالی شدند. همچنین میزان غلظت سرمی TNF-α توسط تکنیک الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت.

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان داد که هم در میزان غلظت سرمی و هم در میزان بیان TNF-α به صورت معنی داری در هر دو گروه افراد دیابتی در مقایسه با افراد سالم، کاهش وجود دارد. همچنین یک روند کاهشی معنی دار در میزان بیان هر دو گیرنده دوپامینی مورد مطالعه در این افراد مشاهده شد که این کاهش با کاهش میزان بیان TNF-α در ارتباط می‌باشد. همچنین چنین ارتباطی بین دو رونوشت جدید به دست آمده از نتایج تعیین توالی با کاهش میزان TNF-α مشاهده شد.

در نتیجه چنین به نظر می‌رسد که تغییرات بیان گیرنده‌های DRD2 و DRD3 و وجود رونوشت‌های جدید گیرنده DRD3 می‌تواند در کاهش میزان TNF-α به عنوان یک فاکتور پیش التهابی، نقش موثری داشته باشد. بنابراین، بعد از انجام مطالعات تکمیلی شاید بتوان از تغییرات مشاهده شده در بیان و ساختار رونوشت‌های این گیرنده‌ها به عنوان فاکتورهای پیش آگهی و موثر در ارتباط با گسترش زخم پای دیابتی نام برد.

کلمات کلیدی: زخم پای دیابتی، گیرنده‌های دوپامین، بیان ژن، فاکتور نکروز دهنده توموری

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست مطالب

فصل اول ضرورت

پژوهش..... ۳

فصل دوم پیشینه

پژوهش..... ٤

فصل سوم اهداف

پژوهش..... ۱۳

فصل چهارم روش

پژوهش..... ۱٦

فصل پنجم یافته‌های

پژوهش..... ۲۷

فصل ششم بحث ونتیجه-

گیری..... ۳۸

فصل هفتم فهرست

منابع..... ٤۳

Archive of SID

www.SID.ir

فصل اول

ضرورت پژوهش

Archive of SID

www.SID.ir

پای دیابتی به هر گونه آسیب و پاتولوژی که نتیجه مستقیم دیابت و یا عوارض دراز مدت (مزمن) دیابت در پای بیمار است، گفته می‌شود. حضور آسیب‌های دیابتی مختلف در پا، سندرم پای دیابتی نامیده می شود. اتیولوژی زخم‌های دیابتی شامل موارد بسیاری است. جدی‌ترین عوارض دیابت بر پاها شامل موارد زیر است:

- زخم‌های دیابتی در پا
- عفونت‌های دیابتی در پا
- استئوآرتروپاتی پاها [۱-۳]
- عوامل خطر

عوامل خطر موجود در ایجاد این عارضه که جزو فاکتورهای پاتوژن(بیماری‌زا) هستند شامل مواردی چون جنس مذکر، فقدان حساسیت محافظتی به سبب نوروپاتی، نارسایی شریانی، تغییر شکل پا و تشکیل کالوس در نتیجه فشارهای مرکزی، نوروپاتی و زخم‌های دیابتی اتونومیک که منجر به کاهش عرق و خشک شدن پوست می‌شود، محدود شدن حرکت مفاصل، چاقی، کنترل نکردن گلوکز، پوشش نامناسب پا که منجر به ترک خوردگی پوست می‌شود، سابقه ابتلا به دیابت بیش از ۱۰ سال، نوروپاتی حسی (این نوروپاتی مانع از انجام مکانیسم‌های دفاع طبیعی بدن می‌شود و بیمار را در معرض آسیب‌های عمده یا آسیب‌های کوچک و یا مکرر قرار می‌دهند در حالی که بیمار غالباً این آسیب‌ها را حس نمی‌کند)، ادم و سابقه مصرف سیگار می‌شود[۲, ۳].

ترمیم زخم ترکیبی از چند فرآیند است که شامل هموستاز ، وقوع التهاب، تکثیر سلولها، رگ‌زایی و تولید مواد تشکیل دهنده ماتریکس بین سلولی و بازسازی می‌باشد. انواع مختلف از سلول‌ها در هر فاز در ترمیم زخم دخالت دارند که از جمله آن‌ها می توان به سلول‌های سیستم ایمنی، اندوتلیال، کراتینوسیت‌ها و فیبروبلاست‌ها اشاره کرد. تاخیر در ترمیم زخم پای دیابتی به دلایل متعددی اتفاق می‌افتد. از جمله آن‌ها می‌توان به نقصان و کاهش در میزان مهاجرت ، تکثیر، تمایز کراتینوسیت‌ها و فیبروبلاست‌ها و القای آپوپتوزیس در سلولهای فیبروبلاست اشاره کرد. بسیاری از این نقایص سلولی در ارتباط با عدم وقوع التهاب و تولید فاکتورهای پیش التهابی می‌باشد و این نظریه را مطرح می‌نماید که عدم بهبود زخم

Archive of SID
www.SID.ir

در هنگام بروز زخم‌های پای افراد دیابتی به دلیل عدم شکل گیری فرایند التهاب در افراد مبتلا اتفاق می‌افتد[۴]، چندین مطالعه در سال‌های قبل موید حضور فاکتورهای التهابی ایمنولوژیک در سطح مولکولی می‌باشد که از جمله این سایتوکاین ها می‌توان به افزایش میزان TNF-α اشاره کرد، که یکی از فاکتورهای التهابی می‌باشد و افزایش آن باعث القا آپوپتوزیس در سلول‌های فیبروبلاست که نقش پایه ای را در ترمیم زخم بازی می‌کنند و در اصل فرایند ترمیم با تکثیر این سلول‌ها آغاز می‌شود، اتفاق می‌افتد. بنابراین علی رغم نقش محوری این سایتوکاین به نظر می‌رسد که به جای کموتاکسی سلول-های دخیل در پدیده التهاب با اتصال به گیرنده‌های آپوپتوزی خود بر روی سلول‌های فیبروبلاست بیشتر سبب مهار پدیده ترمیم و التهاب می‌شوند که احتمالا این تغییرات در اثر تغییرات الگوی بیان گیرنده‌های دوپامین اتفاق می‌افتد[۵-۷].

در این زمینه Siqueira و همکارانش در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که در موش‌های مدل دیابت، سطح افزایش یافته‌ای از TNF-α دیده شد و این مطالعات نشان می‌دهد که اختلال در نظم TNF-α بهبود زخم دیابتی را ایجاد کرده و این اختلال در اثر افزایش میزان آپوپتوز در سلول‌های فیبروبلاست و کاهش تکثیر آن‌ها رخ می‌دهد[۸]. همچنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۳ توسط Miyazaki و همکارانش انجام شد، نشان دادند که افزایش غلظت TNF-α موجود درگردش خون با مقاومت به انسولین محیطی مرتبط در دیابت نوع دوم، ارتباط دارد[۷]. همچنین مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۶ توسط Goren و همکاران انجام شد، تاثیر عوامل التهابی در بروز دیابت تیپ ۲ نشان داده شد و اثر بهبود زخم پس از تجویز آنتی بادی منوکلونال در ترمیم بافت پوست موش‌های دیابتی مشاهده شد[۶].

همچنین باید به این نکته اشاره شود که ترشح سایتوکاین‌های التهابی به خصوص TNF-α به وسیله عوامل مختلفی تحریک می شود که ازجمله این عوامل می‌توان به برخی نوروترنسمیترها به ویژه دوپامین اشاره نمود[۸]. مدارک زیادی در چند دهه‌ی گذشته ثابت می‌کند که سیستم‌های عصبی و ایمنی با یکدیگر ارتباط دوطرفه و تنگاتنگ دارند. میزان ارتباط این دو سیستم به حدی است که بعضاً آن دو را سوپرسیستم بدن نامیده‌اند. درگفتمان و تأثیرات متقابل سیستم عصبی و سیستم ایمنی در انسان انواع مولکول‌های انتقال دهنده پیام دخالت دارند که شامل سایتوکاین ها و نوروترانسمیترها می‌باشند. نوروترانسمیترها به عنوان مواد انتقال دهنده پیام هستند و در گذشته منحصراً به عنوان واسطه بین سلول‌های درون سیستم عصبی شناخته شده بودند. ولی امروزه معتقدند آن‌ها علاوه بر سیستم عصبی در تنظیم سیستم ایمنی نیز دخالت دارند. مکانیسم این تنظیم

Archive of SID

www.SID.ir

کلاسیک به طور کامل شناخته شده نیست[۹]. سیستم‌های عصبی و ایمنی با یکدیگر ارتباط دوطرفه و تنگاتنگ دارند. میزان ارتباط این دو سیستم به حدی است که بعضاً آن دو را سوپر سیستم بدن نام نهاده‌اند. تاثیرات این دو سیستم بر یکدیگر و تاثیر عوامل ژنتیکی و محیطی بر سیستم ایمنی موجب بروز بیماری‌های متعدد اتوایمیون وسرطان‌های متفاوتی می‌شود. سیستم‌های دوپامینرژیک و سروتونرژیک دو سیستم نوروترانسمیتری مهم در دستگاه عصبی انسان هستند. طبق مطالعات اخیر نوروترانسمیترها از جمله دوپامین و سروتونین به عنوان واسطه‌های سیستم‌های عصبی و ایمنی عمل می‌کنند. گیرنده-های آن‌ها بر روی لنفوسیت‌ها وجود دارند و می‌توانند در زمینه ایجاد تغییرات پاتولوژیک نقش آفرینی کنند[۹]. لذا بررسی و مقایسه میزان و الگوی بیان ژن‌های این گیرنده‌ها بر روی لکوسیت های خون محیطی انسان حائز اهمیت بوده میتواند به درک بیشتری از پاتوژنز بیماری‌های مختلف بیانجامد.

سیستم دوپامینرژیک شامل گیرنده‌های دوپامینی است که از نوع گیرنده‌های G–coupled protein متاتروپیک هستند که در سیستم اعصاب مرکزی بیان می‌گردند و بطور طبیعی با لیگاند دوپامین تحریک می‌شوند. این گیرنده‌ها میانجی سیستم-های نوروآندوکرین می‌باشند. همانطور که گفته شد دوپامین به رسپتورهای متصل به G protein باند می‌شود[۱۰]. گیرنده های دوپامینی شامل پنج زیرگروه D1-D5 اند که گیرنده‌های D1وD5 جز زیر خانواده D1-like هستند که به رسپتور های Gs متصل می‌شوند و گیرنده‌های D2,D3,D4 از خانواده D2-like می‌باشند که به رسپتورهای Gi/G0متصل می‌گردند[۱۱]. شواهدی وجود گیرنده‌های D7 وD6 را نشان می‌دهد ولی تاکنون این گیرنده‌ها دقیقا مشخص نشده‌اند[۱۰]. گیرنده‌های دوپامین دارای عملکردهایی همچون تحریک، راه اندازی و یا مهار فعالیت‌هایی مثل فعالیت آدنیلات سیکلاز، کانال‌های کلسیمی، کانال‌های پتاسیمی، آراشیدونیک اسید، مبادله‌ی Na+/H+ و Na+-K+-ATPase نقش دارد [۱۲]. با این حال اکثر این مسیرها بیشتر در فعالیت های سیستم اعصاب نقش ایفا می‌کنند و حال آنکه این گیرنده ها علاوه بر سلول‌های سیستم اعصاب بر سطح سلول‌های دیگر نیز بیان شده و بسته به نوع سلول و نوع گیرنده نقش‌های متفاوتی را ایفا می‌کنند[۹،۱۲،۱۳].

Cutzkow و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که دوپامین بر تجمع درون سلولی cAMP درون T-cell ها تاثیر گذاشته و از تکثیر آن‌ها جلوگیری می‌کند. از آنجایی که اتصال دوپامین به رسپتور آن باعث افزایش cAMP درون سلولی

Archive of SID

www.SID.ir

می‌شود این پیامبر ثانویه دارای عمل تنظیم کننده تکثیر سلولی است و همچنین تاثیر بر ترشح سایتوکاین های مختلف از طریق لنفوسیت‌ها و سایر سلول‌های ایمنی دارد. مسیرهای پیام رسانی سلولی که معمولا به واسطه دوپامین از طریق همین گیرنده‌ها تحت تاثیر قرار می‌گیرند عبارتند از Phosphatidylinositide 3-kinases; PI3K) :. Mitogen-activated protein kinases (MAPK) وAkt pathway [۱۳]. در سال‌های گذشته مطالعاتی انجام شده است که نشان می‌دهد الگوی بیان ژن‌های گیرنده دوپامین در بیماران در مقایسه با افراد غیر مبتلا مختلف تغییر ایجاد می‌شود. همچنین مطالعات مشابه زیادی در مورد تغییر بیان این گیرنده‌ها در سلول‌های تک هسته‌ای خونی در بیمارانی که مبتلا به برخی بیماری‌ها اتفاق می‌افتد، که مستقیما از طریق ایجاد تغییر در رفتار و عملکرد سلول‌های ایمنی از جمله تغییر میزان ترشحات سایتوکاین‌های مختلف در روند بیماریزایی این بیماری‌ها نقش موثری بازی می‌کنند، که از جمله آن‌ها می‌توان به مطالعات قبلی گروه‌ها و محققان دیگر در زمینه اسکیزوفرنی، لوپوس اریتروماتوزیس، پسوریازیس و سرطان ریه اشاره کرد[۱۴-۱۷]. گیرنده‌های دوپامین بر روی لنفوسیت‌ها، ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها وجود دارد. لنفوسیت‌های B و سلول‌های کشنده طبیعی (NK Cell) بیان بیشتر و پایدارتری را نشان می‌دهند. در حالی‌که لنفوسیت‌های T و منوسیت‌ها دارای بیان متغیری از گیرنده‌های دوپامین هستند[۱۸]. در یک مطالعه نشان داده شد که دوپامین بر روی سلول‌های ایمنی به خصوص سلولهای خون محیطی تأثیرات متفاوتی می‌گذارد که در این مسیر گیرنده‌های دوپامین بیان شده برروی این سلولها به عنوان واسطه عمل می‌کند[۱۳]. همچنین گیرنده‌های دوپامین در القای ترشح فاکتورهای پیش التهابی و مهارکننده التهاب نقش بسیار موثری را ایفا می‌کنند. به عنوان مثال تحریک گیرنده D2 باعث ترشح TNF-α و تحریک گیرنده D3 باعث ترشح IL-10 از T-cellها می‌شود[۲۰].

حال با نگاهی بر نحوه ترمیم بافت در افراد طبیعی متوجه می‌شویم که در ۲۴ ساعت اول فاز التهابی ترمیم بیان فاکتورهای پیش التهابی از جمله IL-1α، IL-1β، IL-6، IL-12 وTNF-α افزایش یافته و سبب مهاجرت سلول‌هایی مانند لکوسیت‌ها، منوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها جهت از بین بردن عوامل عفونی مثل باکتری‌ها سلول‌های مرده بافت‌های آسیب دیده و همچنین در جلب لکوسیت‌های به خصوص سلول‌های T، منوسیت‌ها و ماکروفاژهای مغز استخوان مشارکت می‌کنند [۱۹-

Archive of SID
www.SID.ir

۲۱]. TNF-α توسط لکوسیت‌های پلی مورفونوکلوئر و ماکروفاژها و سلول‌های اپیتلیوم ناحیه زخم ترشح می‌شود [۲۲]. TNF-α در القای ترشح فاکتورهای رشد در فیبروبلاست‌ها و کراتینوسیت‌ها و مقا.مت در برابر عفونت‌های میکروبی نقش مهمی ایفا می‌کند. بعد از تکمیل فاز تکثیری سطح TNF-α به سطح پایه خود باز می‌گردد [۲۰]. با این حال برخی مطالعات نشان داده‌اند که سطح TNF-α در این حالت به میزان پایه خود بازنگشته و باعث تاثیراتی چون مهار مهاجرت فیبروبلاست‌ها، و کراتینوسیت‌ها در invivo می‌شود [۱۹]. همچنین سطح افزایش یافته TNF-α باعث القای آپوپتوزیس در فیبروبلاست‌ها، کراتینوسیت‌ها و سلول‌های اندوتلیال در invitro می‌شود [۲۳, ۲۴]. به طوریکه استفاده از مهارکننده‌های TNF-α باعث کاهش میزان آپوپتوزیس و بهبود روند ترمیم در invivo می‌شود [۵].

علاوه بر شرایط هایپوکسی نشان داده شده است که شرایط و عوامل دیگری نیز در بیان فاکتورهای پیش التهابی خصوصا TNF-α نقش مهمی ایفا می‌کنند [۲۵]. برخی مطالعات نشان داده‌اند که گیرنده‌های دوپامین خصوصا گیرنده‌های خانواده DRD2 مانند DRD2 وDRD3 نقش مهمی در ترشح فاکتورهای پیش التهابی و مهارکننده التهاب بر عهده دارند [۲۵]. برای مثال ترشح انتخابی TNF-α و اینترلوکین-۱۰ در سلول‌های T نرمال انسان از طریق تحریک گیرنده‌های DRD2 و DRD3 نشان داده شده است. همچنین دیده شده است که دوپامین ترشح سایتوکاین‌های تنظیم کننده التهاب مانند IL-6،TNF-α ، CCL2، CXCL8 و IL-10 از ماکروفاژها بواسطه گیرنده‌های DRD3 و DRD4 نقش داشته است [۲۶].

بنابراین با توجه به مطالب ذکر شده و اهمیت گیرنده‌های دوپامینی خصوصا گیرنده‌های خانواده D2 در تنظیم تکثیر سلول-های ایمنی و نقش موثر آن‌ها در تنظیم ترشح سایتوکاین‌ها (به خصوص سایتوکاین‌های التهابی مانند TNF-α) و نقش فاکتورهای التهابی در روند ایجاد زخم‌های پای افراد دیابتی، به نظر می‌رسد انجام مطالعه‌ای در جهت بررسی تغییرات بیان گیرنده‌های دوپامین در بیماران دیابتی و بررسی ارتباط آن در ترشح سایتوکاین‌های التهابی امری ضروری است.

Archive of SID

www.SID.ir

فصل دوم

پیشینه پژوهش

Archive of SID

www.SID.ir

در سال‌های گذشته مطالعاتی انجام شده است که نشان می‌دهد الگوی بیان ژن‌های گیرنده دوپامین در بیماران در مقایسه با افراد غیر مبتلا مختلف تغییر ایجاد می‌شود. همچنین مطالعات مشابه زیادی در مورد تغییر بیان این گیرنده‌ها در سلول‌های تک هسته‌ای خونی در روند بیماری زایی برخی بیماری‌ها دخیل بوده است که مستقیما از طریق ایجاد تغییر در رفتار و عملکرد سلول‌های ایمنی از جمله تغییر میزان ترشحات سایتوکاین‌های مختلف نقش موثری بازی می‌کنند. از جمله آن‌ها می‌توان به مطالعات قبلی و محققان دیگر در اسکیزوفرنی، لوپوس اریتروماتوزیس، پسوریازیس و سرطان ریه اشاره کرد[۱۵-۱۸].

همچنین در سال ۱۹۹۰ طی مطالعه‌ای که توسط Seeman و همکاران صورت گرفت تغییر در بیان گیرنده‌های دوپامین در افراد مبتلا به پارکینسون مشاهده شد[۲۱].

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۱ توسط Kwak و همکاران انجام شد، افزایش چشمگیری در بیان ژن‌های گیرنده D2 وD3 در نمونه‌های خون محیطی افراد مبتلا به اسکیزوفرنی گزارش شد[۱۷].

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ توسط جعفری و همکاران انجام شد، افزایش بیان در ژن گیرنده D4 مشاهده گردید[۱۸]. همچنین مطالعه مشابهی که در زمینه سرطان ریه توسط شیخ پور و همکاران در سال۲۰۱۲ انجام شد کاهش چشمگیر در بیان گیرنده‌های D2-D4 مشاهده شد[۱۶].

مطالعات متعددی نشان می‌دهد که بر خلاف نظریه اینکه در زخم‌های دیابتی فرایند التهاب اتفاق نمی-افتد، موید حضور فاکتورهای التهابی ایمنولوژیک در سطح مولکولی می‌باشد که از جمله این سایتوکاین‌ها می توان به افزایش میزان TNF-α اشاره کرد که یکی از فاکتورهای التهابی می باشد و افزایش آن باعث القا آپوپتوزیس در سلول‌های فیبروبلاست که نقش پایه ای را در ترمیم زخم بازی می‌کنند و در اصل فرایند ترمیم با تکثیر این سلول‌ها آغاز می‌شود، هست. بنابراین علی رغم نقش محوری این سایتوکاین به نظر می-رسد که به جای کموتاکسی سلول‌های دخیل در پدیده التهاب با اتصال به گیرنده‌های آپوپتوزی خود بر روی سلول‌های فیبروبلاست بیشتر سبب مهار پدیده ترمیم و التهاب می‌شوند، که احتمالا این تغییرات در اثر تغییرات الگوی بیان گیرنده‌های دوپامین اتفاق می‌افتد [۵-۷].

Archive of SID

www.SID.ir

در این زمینه Siqueira و همکارانش در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که در موش‌های مدل دیابت سطح افزایش یافته‌ای از TNF-α دیده شده است. این مطالعات نشان می‌دهد که اختلال در نظم TNF-α، بهبود زخم دیابتی را ایجاد کرده و این اختلال در اثر افزایش میزان آپوپتوز در سلول‌های فیبروبلاست و کاهش تکثیر آن‌ها رخ می‌دهد[۵].

همچنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۳ توسط Miyazaki و همکارانش انجام شد نشان دادند که افزایش غلظت TNF-α موجود درگردش خون با مقاومت به انسولین محیطی مرتبط در دیابت نوع دوم ارتباط دارد[۷].

همچنین مطالعه ای که در سال ۲۰۰۶ توسط Goren و همکاران انجام شد تاثیر عوامل التهابی در بروز دیابت تیپ ۲ نشان داده شد و اثر بهبود زخم پس از تجویز آنتی بادی منوکلونال در ترمیم بافت پوست موش های دیابتی مشاهده شد[۶].

Archive of SID

www.SID.ir

فصل سوم

اهداف پژوهش

Archive of SID

www.SID.ir

اهداف و فرضیات

هدف اصلی

مقایسه بیان گیرنده های دوپامین D2 و D3 و TNF-α در سلولهای خون محیطی در مبتلایان به زخم مزمن پای دیابتی و افراد دیابتی بدون زخم پا در مقایسه با افراد سالم

اهداف ویژه

۱. بررسی بیان ژن گیرنده دوپامین D2 در سلولهای خون محیطی افراد دارای زخم پای دیابتی
۲. بررسی بیان ژن گیرنده دوپامین D2 در سلولهای خون محیطی افراد دیابتی بدون زخم پا
۳. بررسی بیان ژن گیرنده دوپامین D2 در سلولهای خون محیطی افراد غیر دیابتی سالم
۴. بررسی بیان ژن گیرنده دوپامین D3در سلولهای خون محیطی افراد دارای زخم پای دیابتی
۵. بررسی بیان ژن گیرنده دوپامین D3 در سلولهای خون محیطی افراد دیابتی بدون زخم پا
۶. بررسی بیان ژن گیرنده دوپامین D3 در سلولهای خون محیطی افراد غیر دیابتی سالم
۷. تعیین و مقایسه الگوی بیان ژن‌های گیرنده دوپامین D2 در سلولهای خون محیطی در هرسه گروه مورد مطالعه بادیگرگروه‌های
۸. تعیین و مقایسه الگوی بیان ژن‌های گیرنده دوپامین D3 در سلولهای خون محیطی در هرسه گروه مورد مطالعه بادیگرگروه‌ها
۹. بررسی بیان ژن گیرنده دوپامین TNF-α در سلولهای خون محیطی افراد دارای زخم پای دیابتی
۱۰. بررسی بیان ژن گیرنده دوپامین TNF-α در سلولهای خون محیطی افراد دارای زخم پای دیابتی
۱۱. بررسی بیان ژن گیرنده دوپامین TNF-α در سلولهای خون محیطی افراد دارای زخم پای دیابتی
۱۲. تعیین و مقایسه الگوی بیان ژن TNF-α در سلولهای خون محیطی در هرسه گروه مورد مطالعه بادیگرگروه‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

۱۳. تعیین و مقایسه سطح سرمی TNF-α در خون محیطی افراد دارای زخم پای دیابتی

۱۴. تعیین و مقایسه سطح سرمی TNF-α در خون محیطی محیطی افراد دیابتی بدون زخم پا

۱۵. تعیین و مقایسه سطح سرمی TNF-α در خون محیطی افراد غیر دیابتی سالم

۱۶. تعیین ارتباط بین بیان ژنهای گیرنده های D2 و D3 با سطح فاکتور پیش التهابی TNF-α در افراد مورد مطالعه

فرضیات و سوالات پژوهشی (Hypothesis):

۱. آیا الگوی بیان ژن‌های گیرنده‌های دوپامین D2 و D3 در سلولهای خون محیطی در سه گروه مورد مطالعه متفاوت است؟

۲. آیا الگوی بیان ژن TNF-α در سلولهای خون محیطی در سه گروه مورد مطالعه متفاوت است؟

۳. آیا بین تغییرات بیان ژنهای گیرنده های D2 و D3 با سطح فاکتور پیش التهابی TNF-α در افراد مورد مطالعه ارتباطی وجود دارد؟

Archive of SID

www.SID.ir

فصل چهارم

روش پژوهش

Archive of SID

www.SID.ir

نوع مطالعه:

نوع این مطالعه مورد-شاهد (case-control) می‌باشد.

مکان و زمان مطالعه:

این مطالعه در سال ۱۳۹۴-۱۳۹۵ در گروه لیزر پزشکی جهاد دانشگاهی علوم پزشکی تهران به اجرا در حال انجام است.

جامعه مورد بررسی ، روش نمونه گیری و تعداد نمونه

بیماران و افراد سالم مراجعه کننده به مرکز جامع ترمیم زخم جهاد دانشگاهی علوم پزشکی تهران می‌باشند. نوع نمونه گیری به صورت غیر تصادفی آسان می‌باشد و نمونه گیری بر اساس معیارهای ورود و خروج زیر انجام می‌شود. روش نمونه گیری به صورت متوالی غیرتصادفی است.

معیار ورود گروه دیابتی با زخم مزمن پای دیابتی

۱. افراد مورد مطالعه در دامنه سنی ۴۰-۷۵ سال ومدت زمان ابتلابه دیابت در آن‌ها بالای ۱۰ سال باشد
۲. بیماران مبتلا به دیابت که مبتلا به زخم مزمن پای دیابتی Stage I & II وگنر بدون بافت نکروتیک یا عفونت استخوان می‌باشند.
۳. بیمارانی که جهت کنترل قند خون از انسولین تزریقی استفاده کرده‌اند.
۴. رضایت از ورود به مطالعه و ارائه نمونه خون

Archive of SID
www.SID.ir

معیار ورود گروه دیابتی بدون زخم:

۱. افراد مورد مطالعه در دامنه سنی ۴۰-۷۵ سال و مدت زمان ابتلابه دیابت در آن‌ها بالای ۱۰ سال باشد.

۲. بیماران مبتلا به دیابت که تحت درمان انسولین تزریقی جهت کاهش قند خون هستند.

۳. شرایط طول مدت بیماری با بیماران دیابتی مبتلا به زخم مزمن پای دیابتی همسان شده باشد.

۴. رضایت از ورود به مطالعه و ارائه نمونه خون

معیار ورود گروه سالم

۱) از افراد و مراجعین بالای ۴۰ سال به مرکز ترمیم زخم جهاد دانشگاهی

۲) اهدا کنندگان نباید سابقه دیابت داشته باشند.

۳) اهدا کنندگان سابقه استفاده از داروهای روانگردان و اعتیاد نباید داشته باشند.

۴) حین نمونه گیری دارای هیچگونه عارضه زخم نداشته باشند.

۵) رضایت از ورود به مطالعه و ارائه نمونه خون

معیارهای خروج از مطالعه:

۱) طول دوره ابتلا به دیابت در صورتی که کمتر از ۱۰ سال باشد

۲) داشتن سابقه مصرف داروهای روانپزشکی در یکسال گذشته

۳) سوءمصرف مواد اپیوییدی یا روانگردان در یکسال گذشته

۴) داشتن زخم در هنگام نمونه گیری

۵) داشتن سن پایین تر از ۴۰ سال

Archive of SID

www.SID.ir

روش محاسبه حجم نمونه

با توجه به اینکه تا کنون مطالعه‌ای به این شکل و بصورت کمی در این افراد جهت بررسی گیرنده‌های خانواده D2 انجام نشده است، لازم است نخست جهت تعیین محاسبه دقیق حجم نمونه از ۱۰ نفراز هر سه گروه نمونه گیری شده و سپس با محاسبه ضرائب خطای بتا و آلفا و محاسبه توان آزمون حجم دقیق مورد نیاز محاسبه و نمونه گیری دقیق انجام شود. در صورت نیاز بعد از مطالعه اولیه این تعداد قابل افزایش خواهد بود.

ملاحظات اخلاقی:

با توجه به نمونه گیری (۵ سی سی خون) از بیماران، ابتدا توسط پژوهشگر توضیحات لازم به بیماران در خصوص اهداف طرح تحقیقاتی ارائه می‌شد و در صورت رضایت بیماران و اخذ رضایت نامه کتبی نمونه‌گیری انجام می‌گیرد. لازم به توضیح است که کلیه اطلاعات بیماران محرمانه باقی می‌ماند.

روش اجرای طرح:

جهت ورود به مطالعه پس از تشخیص بیماری از افرادی که سابقه بیماری‌های روانی عصبی، غددی، بدخیمی، بیماری‌های اتوایمیون، روماتیسمی و عدم داشتن سابقه استفاده از داروهای ایمینوساپرسیو و آنتی سایکوتیک و عدم وجود اعتیاد به مواد مخدر و الکل پس از اخذ رضایت نامه کتبی ۵ میلی لیتر خون محیطی گرفته شده و سلول‌های خون محیطی این افراد با استفاده از شیب غلظت فایکول جداسازی شده، Total RNA از آن‌ها با استفاده از کیت easy blue محصول شرکت اینترون کشور کره با استفاده از دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. همچنین غلظت نمونه‌ها با استفاده از نانودراپ سنجیده شد و به مقدار برابر و میزان ۱۰۰ نانوگرم به ازای هرنمونه از RNA جهت سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از کیت سنتز cDNA محصول شرکت فرمنتاز آمریکا cDNA بر اساس دستورالعمل شرکت

Archive of SID

www.SID.ir

سازنده سنتز شد. پرایمرهای مناسب برای هرکدام از ژن‌ها براساس توالی های موجود در پایگاه داده مربوط به نوکلئیک اسید (www.ncbi.nlm.nih.gov) و به کمک نرم افزار oligo7 طراحیو اختصاصیت پرایمرها با انجام blast در پایگاه اطلاعات داده مربوط به نوکلئیک اسید (www.ncbi.nlm.nih.gov) مورد ارزیابی قرار گرفت. توالی پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول۱: نمایش اطلاعات مربوط به پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

Genes	Primers sequences	Accession number	Product length
β-actin-Forward	5’-AGACGCAGGATGGCATGGG-3’	NM_001101.3	161bp
β-actin -Reverse	5’-GAGACCTTCAACACCCCAGCC-3’		
drd2 -Forward	5'-TGTACAATACGCGCTACAGCTCCA-3'	NM_016574.3	127bp
drd2 -Reverse	5'-ATGCACTCGTTCTGGTCTGCGTTA-3'		
drd3- Forward	5'-TCTGTGCCATCAGCATAGACAGGT-3'	NM_000796.3	156bp
drd3-Reverse	5'-TAAAGCCAAACAGAAGAGGGCAGG-3'		
TNF-α -Forward	5'-ATGTTGTAGCAAACCCTCAAGC-3'	NM_000594.3	145bp
TNF-α- Reverse	5'-AGGACCTGGGAGTAGATGAGG-3'		

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR)

برای بررسی کیفیت cDNA های ساخته شده از پرایمرهای ژن خانه دار بتا اکتین جهت تکثیر نمونه ها استفاده شد (شکل ۱). سپس بیان ژن‌های گیرنده های دوپامین D2 و D3 و TNF-α در نمونه‌های خون محیطی هر سه گروه افراد مبتلا به دیابت دارای زخم پای دیابتی، بدون زخم پای دیابتی و غیر مبتلا، با استفاده از تکنیک PCR و با استفاده از کیت PCR محصول شرکت سیناژن ایران مورد ارزیابی قرار گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

شرایط انجام PCR برای هر یک از ژن‌ها به شرح ذیل می‌باشد. مرحله دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، سپس به تعداد ۳۵ سیکل دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتیگراد ۵۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها (annealing) برای ژن‌های بتا اکتین، TNF-α و D3 ۶۳ درجه سانتیگراد، برای ژن D2 دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۵ ثانیه و مرحله طویل سازی (extension) در دمای ۷۲درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و نهایتا مرحله طویل سازی پایانی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. نتایج در نهایت بروی ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

طرز تهیه ژل آگارز ۱/۵ ٪

ابتدا ۰/۷۵ گرم از پودر آگارز (LP سیناژن) را وزن کرده و درون یک ظرف شیشه‌ای می‌ریزیم و سپس ۵۰ میلی لیتر 1x TBE [1] به آن اضافه می کنیم. بشر و محتویات درون آن را درون مایکرو ویو حرارت داده و بعد از خنک شدن آن را در یک سینی مخصوص ریخته‌گری ژل (Tray) که شانه مخصوص ایجاد چاهک بر روی آن سوار شده است می‌ریزیم تا کاملاً سفت شود، سپس شانه را خارج کرده و در نهایت درون تانک الکتروفورز قرار داده آماده بارگذاری نمونه‌ها می‌شود.

بافر بارگذاری [2]

برای بارگذاری راحت‌تر نمونه‌ها ابتدا آن‌ها را با رنگ مخصوص (Loading Buffer Dye) مخلوط کرده و به درون چاهک‌ها منتقل می‌نماییم.

این رنگ مخصوص دارای ۳ ویژگی‌است:

۱- باعث می‌شود نمونه‌ها در ته چاهک‌ها قرار گیرند.

۲- باعث رنگ دار شدن نمونه و مشاهده آن در طی فرایند بارگذاری می‌شود.

[1] Tris borate EDTA
[2] Loading Buffer

Archive of SID
www.SID.ir

۳- مانند اسیدهای نوکلئیک در میدان الکتریکی حرکت می‌کند.

بافر الکتروفورز

بافر درون تانک الکتروفورز و بافری که با آن ژل را می‌سازیم (در اینجا 1x TBE یا 1X TAE) باید یکسان باشد.

رنگ آمیزی

بعد از رسیدن نمونه‌ها (رنگ پایین بافر بارگذاری) به ۱/۳ انتهای ژل فرآیند الکتروفورز را خاتمه داده و ژل را برای رنگ‌آمیزی وارد مخزن حاوی رنگ اتیدیوم برماید (EtBr[3]) می‌نماییم. پس از مدت ۲۰-۱۵ دقیقه ژل را خارج کرده و درون مخزن رنگ بری می‌گذاریم تا رنگ‌های اضافی سطح ژل پاک شود، سپس ژل آماده را در معرض نور UV قرار داده تا بتوان باندهای اختصاصی را روی ژل مشاهده کنیم. و درصورت امکان از آن عکس گرفته و یا آن را روی دیسکت ذخیره نماییم.

Real time PCR

در نهایت تغییرات بیان این گیرنده‌ها در افراد دیابتی درمقایسه با افراد غیر مبتلا با استفاده از تکنیک real time-PCR با استفاده از کیت محصول شرکت Roche کشور آلمان مورد ارزیابی قرار گرفت. اطلاعات مربوط به مواد مورد استفاده در انجام این آزمایش در جدول ۲ آمده است.

شرایط انجام real time PCR برای هرکدام از ژن‌ها در جداول (۳-۶) آمده است.

[3] Ethidum bromide

Archive of SID

www.SID.ir

ابتدا مواد را بر طبق مقادیر موجود در جدول۲ در ویال 0.1 ml می‌ریزیم. در اینجا نیز همانند مرحله سنتز cDNA می‌توان غلظت تمام cDNA ها را خوانده به همان دلیلی که در قسمت قبل ذکر شد یکسان‌سازی را انجام دهیم. نحوه انجام real time PCR برای هرکدام از ژن‌ها و نمودارهای مربوط به تکثیر و دمای ذوب دراشکال۱-۴ آورده شده است.

جدول۲ : مواد مورد نیاز برای تهیه Master برای هر واکنشReal-time PCR

مراحل	مواد	مقادیر(µl)
1	ddH2O	6.4
2	PCR Primer 10X F	0.3pmol
3	PCR Primer 10X R	0.3pmol
4	Master mix 5X	2
5	Total	9

مخفف ها: ddH2O:آب دو بار تقطیر[4]، F:Forward، R:Reverse ، pmol : پیکومول

جدول۳: برنامه real-time PCR برای ژن کد کننده ژن شکل بتا-اکتین

Cycle	Cycle Point
Hold @ 95°c, 10 min 0 secs	
Cycling (50 repeats)	Step 1 @ 95°c, hold 10 secs
	Step 2 @ 62°c, hold 15 secs
	Step 3 @ 72°c, hold 20 secs, acquiring to Cycling A([Green][1][1])
Melt (72-95°c) , hold secs on the 1st step, hold 5 secs on next steps, Melt A([Green][1][1])	

[4] Double distillation H2O

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۴: برنامه real-time PCR برای ژن کد کننده *DRD2*

Cycle	Cycle Point
Hold @ 95°c, 10 min 0 secs	
Cycling (50 repeats)	Step 1 @ 95°c, hold 10 secs
	Step 2 @ 60°c, hold 15 secs
	Step 3 @ 72°c, hold 20 secs, acquiring to Cycling A([Green][1][1])
Melt (72-95°c) , hold secs on the 1st step, hold 5 secs on next steps, Melt A([Green][1][1])	

جدول۵: برنامه real-time PCR برای ژن کد کننده *DRD3*

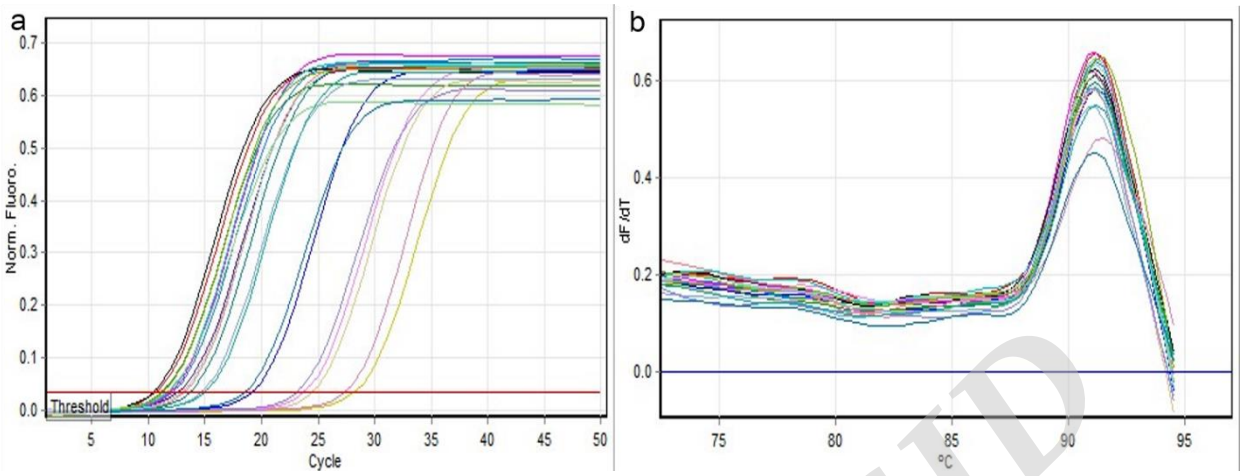
Cycle	Cycle Point
Hold @ 95°c, 10 min 0 secs	
Cycling (50 repeats)	Step 1 @ 95°c, hold 10 secs
	Step 2 @ 62°c, hold 15 secs
	Step 3 @ 72°c, hold 20 secs, acquiring to Cycling A([Green][1][1])
Melt (72-95°c) , hold secs on the 1st step, hold 5 secs on next steps, Melt A([Green][1][1])	

جدول۶: برنامه real-time PCR برای ژن کد کننده TNF-α

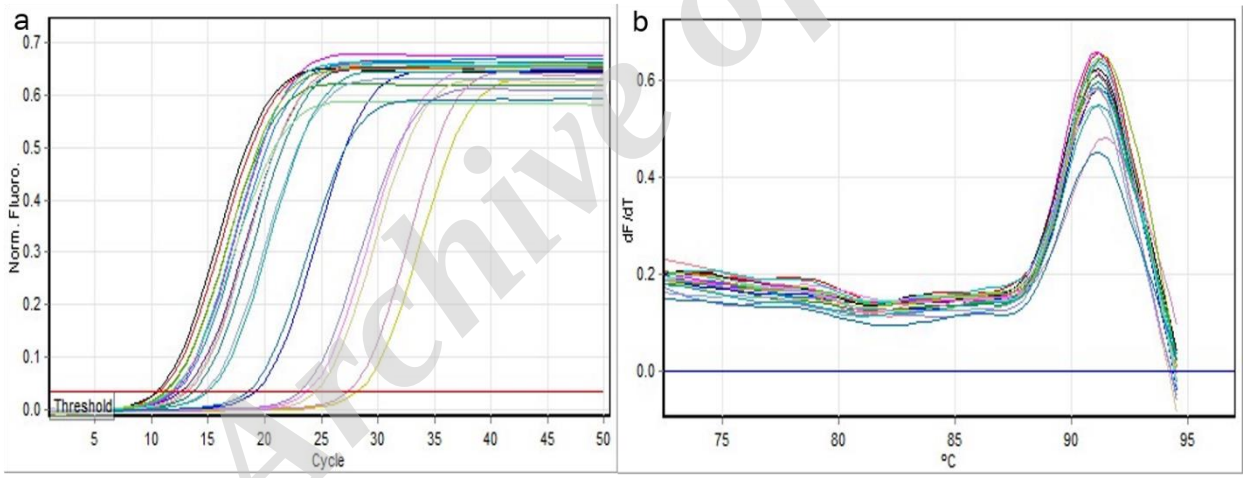
Cycle	Cycle Point
Hold @ 95°c, 10 min 0 secs	
Cycling (50 repeats)	Step 1 @ 95°c, hold 10 secs
	Step 2 @ 62°c, hold 15 secs
	Step 3 @ 72°c, hold 20 secs, acquiring to Cycling A([Green][1][1])
Melt (72-95°c) , hold secs on the 1st step, hold 5 secs on next steps, Melt A([Green][1][1])	

Archive of SID

www.SID.ir

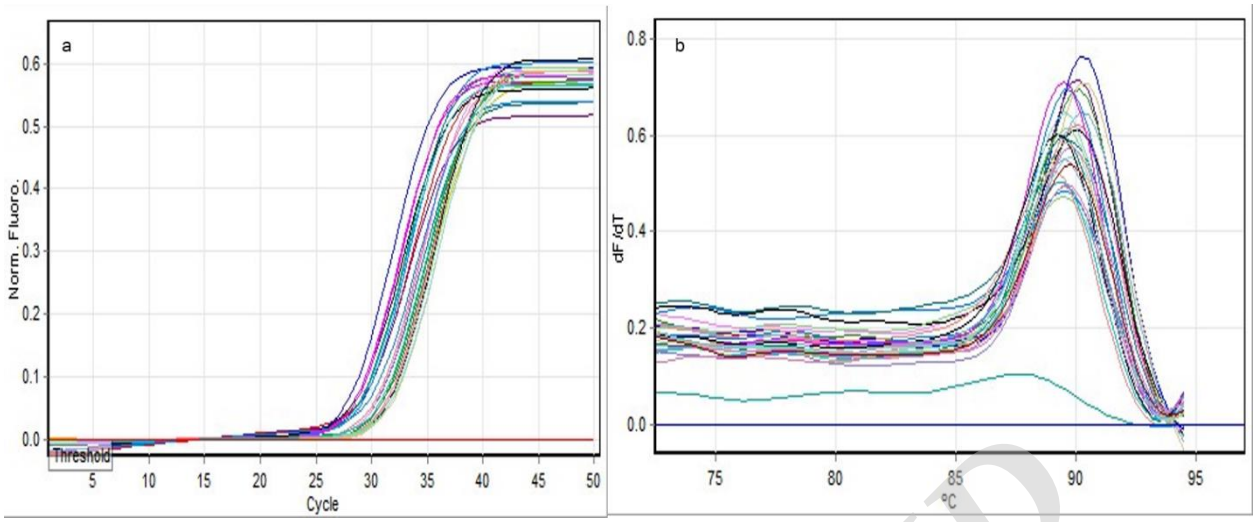


شکل۱: (a) منحنی کمی و (b) منحنی دمای ذوب ژن بتا-اکتین

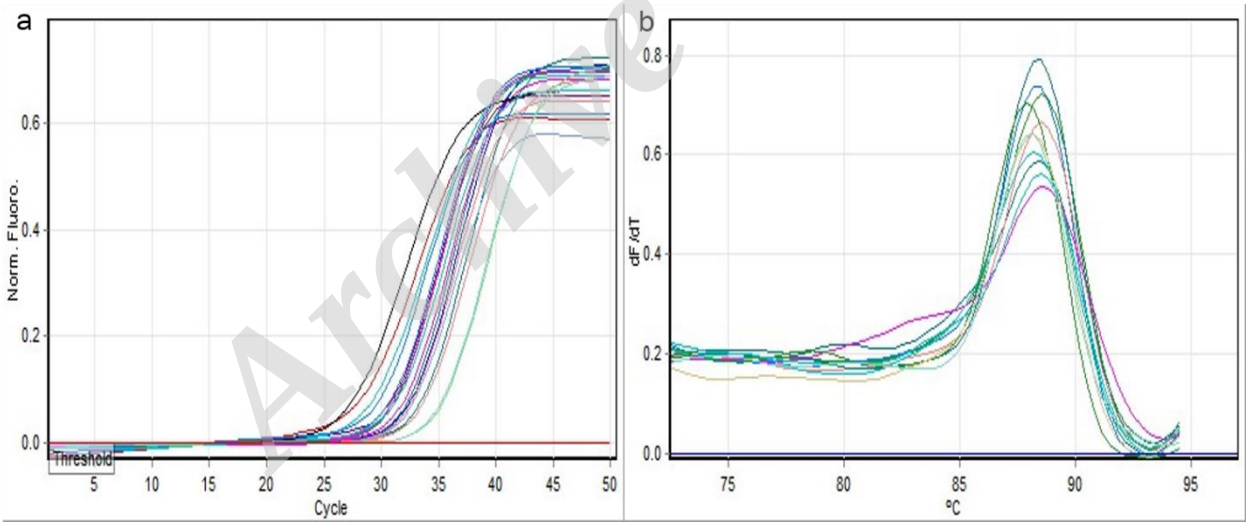


شکل۲: (a) منحنی کمی و (b) منحنی دمای ذوب ژن *DRD2*

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۳: (a) منحنی کمی و (b) منحنی دمای ذوب ژن *DRD3*



شکل٤: (a) منحنی کمی و (b) منحنی دمای ذوب ژن TNF-α

Archive of SID

www.SID.ir

تعیین توالی و تایید اختصاصیت PCR

جهت تایید صحت توالی‌های تکثیر شده محصولات PCR توالی یابی توسط شرکت پیشگام توسط شرکت bioneer کشور کره انجام شد. سپس نتیجه به دست آمده در پایگاه اطلاعات داده نوکلئیک اسید blast (www.ncbi.nlm.nih.gov) شد.

الایزا

در مرحله بعد میزان تغییرات سطح TNF-α در سرم افراد دیابتی دارای زخم ، بدون زخم و افراد سالم انجام شد. برای این کار از کیت جستجوی TNF-α محصول شرکت eBioscience آمریکا توسط دستگاه ELISA plate reader (ELX800^{TM}, USA) استفاده شد. نحوه انجام تست هم براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام و میزان TNF-α در هر نمونه محاسبه گردید. شایان ذکر است جهت تهیه شیب غلظت و رسم منحنی استاندارد کیت حاوی TNF-α خالص بود که به عنوان کنترل مثبت و جهت تهیه شیب غلظت مورد استفاده قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری:

در نهایت آنالیزهای آماری و بررسی ارتباط بین تغییرات بیان گیرنده‌های دوپامینی در بیماران دیابتی و بررسی تغییرات سطح TNF-α در بیماران دیابتی دارای زخم و بدون زخم انجام شد. جهت آنالیز آماری از نرم افزار های excel و spss ویرایش ۱۸ مورد استفاده قرار گرفت. در بررسی تغییرات بیان ژن در بین گروه‌ها از روش ΔΔCT استفاده شد. همچنین برای مقایسه تغییرات سطح سرمی TNF-α در بین هر گروه با گروه دیگر از آزمون T-test و برای بررسی ارتباط بین بیان ژن گیرنده‌ها با همدیگر و با میزان تغییرات سرمی همزمان TNF-α آزمون همبستگی (correlation) انجام شد و برای مطالعات درون گروهی آزمون one way anova و به همراه آنالیز واریانس (Bonferroni) انجام شد.

Archive of SID

www.SID.ir

مشکلات انجام طرح:

نداشتن امکانات کافی جهت انجام تست‌های مولکولی اجبارا در آزمایشگاه‌هایی خارج از مرکز مربوطه انجام شد که مستلزم صرف هزینه‌های بیشتر نیروی انسانی و دستگاه‌ها بود. مشکلاتی جهت نگهداری نمونه‌های RNA و سلولهای PBMCs نیز وجود داشت که باعث می‌شد مراحل انجام تست پشت سر هم و بدون وقفه برای هر نمونه انجام شود و بدین ترتیب تعداد دفعات استفاده از دستگاهها نیز افزایش می‌یافت.

Archive of SID

www.SID.ir

فصل پنجم

یافته‌های پژوهش

Archive of SID

www.SID.ir

یافته‌ها

در مرحله اول پس از نمونه‌گیری از حدودا ۲۰ نفر در هر گروه و جداسازی سلول‌های خون محیطی اولیه تعداد نمونه ی مورد نیاز محاسبه شد. البته برای محاسبه تعداد نمونه در مرحله اول از ۱۰ نمونه در هر گروه استفاده شد. برای این کار ابتدا real time PCR برای ژن‌های بتا اکتین، DRD2، DRD3 و TNF-α انجام شد. سپس ΔCt هر نمونه محاسبه شد. در مرحله بعد انحراف از معیار مربوط به ΔCt هر کدام از گروه‌ها محاسبه شد. سپس با استفاده از فرمول ذیل تعداد نمونه های مورد نیاز محاسبه شد:

$n \geq (Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 (SD_1^2 + SD_2^2) / (X - \bar{X}_1)^2$

$\beta = 0.2$

$\alpha = 0.05$

$Power = 1-\beta = 0.8$

$(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 = 7.61$

$n_{TNF} \geq 17$

$n_{DRD2} \geq 2$

$n_{DRD3} \geq 2$

	SD_{TNF}	SD_{DRD2}	SD_{DRD3}	$\bar{X}_{\Delta Ct\ TNF}$	$\bar{X}_{\Delta CtDRD2}$	$\bar{X}_{\Delta CtDRD3}$
افراد سالم	2.992119	2.128154	2.236517	11.5285	3.798683741	4.505201263
دیابتی دارای زخم	1.273257	4.938614	3.693883	13.72624	13.96764	17.4772
دیابتی بدون زخم	1.028151	2.695497	3.065157	12.62130769	11.55212	20.73678

تعداد حداکثر نمونه مورد نیاز برای هرکدام از ژن‌ها محاسبه شد که در مجموع در هرگروه تعداد حداگثر ۱۷ نمونه برای بررسی تغییرات بیان این ژن‌ها کافی به نظر می‌رسد. سپس در ادامه پس از اخذ رضایت نامه کتبی خون‌گیری تا ۳۱ فرد دارای زخم پای دیابتی و ۳۰ نفر بیمار دیابتی بدون زخم پا و ۳۰ نفر فرد غیر مبتلا به عنوان گروه کنترل انجام شد و مجددا همه مراحل برای این نمونه ها تکرار شد.

Archive of SID

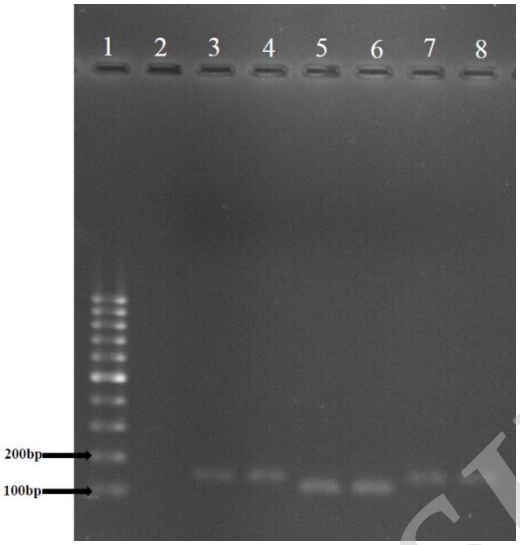
www.SID.ir

نتایج RT-PCR

نتایج حاصل از RT-PCR نشان داد که هر سه ژن DRD2، DRD3 و TNF-α در سلول‌های خون محیطی در هر سه گروه مورد مطالعه در طرح بیان دارند (شکل۱) . به علاوه بیش از نیمی از افراد دیابتی (هر دو گروه زخم دار و بدون زخم) ژن DRD3 شان دارای تفاوت در ناحیه CDSشان که پرایمر برای آن طراحی شده بود دارند (شکل۲). همچنین نتایج نشان می‌دهد که بیان ژن DRD3 درهر دو گروه افراد دیابتی به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش داشته و یا اصلا بیان ندارد. لازم به توضیح است که پرایمر اختصاصی طراحی شده برای این ناحیه که یک اتصال اگزونی را نیز در بر می‌گرفت جهت تکثیر قطعه‌ای به اندازه ۱۵۶جفت باز بود، ولی در افراد فوق الذکر قطعاتی بالای ۴۰۰ جفت باز نشان می‌داد که جهت بررسی بیشتر دو بار برای تعیین توالی ۱۱نمونه مختلف فرستاده شد (شکل۳).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۱: نمایش بیان ژنهای DRD2,DRD3و TNF-α در افراد سالم و دیابتی.

چاهک ۱: سایز مارکر۱۰۰جفت باز محصول شرکت فرمنتاز

چاهک۲:کنترل منفی

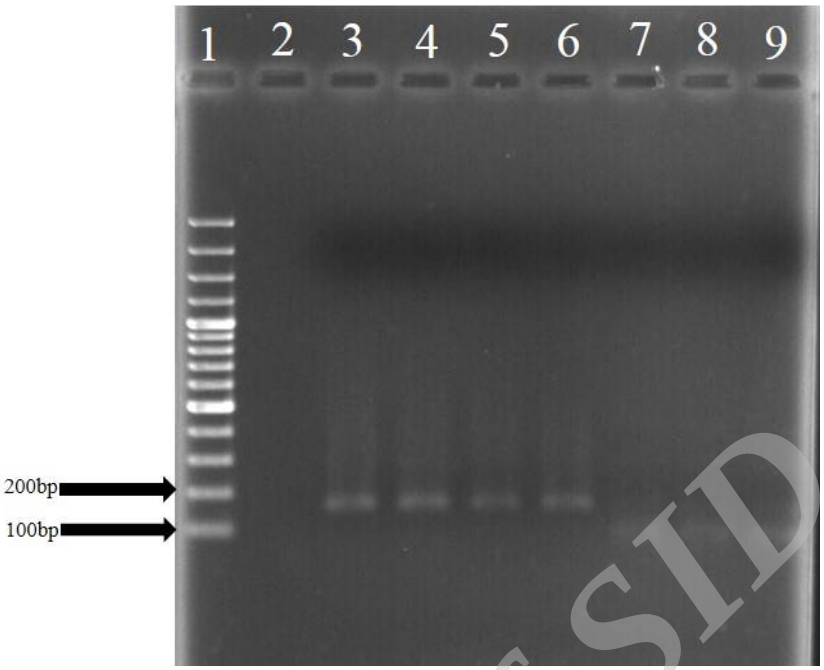
چاهک۳و٤: بیان ژن TNF-α در دو فرد از گروه‌های سالم و دیابتی(۱٦۰جفت باز)

چاهک ۵و٦:بیان ژن DRD2 در دو فرد از گروه‌های سالم و دیابتی (۱۲۷جفت باز)

چاهک ۷و۸: بیان ژن DRD3 در دو فرد از گروه‌های سالم و دیابتی (۱۵٦جفت باز)

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۲: نمایش بیان متغیر ژن DRD3 در افراد دیابتی.

چاهک ۱: سایز مارکر۱۰۰جفت باز محصول شرکت فرمنتاز

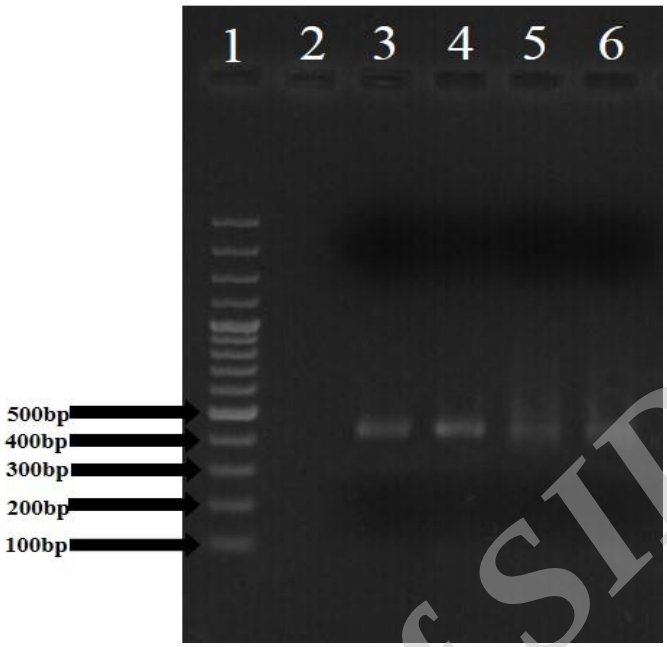
چاهک۲:کنترل منفی

چاهک۳و٤: بیان ژن DRD3 در افراد دیابتی بدون زخم

چاهک ٥و٦: : بیان ژن DRD3 در افراد دیابتی دارای زخم پای دیابتی

چاهک ۹- ۷: نمونه هایی از افراد دیابتی دارای زخم پا و بدون زخم که بیان ژنDRD3 در آنها بسیار کم است

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۳: نمایش بیان رونوشت های جدید ژن DRD3 در افراد دیابتی

چاهک ۱: سایز مارکر۱۰۰جفت باز محصول شرکت فرمنتاز

چاهک۲:کنترل منفی

چاهک۳و٤: بیان رونوشت جدید ژن DRD3 در افراد دیابتی بدون زخم و دارای زخم پای دیابتی (اندازه باند ٤۳۰جفت باز)

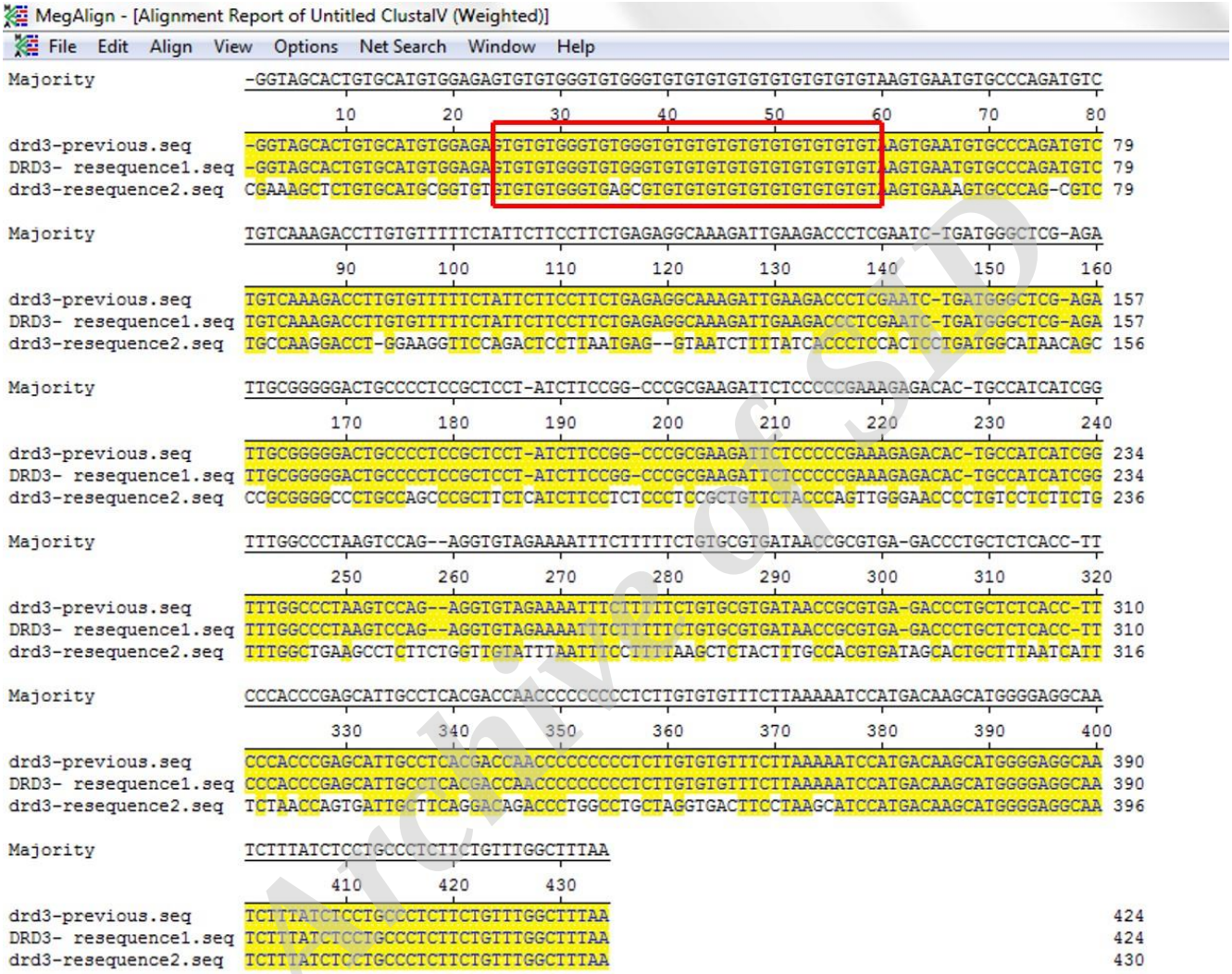
چاهک ٥و٦: : بیان ژن DRD3 در افراد دیابتی بدون زخم و در افراد دیابتی دارای زخم پای دیابتی(اندازه باند ٤۲٤جفت باز)

نتایج تعیین توالی

نتایج حاصل از تعیین توالی اختصاصیت پرایمرهای تعیین توالی شده را به وضوح در مورد هر سه ژن نشان داد و تعیین توالی برای رونوشت های جدید ژن DRD3 انجام شد. نتایج حاصل بیانگر وجود یک درج توالی با توالی های غیر یکسان در مقایسه با توالی اصلی در ناحیه مورد نظر بود. نتایج تعیین توالی وجود دو توالی جدید که ۷۰/۶ درصد یکسانی با هم داشتند را تایید می‌کرد، که جهت حصول اطمینان از صحت تعیین توالی، قطعات تکثیر شده دو بار به شرکت Bioneer کره ارسال گردید. در نهایت نتایج حاصل به عنوان رونوشت‌های ژن

Archive of SID
www.SID.ir

DRD3 جدید در افراد دیابتی به پایگاه اطلاعاتی داده NCBI ارائه و شماره پذیرش (accession number) جداگانه اولیه برای ارائه در مقاله دریافت شد (email مربوط به administer ضمیمه فایل ارائه شده است).



شکل٤: نمایش همردیف سازی و مقایسه نتایج تعیین توالی

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج Real time PCR

نتایج آنالیز داده های Real time PCR توسط نرم افزار Rest 2005RG نشان می‌دهد که تفاوت معنی داری در بیان ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق بین گروه‌های مختلف وجود دارد. در مورد بیان ژن‌های گیرنده‌های DRD2 و DRD3 (البته در نمونه هایی که باند ۱۵۶ جفت بازی را بیان می‌کردند) در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی افراد دیابتی دارای زخم پا در مقایسه با افراد غیر مبتلا کاهش چشمگیری مشاهده شد (جدول۱). همچنین این کاهش معنی دار در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی افراد دیابتی بدون زخم پا با افراد غیرمبتلا نیز مشاهده شد (جدول۱). با این حال تغییرات بیان این گیرنده‌ها در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی افراد دارای زخم پای دیابتی با افراد دیابتی بدون زخم مشاهده نشد.

در مورد تغییرات بیان ژن سایتوکاین TNF-α در این سلول‌ها، باید ذکر شود که کاهش بیان در افراد دارای زخم پای دیابتی در مقایسه با افراد دیابتی بدون زخم و افراد غیر مبتلا مشاهده شد. جالب این‌که چنین کاهش معنی داری در میزان بیان ژن TNF-α در افراد دیابتی در مقایسه با افراد غیر مبتلا وجود نداشت (جدول۱).

جدول ۱: مقایسه نتایج تغییرات بیان ژن‌های DRD2, DRD3 و TNF-α در گروه‌های افراد دارای زخم پای دیابتی، دیابتی بدون زخم و افراد غیر مبتلا به دیابت

Comparison of Gene expression between groups	Rate of changes(×fold)	Standard error	P-value	Changes
DRD2-u/n	1.990^{ns}	±0.11435	0.167	No significant
DRD2-u/i	5.99***	±0.01542	0.001	down
DRD2-n/i	4.044***	±0.01241	0.001	down
DRD3-u/n	0.966ns	±1.1138	0.446	No significant
DRD3-u/i	10.1***	±0.00108	0.001	down
DRD3-n/i	10.950***	±0.05064	0.001	down
TNF-α-u/n	1.009*	±0.23697	0.023	down
TNF-α-u/i	2.765**	±0.07073	0.006	down
TNF-α-n/i	1.813^{ns}	±0.17312	0.119	No significant

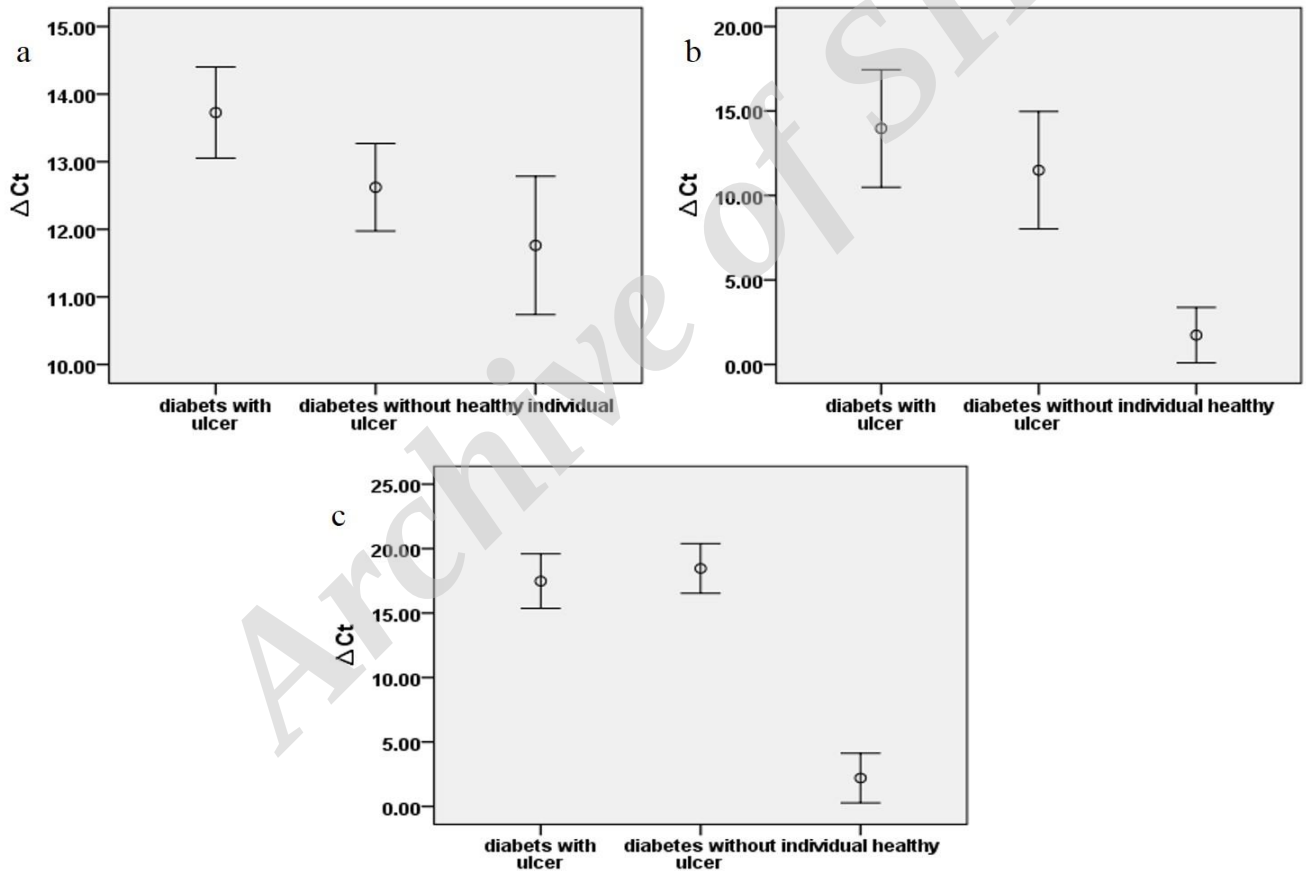
U; diabetes with ulcer, n; diabetes without ulcer, i; healthy individual. ***; significant at p-value≤0.001
**; significant at p-value≤0.01, *; significant at p-value≤0.05, ^{ns}; no significant

آنالیز نتایج real time PCR با روش ΔΔCt نیز موید روند کاهشی بیان این ژن‌ها در گروه‌های افراد غیر مبتلا، افراد دارای زخم پای دیابتی و افراد دیابتی بدون زخم پا می‌باشد. آنالیز درون گروهی ΔCt هر سه ژن در

Archive of SID
www.SID.ir

هر سه گروه توسط تست anova انجام شد، که به دنبال آن آنالیز واریانس، این روند کاهشی برای ژن‌های DRD2 و DRD3 با P-value<0.001 را تایید کرد. با این حال نتایج post hoc تست، تنها کاهش معنی دار بیان این گیرنده‌ها را در مقایسه با افراد غیرمبتلا تایید می‌کند (شکل ۵).

در مورد تغییرات بیان ژن TNF-α لازم است ذکر شود، که نتایج این آنالیزها چنین کاهش معنی دار را با P-value<0.022 تایید می‌کند. اما آنالیز Bonferroni برای این نمونه‌ها تنها بیانگر کاهش معنی دار میزان بیان این ژن در افراد دارای زخم پای دیابتی در مقایسه با افراد غیرمبتلا تایید می‌کند (شکل ۵).



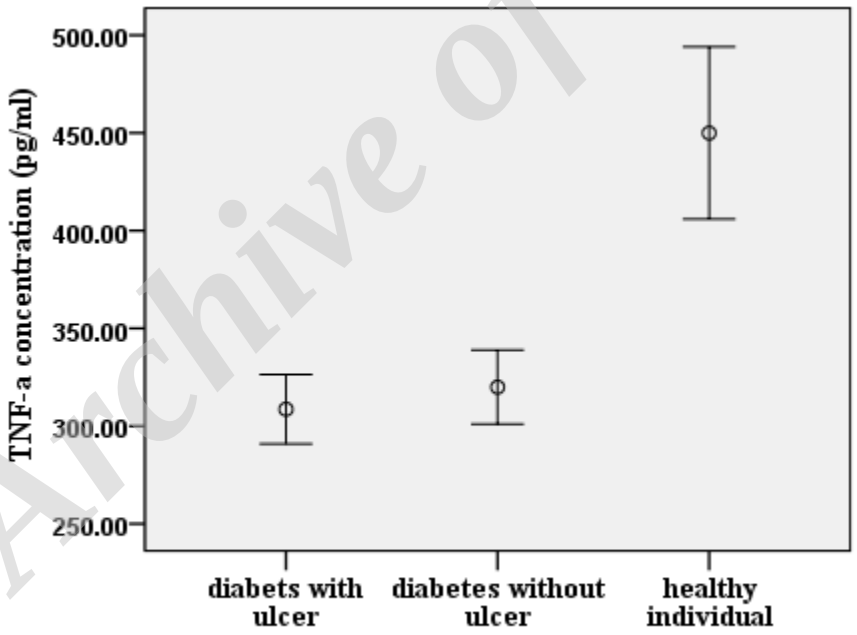
شکل٤: نمایش مقایسه میانگین ΔCt ژن‌های TNF-α، DRD2 و DRD3 د رسه گروه افراد دارای زخم پای دیابتی، دیابتی بدون زخم و افراد غیر مبتلا به دیابت a: مقایسه میانگین ΔCt ژن TNF-α در هر سه گروه b: مقایسه میانگین ΔCt ژنDRD2 و c: مقایسه میانگین ΔCt ژنDRD3

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج مربوط به آنالیز داده‌های الایزا

نتایج مربوط به آنالیز داده‌های الایزا در ارتباط با میزان غلظت سرمی TNF-α نمایانگر روند کاهشی آن در گروه‌های افراد دیابتی و دارای زخم پای دیابتی در مقایسه با افراد غیرمبتلا به دیابت می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهد که غلظت TNF-α در افراد دارای زخم پای دیابتی و افراد دیابتی به ترتیب ۲۶ و ۲۴ درصد در مقایسه با افراد سالم کاهش رخ داده است. نتایج آنالیز مربوط به تست anova که به دنبال آن نتایج آنالیز واریانس با متد Bonferroni دنبال شد، نشان داد که علی رغم روند کاهشی غلظت TNF-α در گروه‌های افراد دیابتی دارای زخم پا و بدون زخم و گروه افراد سالم، این تغییرات در دو گروه دیابتی نسبت به همدیگر تغییر معنی داری نداشته است (شکل۵).



شکل ۵: نمایش غلظت سرمی TNF-α در افراد دارای زخم پای دیابتی، دیابتی و افراد سالم. محورX نمایشگر گروه‌ها و محور Y نمایشگرغلظت سرمی TNF-α برحسب (pg/ml).

Archive of SID
www.SID.ir

آنالیز آماری داده‌ها

آنالیز آماری داده‌ها وجود یک ارتباط معنی دار بین کاهش میزان TNF-α و بیان ژن DRD3 را (r=0.491, p-value≤ 0.003) نشان می‌دهد. همچنین وجود چنین ارتباط معنی داری را بین کاهش میزان TNF-α و بیان ژن DRD2 (r=0.393, p-value≤ 0.038)، همچنین بین بیان گیرنده‌های دوپامین با یکدیگر نیز نشان می‌دهد (r=0.886, p-value≤ 0.001). شایان ذکر است که تغییرات معنی داری بین بیان TNF-α در بیماران دارای زخم پای دیابتی رونوشت جدید ژن DRD3 با میزان بیان آن در سایر بیماران دارای رونوشت معمول این ژن وجود ندارد (p-value=0.384). همچنین این موضوع در مورد افراد دیابتی نیز صادق می‌باشد (p-value=0.458). به دلیل وجود ارتباط معکوس بین میزان ΔCt و میزان بیان ژن (ΔCt بالاتر نمایانگر بیان پایین تر)، یک رابطه معکوس بین غلظت سرمی TNF-α و بیان DRD3 (r=-0.725, p-value< 0.001) مشاهده شده است (جدول۲). همچنین T-test نمایانگر کاهش غلظت سرمی TNF-α در افراد دارای رونوشت جدید ژن DRD3 بود. غلظت سرمی TNF-α و میزان رونوشت آن در افراد دارای زخم پای دیابتی دارای رونوشت جدید ژن DRD3 در مقایسه با افراد عادی کاهش معنی داری داشت (p-value< 0.004 وp-value< 0.005) (جدول۲). چنین نتیجه‌ای در افراد دیابتی دارای رونوشت‌های جدید ژن DRD3 در مقایسه با افراد سالم نیز دیده شد (p-value< 0.009 و p-value< 0.028) (جدول۲).

باید ذکر شود که هیچ ارتباط معنی‌داری بین غلظت سرمی و بیان TNF-α و سن بیماران وجود ندارد. به علاوه هیچ ارتباطی بین جنسیت بیماران با تغییرات بیان هیچ کدام از ژن‌ها و غلظت سرمی TNF-α وجود ندارد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۲: ارتباط بین بیان گیرنده‌های دوپامین (ΔCt) با بیان TNF-α (ΔCt) و غلظت سرمی TNF-α (pg/ml) و سن (در مورد گیرنده DRD3 فقط بیمارانی که دارای توالی معمول هستند)

	n	r	p-value
TNF-α (ΔCt)			
DRD2	58	0.393*	0.038
DRD3	56	0.491**	0.003
TNF-α concentration(pg/ml)			
DRD2	56	-0.336ns	0.08
DRD3	57	-0. 465**	0.01
age			
DRD2	36	-0.199 ns	0.330
DRD3	39	0.469 ns	0.177

***; Correlation is significant at p-value≤ 0.001, **; Correlation is significant at p-value≤ 0.01, *; Correlation is significant at p-value≤ 0.05, ns; no significant

Archive of SID

www.SID.ir

فصل ششم
بحث ونتیجه‌گیری

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

با توجه به تئوری مطرح شده تغییرات معنی داری در غلظت سرمی TNF-α افراد دیابتی با و بدون زخم پای دیابتی در مقایسه با افراد بیمار وجود دارد. همچنین تغییرات قابل توجهی در بیان گیرنده‌های دوپامین (DRD2 وDRD3) سلول‌های خون محیطی در هر دو گروه افراد دیابتی دیده شد. علاوه براین وجود دو رونوشت جدید و متفاوت از ژن DRD3 در مقایسه با افراد سالم دیده شد. مطالعات پیشین نشان دادند که دو گیرنده انتخاب شده در مطالعه حاضر مربوط به دوپامین، توان تحریک ترشح سایتوکاین پیش التهابی به خصوص TNF-α را دارند.

در حالی که بیشتر مطالعات بیانگر افزایش غلظت سرمی TNF-α در افراد دیابتی و تاثیر مخرب آن بر ترمیم و بهبود زخم پای دیابتی هستند، نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر نمایانگر یک روند کاهشی در غلظت TNF-α مربوط به افراد دیابتی و دارای زخم پای دیابتی که طول مدت بیماری آن‌ها بیش از ۱۰ سال بوده و اکثرا دارای سن بالای ۵۰ سال بودند در مقایسه با افراد غیرمبتلا است [۶, ۷, ۲۷, ۲۸]. از جمله مطالعات پیشین مطالعه Siqueira و همکارانش بود که در سال ۲۰۱۰ نشان دادند برهم خوردن غلظت TNF-α می‌تواند در روند بهبود زخم پای دیابتی باعث افزایش تکثیر سلول‌های فیبروبلاست و کاهش نرخ آپوپتوزیس در موش‌های مدل دیابتی تیپ II شود [۵]. همچنین استفاده از آنتی بادی‌های ضد TNF-α در موش‌های دیابتی باعث بهبود روند درمان و تسریع آن می‌شود [۷, ۲۷]. همچنین مشاهده شده است که ارتباط قوی بین غلظت سرمی TNF-α و غلظت پروانسولین که در روند التهابی دیواره عروق از طریق القا بیان مولکول‌های چسبندگی بین سلولی (ICAM-1) و مولکول چسبندگی عروقی (VCAM-1) برروی سلول‌های اندوتلیال و همچنین با خاصیت کموتاکسی باعث جلب منوسیت‌ها می‌شود، وجود دارد [۲۷, ۲۹]. به هر حال شواهدی وجود دارد که دزهای افزایش یافته TNF-α باعث القای آپوپتوزیس در in vitro می‌شود [۵, ۲۳, ۲۴]. تا جایی که می‌دانیم هیچ مطالعه‌ای مبنی براینکه نشان‌دهنده افزایش غلظت سرمی فاکتورهای پیش التهابی و افزایش موضعی آن در محل زخم در افراد مبتلا به زخم پای دیابتی در مقایسه با غلظت سرمی آن در افراد غیرمبتلا وجود ندارد [۳۰].

Archive of SID

www.SID.ir

برعکس مطالعاتی که نشان دهنده افزایش میزان TNF-α در بیماران دیابتی را نشان می‌داد [۵, ۲۳, ۲۴]، نتایج مطالعه حاضر روند کاهشی میزان TNF-α (یعنی مهمترین فاکتور پیش التهابی) را در بیماران مبتلا به زخم پای دیابتی در مقایسه با افراد دیابتی و افراد غیرمبتلا نشان می‌دهد. جالب توجه اینکه سطح TNF-α در هر دو گروه دیابتی کمتر از افراد غیر مبتلا می‌باشد. دلیل این اختلاف در نتایج این مطالعه با مطالعات پیشین می تواند به این دلیل باشد که در اکثر مطالعات پیشین در گروه‌های مختلف افراد دیابتی و بدون حضور گروهی از افراد غیرمبتلا انجام شده و مطالعه بین گروه‌های مختلف افراد دیابتی انجام شده است [۷, ۲۷]. برای مثال، در این مطالعات ارتباط مسئله‌ی مقاومت انسولین، حساسیت به گلوکز، شرایط بدنی (چاقی)،فاکتورهای فیزیولوژیک و غیره با TNF-α در افراد دیابتی مورد ارزیابی قرار گرفته است [۷, ۲۷, ۲۸, ۳۱].

Hancock و همکارانش نشان دادند که تجویز انسولین می‌تواند باعث پیشرفت دیابت در موش‌های NOD از طریق ایجاد اختلال در سیستم ایمنی می‌شود و می‌تواند بالانس الگوی سایتوکاین‌های جمعیت سلولهای T را از سایتوکاین‌های Th1 به سایتوکاین‌های Th2 یعنی افزایش IL-4، IL-10 و TGF-β، باعث کاهش TNF-α، IL-2 و IFN-γ می‌شوند [۳۲]. TNF-α نقش مهمی در تقویت روند ترمیم زخم ایفا می‌کند و غلظت آن به صورت دوره‌ای در روند ترمیم زخم افراد سالم افزایش یافته و باعث کموتاکسی انواع سلول‌ها از جمله سلول-های ترشح کننده فاکتورهای التهابی می‌شود. بنابراین منطقی به نظر می‌رسد که این خود دلیلی باشد برای وقوع اختلال در کموتاکسی و در نهایت می‌تواند باعث بروز اختلال در روند بهبود زخم در افراد دیابتی شود [۲۱, ۳۳, ۳۴].

از بین سایر فاکتورهایی که می‌توانند باعث القا ترشح انواع سایتوکاین‌ها شوند می‌توان گیرنده‌های دوپامین را نام برد [۲۵]. تغییر در بیان گیرنده‌های دوپامین می‌تواند در روند بیماریزایی انواع مختلفی از بیماری‌ها از طریق ایجاد تغییرات فیزیولوژیک و ایمنولوژیک دخیل باشد [۱۷, ۳۵-۳۷]. به طور اختصاصی می‌توان گفت که دوپامین باعث القای ترشح TNF-α، IL-6 و IL-10 از سلول‌های تک هسته‌ای سیستم ایمنی به خصوص منوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های T می‌شود [۲۵, ۲۶]. نتایج به دست آمده از این مطالعه در این خصوص

Archive of SID

www.SID.ir

نشان می‌دهد که علاوه بر TNF-α گیرنده‌های DRD2 وDRD3 در سلول‌های خون محیطی بیماران دیابتی بیان می‌شود. ولی بیان آنها دارای یک کاهش معنی‌دار در بیماران دیابتی و به خصوص افراد دیابتی دارای زخم پای دیابتی در مقایسه با افراد غیرمبتلا می‌باشند. همچنین نتایج تعیین توالی نشان می‌دهد که ژن DRD3 دارای رونوشت‌های متفاوت از رونوشت‌های معمول این ژن در افراد دیابتی بوده و این تفاوت در ناحیه توالی کدکننده این رونوشت می‌باشد که می‌تواند باعث تولید پروتئینی با ساختارو عملکردی متفاوت شود. بنابراین وجود عملکردی متفاوت در افراد دیابتی که این نوع رونوشت‌ها را از ژن DRD3 بیان می‌کنند دور از انتظار نمی‌باشد. به علاوه یک روند کاهش معنی‌دار در بیان این گیرنده‌ها و بیان TNF-α در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی و کاهش غلظت سرمی TNF-α هر دو گروه افراد دیابتی با زخم پا و بدون زخم پا وجود دارد. از این‌رو می‌توان چنین بیان نمود که کاهش بیان TNF-α و کاهش غلظت سرمی آن در ارتباط و پیوسته با کاهش بیان هر دو گیرنده DRD2 و DRD3 بوده و همچنین این روند کاهشی TNF-α در ارتباط با بیان رونوشت‌های جدید DRD3 باشد. در نهایت با توجه به نقش فاکتورهای پیش التهابی به خصوص TNF-αدر روند ترمیم زخم و ارتباط میزان آن با میزان بیان و تغییرات این گیرنده‌های دوپامینی شاید بتوان چنین نتیجه‌گیری کرد که این گیرنده‌ها می‌توانند در روند بهبود وترمیم زخم از طریق القا سایتوکاین‌های پیش التهابی به خصوص TNF-α نقش آفرین باشند.

درنتیجه با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر و اهمیت و نقش TNF-α در ترمیم زخم از جمله القا مهاجرت سلولهای دخیل در روند ترمیم و پتانسیل گیرنده‌های DRD2 و DRD3 در القای ترشح این سایتوکاین‌ها بعد انجام پاره‌ای از مطالعات تکمیلی شاید بتوان چنین اشاره کرد که تغییرات بیان DRD2، DRD3 و حضوررونوشت‌های جدید DRD3 می‌تواند به عنوان یک عامل موثر در توسعه دیابت و زخم پای دیابتی نام برده شود. همچنین از این فاکتورها به عنوان فاکتورهای پیش آگهی برای افرادی که مستعد به ایجاد زخم پای دیابتی هستند یاد شود.

Archive of SID

www.SID.ir

پیشنهادات

انجام مطالعات بیشتر در خصوص بروز چنین تغییراتی در ارتباط با بررسی غلظت موضعی TNF-α و سایر فاکتورهای پیش التهابی و مهار کننده التهاب در محل زخم در افراد دیابتی دارای زخم پای دیابتی پیشنهاد می‌شود.

همچنین بررسی ارتباط تغییرات بیان این گیرنده‌ها در ارتباط با سایر سایتوکاین‌های التهابی و مهار کننده التهاب نیز پیشنهاد می‌گردد.

انجام مطالعاتی درخصوص تغییرات بیان این گیرنده‌ها در سطح پروتئین به خصوص مطالعه در خصوص تغییرات عملکردی آنها پیشنهاد می‌گردد.

در نهایت انجام مطالعاتی جهت بررسی پتانسیل آگونیست و آنتاگونیست به عنوان عوامل درمانی درراستای درمان زخم پای دیابتی پیشنهاد می‌گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

فصل هفتم

منابع

Archive of SID

www.SID.ir

.۱ Shi, Y. and F.B. Hu, *The global implications of diabetes and cancer.* Lancet (London, England), 2014. **383**(9933): p. 1947.

.۲ Cernea, S. and A. Cahn, *Diabetes mellitus: in search of an improved classification and treatment algorithm.* Revista Romana de Medicina de Laborator, 2016. **24**(1): p. 9-20.

.۳ Kitabchi, A.E., et al., *Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes.* Diabetes care, 2009. **32**(7): p. 1335-1343.

.٤ Xu F, Z.C., Graves DT (2013) Abnormal cell responses and TNF-αin impaired diabetic wound healing. BioMed Research International 754802-754809.

.٥ Siqueira, M.F., et al., *Impaired wound healing in mouse models of diabetes is mediated by TNF-α dysregulation and associated with enhanced activation of forkhead box O1 (FOXO1).* Diabetologia, 201 :(۲)٥٣ .٠p. 378-388.

.٦ Goren, I., et al., *Severely impaired insulin signaling in chronic wounds of diabetic ob/ob mice: a potential role of tumor necrosis factor-α.* The American journal of pathology, 2006. **168**(3): p. 765-777.

.۷ Miyazaki, Y., et al., *Tumor necrosis factor α and insulin resistance in obese type 2 diabetic patients.* International journal of obesity, 2003. **27**(1): p. 88-94.

.۸ Siqueira, M., et al., *Impaired wound healing in mouse models of diabetes is mediated by TNF-α dysregulation and associated with enhanced activation of forkhead box O1 (FOXO1).* Diabetologia, 2010. **53**(2): p. 378-388.

.۹ Zanelli, E., F. Breedveld, and R. De Vries, *HLA association with autoimmune disease: a failure to protect?* Rheumatology, 2000. 3**9**(10): p. 1060-1066.

.۱۰ Beaulieu, J.-M. and R.R. Gainetdinov, *The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors.* Pharmacological reviews, 2011. **63**(1): p. 182-217.

.۱۱ Marques-Deak, A. and E. Sternberg, *Psychoneuroimmunology: the relation between the central nervous system and the immune system.* Revista Brasileira de Psiquiatria, 2004. **26**(3): p. 143-144.

.۱۲ Missale, C., et al., *Dopamine receptors: from structure to function.* Physiological reviews, 1998. **78**(1): p. 189-225.

.۱۳ Gutzkow, K.B., et al., *Cyclic AMP inhibits translation of cyclin D3 in T lymphocytes at the level of elongation by inducing eEF2-phosphorylation.* Cellular signalling, 2003. **15**(9): p. 871-881.

.۱٤ Ahangari, G., et al., *RT-PCR Topography of Chronic Psoriasis Skin Based on Analysis of T-Cell Receptor B Variable Region Gene Usage.* Scandinavian journal of immunology, 1997. **45**(5): p. 534-540.

.۱٥ Shaikhpoor M AG, S.M., *Significant changes in D2-like dopamine gene receptors expression associated with Non- small -cell lung cancer: could it be of potential use in the design of future therapeutic startegies?* . Current cacer therapy reviews. , 2012. **8**(4): p. 304-310.

.۱٦ Kwak YT, K.M.-S., Choi C-H, Sunwoo I., *Change of dopamine receptor mRNA expression in lymphocyte of schizophrenic patients.* . BMC medical genetics, 2001. **2**(1): p. 3.

.۱۷ Jafari, M., et al., *Distorted expression of dopamine receptor genes in systemic lupus erythematosus.* Immunobiology, 2013. **218**(7): p. 979-983.

.۱۸ McKenna F, M.P., Lewis B, Sibbring G, Cummerson J, Bowen-Jones D, et al ,. *Dopamine receptor expression on human T-and B-lymphocytes, monocytes,*

Archive of SID

www.SID.ir

neutrophils, eosinophils and NK cells: a flow cytometric study. Journal of neuroimmunology. , 2002. **132**(1): p. 34-40.

.۱۹ Werner, S. and R. Grose, *Regulation of wound healing by growth factors and cytokines.* Physiological reviews, 2003. **83**(3): p. 835-870.

.۲۰ Barrientos, S., et al., *Growth factors and cytokines in wound healing.* Wound Repair and Regeneration, 2008. **16**(5): p. 585-601.

.۲۱ Eming, S.A., T. Krieg, and J.M. Davidson, *Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms.* Journal of Investigative Dermatology, 2007. **127**(3): p. 514-525.

.۲۲ Corredor, J., et al., *Tumor necrosis factor regulates intestinal epithelial cell migration by receptor-dependent mechanisms.* American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2003. **284**(4): p. C953-C961.

.۲۳ Rückert, R., et al., *High-dose proinflammatory cytokines induce apoptosis of hair bulb keratinocytes in vivo.* British Journal of Dermatology, 2000. **143**(5): p. 1036-1039.

.۲٤ Petrache, I., et al., *Heme oxygenase-1 inhibits TNF-α-induced apoptosis in cultured fibroblasts.* American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2000. **278**(2): p. L312-L319.

.۲٥ Besser, M.J., Y. Ganor, and M. Levite, *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, TNFα or both.* Journal of neuroimmunology, 2005. **169**(1): p. 161-171.

.۲٦ Gaskill, P.J., et al., *Characterization and function of the human macrophage dopaminergic system: implications for CNS disease and drug abuse.* Journal of neuroinflammation, 2012. **9**(1): p. 203.

.۲۷ Lixandru, D., et al., *Changes in the serum proinflammatory cytokines in patients with elevated homa-ir and type 2 diabetes mellitus.* FARMACIA, 2015. **63**(1): p. 132-139.

.۲۸ Löfgren, P., et al., *Secretion of tumor necrosis factor-alpha shows a strong relationship to insulin-stimulated glucose transport in human adipose tissue.* Diabetes, 2000. **49**(5): p. 688-692.

.۲۹ Mohan, V., et al., *Association of C-reactive protein with body fat, diabetes and coronary artery disease in Asian Indians: The Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES-6).* Diabetic medicine, 2005. **22**(7): p. 863-870.

.۳۰ Schram, M.T., 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): p. 2165-2173.

.۳۱ Bertin, E., et al., *Français| Español| Italiano* .Diabetes & metabolism, 2000. **26**: p. 178-182.

.۳۲ Hancock, W.W., et al., *Suppression of insulitis in non-obese diabetic (NOD) mice by oral insulin administration is associated with selective expression of interleukin-4 and-10, transforming growth factor-beta, and prostaglandin-E.* The American journal of pathology, 1995. **147**(5): p. 1193.

.۳۳ Reinke, J. and H. Sorg, *Wound repair and regeneration.* European Surgical Research, 2012. **49**(1): p. 35-43.

.۳٤ Coley, J.S., et al., *Dopamine increases CD14+ CD16+ monocyte migration and adhesion in the context of substance abuse and HIV neuropathogenesis.* PloS one, 2015. **10**(2): p. e0117450.

Archive of SID

www.SID.ir

.۳۵ Pornour, M., et al., *New perspective therapy of breast cancer based on selective dopamine receptor D2 agonist and antagonist effects on MCF-7 cell line.* Recent patents on anti-cancer drug discovery, 2015. **10**(2): p. 214-223.

.۳۶ Pornour, M., et al., *Dopamine receptor gene (DRD1-DRD5) expression changes as stress factors associated with breast cancer.* Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP, 2013. **15**(23): p. 10339-10343.

.۳۷ Sheikhpour, M., et al., *A novel report of apoptosis in human lung carcinoma cells using selective agonist of D2-like dopamine receptors: a new approach for the treatment of human non-small cell lung cancer.* International journal of immunopathology and pharmacology, 2013. **26**(2): p. 393-402.

Archive of SID

www.SID.ir

Abstract

TNF-α alteration in plasma associated to DRD2 and DRD3 changes in PBMCs of diabetes ulcer was evaluated in current study.

Expression changes of DRD2, DRD3 and TNF-α were evaluated by real time PCR and TNF-α plasma concentration variations were investigated.

There were observed significant descending in plasma concentration of TNF-α and its gene expression in PBMCs of both diabetes groups in compare with healthy individuals. These descending are correlated to both DRD2 and DRD3 expression decreasing in PBMCs of both diabetes groups. Also, the same relationship are between expressions of two new DRD3 transcripts with TNF-α descending.

In conclusion**,** DRD2 and DRD3 expression changes or presence of new DRD3 transcripts can be effective in decreasing of TNF-α concentration and cause to healing defect in diabetes foot ulcer. So, DRD2 and DRD3 variations may be prognostic and effective markers attributed to the development of diabetes ulcer.

Key words: diabetes ulcer, dopamine receptors, gene expression, tumor necrosis factor-α

Archive of SID

www.SID.ir

Final report of project

Comparison of dopamine receptors D2, D3 and TNF-α gene expression changes in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of diabetic patients with and without chronic foot ulcers in comparison with healthy individuals

Regeneration Research group

Tehran medical science branch of ACECR

By:

Dr. Majid Pornour

Dr. Gholamreza esmaile javid

Dr. Shahla Mohammad Ganji

Dr. hossein Bakhtu

Hajar vaseghi

Maryam Jahanshiri Moghadam

2013

Archive of SID

www.SID.ir