IranJPP
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران

سال ۱۴۰۲، دوره ۷، پیاپی ۱۷ صفحه ۱۸۶-۱۷۸

مقاله پژوهشی

دوپامین تکثیر تاکی‌زوایت‌های توکسوپلاسما را به‌واسطه تحریک رسپتورهای دوپامینی شبه D1 تسهیل می‌کند

ستایش یاسمی‌خیابانی، مریم مصطفوی، جلال بابایی*، مجید گل‌کار

گروه انگل‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

دریافت: ۲ آذر ۱۴۰۲ پذیرش: ۲ دی ۱۴۰۲

چکیده

زمینه و هدف: *توکسوپلاسما گوندی* یک انگل درون‌سلولی اجباری است. توکسوپلاسما منجر به افزایش میزان دوپامین در مغز میزبان می‌شود. این احتمال وجود دارد که دوپامین در تکثیر توکسوپلاسما نقش داشته باشد. در این مطالعه، اثر دوپامین بر تکثیر تاکی‌زوایت‌های توکسوپلاسما در سلول‌های HFF-1 مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: سلول‌های HFF-1 کشت شده و با دوپامین ۵۰۰ نانومولار تیمار شدند. به چاهک‌های حاوی سلول $۱۰^{۵}$ × ۴ تاکی‌زوایت اضافه شد. جهت بررسی نقش گیرنده‌ها، ابتدا سلول‌ها با دوپامین تیمار شدند. آنتاگونیست‌های گیرنده‌های دوپامینی D1 و D2 (به ترتیب SCH-23390 و سولپیراید)، به‌تنهایی و در ترکیب با هم با غلظت ۱۰ نانومولار به محیط کشت اضافه شدند. سلول‌های تیمار شده با تاکی‌زوایت آلوده شدند. میزان تاکی‌زوایت‌ها با شمارش میکروسکوپ و به روش RT-qPCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: دوپامین به‌طور معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) تکثیر تاکی‌زوایت‌ها در سلول‌های HFF-1 را افزایش داد. تیمار سلول‌ها با SCH-23390 توانست به‌طور معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) اثر دوپامین را خنثی کند، درحالی‌که سولپیراید نتوانست از این اثر دوپامین جلوگیری کند. علاوه‌براین، ترکیب دو آنتاگونیست، SCH-23390 و سولپیراید، بطور معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) تکثیر تاکی‌زوایت‌ها در سلول‌های HFF-1 را کاهش داد.

نتیجه‌گیری: مطالعه ما نشان داد که دوپامین تکثیر تاکی‌زوایت‌ها را در رده سلولی HFF-1 تحریک می‌کند. علاوه بر این، دوپامین اثر خود بر تکثیر انگل را ازطریق گیرنده‌های D1 اعمال می‌کند. این نتایج می‌تواند به طراحی و توسعه داروهای موثر علیه توکسوپلاسما کمک کند.

واژه‌های کلیدی: آنتاگونیست، *توکسوپلاسما گوندی* ، دوپامین، HFF-1

مقدمه

توکسوپلاسما گوندی انگل درون‌سلولی اجباری است که قابلیت ایجاد عفونت در تمام حیوانات خونگرم را دارد. مشخصه عفونت حاد حضور تاکی‌زوایت‌های سریع تکثیر شونده در بافت‌های بدن می باشد. حدود دو هفته بعد از شروع عفونت، تحت فشار سیستم ایمنی، تاکی‌زوایت‌ها به برادی‌زوایت‌ها تمایز می‌یابند که خیلی آهسته‌تر تکثیر می‌شوند و در بافت‌های تحریک‌پذیری مثل عضلات مخطط، قلب و به خصوص سیستم عصبی مرکزی کیست تشکیل می‌دهند. کیست‌های بافتی *توکسوپلاسما گوندی* اغلب در سیستم عصبی مرکزی انسان به صورت نهفته تا آخر عمر باقی می‌مانند [۲، ۱]. در افراد دارای نقص ایمنی، فعال‌شدن مجدد کیست‌ها می‌تواند منجر به انسفالیت یا دیگر عوارض کشنده شود. تخمین زده می‌شود که ۳۰ درصد جمعیت جهان سابقه توکسوپلاسموز داشته باشند [۴، ۳].

تحقیقات اخیر نشان داده است که نظرات گذشته درمورد غیرفعال‌بودن کیست‌های انگل درست نیست. در واقع، روش‌های تصویربرداری میکروسکوپی پیشرفته نشان داده است که برادی‌زوایت‌ها دست کم تا ۸ هفته پس از عفونت در داخل کیست‌های مغزی موش تکثیر می‌شوند [۵]. مطالعات متعددی نشان داده اند که توکسوپلاسموز باعث تغییرات رفتاری از جمله:

* نویسنده مسئول مکاتبات: jalalbabaie@gmail.com (ORCID ID: 0000-0002-4989-5998)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2024-07-16]

خطرپذیری، افزایش میزان فعالیت و کاهش قدرت حافظه در حیوانات می‌شود [۹-۶]. به‌خوبی مشخص شده است که سیگنالینگ دوپامین در حین عفونت *توکسوپلاسما* زیاد می‌شود. در اولین مطالعات مربوط به تاثیر عفونت بر عملکرد نورون‌ها نشان داده شد که در فاز مزمن عفونت، میزان دوپامین ۱۴ درصد بیشتر از موش‌های غیر آلوده است [۱۰]. مطالعه پراندوسکی[1] و همکاران نشان داد که توکسوپلاسما منجر به افزایش معنی‌دار در متابولیسم دوپامین سلول‌های عصبی می‌گردد [۱۱]. *توکسوپلاسما* دو آنزیم هیدروکسیلاز اسید آمینه آروماتیک[2] دارد [۱۲]. این آنزیم ها تبدیل تیروزین به پیش ساز دوپامین، یعنی ال-دوپا[3] را کاتالیز می‌کنند.

سلول‌های فیبروبلاستی انسان به‌عنوان یک مدل کشت سلولی مناسب برای تکثیر فرم‌های مختلف انگل از جمله تاکی‌زوایت در نظر گرفته می‌شوند. این احتمال وجود دارد که دوپامین در تکثیر توکسوپلاسما نقش داشته باشد. ازاین‌رو در تنها مطالعه انجام شده نقش دوپامین در تکثیر تاکی‌زوایت مورد ارزیابی قرار گرفت و با آنتاگونیزه‌کردن[4] جداگانه گیرنده‌های دوپامینی اینطور نتیجه‌گیری شد که دوپامین منجر به تسهیل آلودگی سلول فیبروبلاست ختنه‌گاه انسان (HFF-1)[5] به توکسوپلاسما می‌شود. همچنین نتیجه‌گیری شد که اثر دوپامین در تسهیل عفونت توکسوپلاسما به واسطه رسپتورهای دوپامینی نیست [۱۳]. ولی ایرادی که به این مقاله وارد است این است که این امکان وجود دارد که دوپامین از طریق هر دو رسپتورهای D1 و D2 اثر خود را در این مدل اعمال کند و آنتاگونیزه‌کردن جداگانه D1 و یا D2 منجر به مسدود شدن کامل اثر دوپامین در افزایش تکثیر انگل نشود. با این فرض، نقش دوپامین و گیرنده‌ها در تکثیر تاکی‌زوایت‌های توکسوپلاسما در این مطالعه مورد ارزیابی مجدد قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد و داروها

محیط کشت کامل DMEM[6]، FBS[7] و محلول تریپسین ۰/۲۵ درصد حاوی EDTA[8] ۰/۰۳ درصد (ایده‌زیست نوترکیب، ایران) به‌صورت آماده خریداری شدند. دوپامین-هیدروکلراید[9] (داروسازی کاسپین، ایران) به‌صورت تازه در محیط کشت DMEM-10 تهیه شده و به محیط اضافه شد. باتوجه‌به نتایج مطالعات اولیه(داده‌ها ارائه نشده است) برای بررسی تاثیر دوپامین در سلول‌های HFF-1 از غلظت ۵۰۰ نانومولار استفاده شد. سولپیراید[10] (سیگما) ابتدا به‌صورت محلول استوک در اسید استیک تهیه شده و در محیط کشت رقیق شد [۱۳] و SCH-23390[11] (سیگما) در محیط کشت حل شد [۱۶-۱۴]. SCH-23390 و سولپیراید با غلظت نهایی ۱۰ نانومولار استفاده شدند.

تهیه تاکی‌زوایت

مایع صفاقی حاوی تاکی‌زوایت‌های سوش RH[12] *توکسوپلاسما گوندی* از بخش انگل‌شناسی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سویه RH که در موش‌ها به‌شدت کشنده می‌باشد به دودمان تیپI[13] انگل تعلق دارد. برای خالص‌سازی تاکی‌زوایت‌ها از هر دو روش تهیه از موش آلوده و کشت آزمایشگاهی استفاده می‌شود [۱۷]. به‌طورخلاصه، ۲۵ میلی‌لیتر محلول (۴۵ درصد V/V) پرکول با استفاده از بافر نمکی فسفات (PBS)[14] درست شد. ۵ میلی‌لیتر مایع صفاقی در لوله‌های سانتریفیوژ ۵۰ میلی‌لیتری به‌دقت روی محلول پرکول قرار داده شده و در دور ۴۵۰ فورس جی به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب در ۵ میلی‌لیتر PBS معلق شده و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در انتها، رسوبق حاصل در ۵ میلی‌لیتر FBS پخش شد. تعداد تاکی‌زوایت با استفاده از لام نئوبار و بااستفاده‌از عدسی شیئی ۴۰ برابر میکروسکوپ نوری شمارش شده و در نهایت به آن ۷ درصد از DMSO اضافه شده و در ۸۰- سانتی گراد نگهداری شد.

کشت سلول‌های HFF-1

استوک سلول HFF-1 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. HFF-1 با محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS به یک فلاسک T25 منتقل شد و پس از رسیدن به تراکم به یک فلاسک T75 منتقل شد.

[1] Prandovszky
[2] *T. gondii* aromatic amino acid hydroxylase
[3] L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)
[4] Antagonize
[5] Human foreskin fibroblasts
[6] Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
[7] Fetal bovine serum
[8] Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
[9] Dopamine hydrochloride
[10] (-) sulpiride
[11] R(+)-SCH-23390 hydrochloride
[12] RH strain
[13] Lineage type I
[14] Phosphate-buffered saline (PBS)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2024-07-16]

بررسی اثر سمی داروها روی سلول‌های HFF-1

سلول HFF-1 در پلیت ۲۴ خانه حاوی DMEM-10، دارای پن–استرپ[15] کشت شد تا به تراکم حدود ۹۰ درصد برسد. برای‌این‌منظور، ۴۰ هزار سلول HFF-1 به هر چاهک پلیت اضافه شده و به مدت ۳ روز در انکوباتور دی‌اکسیدکربن (۵ درصد) قرار داده شد. در روز سوم تاکی‌زوایت سوش RH از فریزر ۸۰– درجه خارج شده و پس از شستشو، به نسبت‌های ۱، ۲، ۵ و ۱۰ برابری (نسبت به تعداد سلول) اضافه شد. طی ۷ تا ۸ روز بعدی هر روز سلول‌ها در زیر میکروسکوپ اینورت مورد بررسی قرار گرفتند. برای بررسی مولکولی، به‌صورت یک روز در میان ۳ چاهک کنار هم به روش خراشیدن جمع‌آوری شده و در دمای ۸۰– سانتی گراد نگهداری شد.

بررسی تاثیر داروهای مختلف مورد مطالعه بر رشد سلول‌ها

جهت ارزیابی اثر سمی احتمالی دوپامین، SCH-23390 و سولپیراید روی سلول‌های HFF-1، تست بیواسی با استفاده از روش ام‌تی‌تی[16] انجام پذیرفت. روش رنگ سنجی ام‌تی‌تی به‌عنوان شاخصی از عملکرد میتوکندری در سلول‌های زنده استفاده می‌شود [۱۸]. برای‌این‌منظور، ۳۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه در محیط کشت DMED-10 کشت داده شد و برای سه روز در انکوباتور انکوبه شد. روز سوم محیط کشت رویی خارج شده و محیط کشت جدید حاوی غلظت‌های ۱ تا ۱۰۰۰۰۰ نانومولار (۱۰ برابری) از هر دارو اضافه شد. برای هر غلظت از داروها ۳ تکرار در نظر گرفته شد. بعد از گذشت سه روز آزمایش ام‌تی‌تی روی پلیت انجام گرفت. به‌طورخلاصه، محیط آسپیره شد و با ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ام‌تی‌تی جایگزین شده و به‌مدت ۴ ساعت در انکوباتور دی‌اکسیدکربن (۵ درصد) قرار داده شد. محیط حاوی ام‌تی‌تی خارج شده و ۲۰۰ میکرولیتر DMSO در هر چاهک اضافه شد. جذب نوری پلیت در ۵۷۰ نانومتر بوسیله ریدر (بیوتک[17]) اندازه‌گیری شد. درانتها میزان جذب نوری در چاهک‌های حاوی ماده مورد آزمایش با چاهک‌های حاوی سلول‌های کنترل مقایسه شد.

بررسی نقش دوپامین در آلوده‌شدن HFF-1 با تاکی‌زوایت

برای‌این‌منظور پلیت کشت ۲۴–خانه با تک‌لایه سلولی HFF-1 متراکم شد. برای تیمار سلول با دوپامین ابتدا محیط کشت از چاهک‌ها خارج شده و دوپامین به‌صورت تازه با غلظت ۵۰۰ نانومولار در DMEM-10 تهیه شده و به چاهک‌ها اضافه شد. بعد از مرحله تیمار، یک میلیون تاکی‌زوایت تازه تهیه شده در محیط کشت DMEM-10 به هر چاهک اضافه شده و برای ۲ ساعت در انکوباتور دی‌اکسیدکربن برای ورود تاکی‌زوایت‌ها انکوبه شد. در مرحله بعد همه محیط رویی خارج شد تا تاکی‌زوایت‌های وارد نشده به همراه باقی مانده دوپامین از محیط خارج شود. محیط تازه DMEM-10 اضافه شده و ۳ روز پس از تیمار سلول‌ها از کف پلیت جدا شدند. برای شمارش تاکی‌زوایت‌ها در میکروسکوپ نوری، نمونه‌های ۱۰۰ میکرولیتری از هر سوسپانسیون برداشت شد و مابقی بعد از رسوب‌دهی برای بررسی مولکولی (RT-qPCR[18]) در دمای ۸۰– درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بررسی نقش گیرنده‌های دوپامینی در تسریع آلودگی القاشده با دوپامین

پلیت کشت ۲۴–خانه با تک لایه سلولی HFF-1 متراکم شد. برای تیمار سلول ها با دوپامین ابتدا محیط کشت از چاهک‌ها خارج شده و دوپامین بصورت تازه با غلظت ۵۰۰ نانومولار در DMEM-10 تهیه شده و به چاهک‌ها اضافه شد. بعد از مدت ۱۵ دقیقه، هر یک از داروهای SCH-23390، سولپیراید و ترکیب آن‌ها به محیط کشت اضافه شد. باتوجه‌به نتایج مطالعات اولیه (داده‌ها ارائه نشده است)، سلول‌ها با غلظت نهایی ۱۰ نانومولار داروها تیمار شدند. در کنار هر دارو کنترل حلال نیز درنظر گرفته شد. همچنین کوتریماکسازول (یکی از لاین‌های دارویی درمانی ضدتوکسوپلاسما) هم به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. تیمار با آنتاگونیست‌ها به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. بعد از تیمار با آنتاگونیست‌ها، یک میلیون تاکی‌زوایت به هر چاهک اضافه شد. پلیت کشت برای ۲ ساعت در انکوباتور دی‌اکسیدکربن برای ورود انگل‌ها انکوبه شد. در مرحله بعد، همه

[15] Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep)
[16] 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)
[17] BioTek
[18] Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2024-07-16]

محیط رویی خارج شد و محیط تازه DMEM-10 اضافه شد تا تاکی‌زوایت‌های وارد نشده به همراه باقی مانده داروها از محیط خارج شود. سه روز پس از تیمار، سلول‌ها از کف پلیت جدا شده و برای بررسی مولکولی (RT-qPCR) در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تایید آلودگی با تاکی‌زوایت و بررسی شدت آلودگی

برای تایید آلودگی با انگل و همچنین بررسی شدت آلودگی از روش RT-qPCR استفاده شد. برای‌این‌منظور، نمونه‌ها از فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد خارج شده و بعد از هموژن‌شدن، تخلیص DNA ژنومی با استفاده از کیت (فیورژن[19]) انجام شد. تعیین غلظت نمونه DNA های خالص شده با ریدر (سینرژی، بیوتک[20]) و پلیت Take3 (بیوتک) انجام گرفت. DNA توتال جهت بررسی وجود عفونت و شدت آن در روش RT-qPCR استفاده شد. در این روش از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) توالی تکراری ژنوم توکسوپلاسما (REP-529) استفاده شد [۲]. به‌طورخلاصه، برای تهیه واکنش ۲۵ میکرولیتری: ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط اصلی آمپلیکون (RealQ Plus 2x Master Mix)، ۱ میکرولیتر (۰/۴ میکرومول) از هر پرایمر پیشرو و معکوس، و همچنین ۰/۳ میکرولیتر (۰/۱۲ میکرومول) پروب (جدول ۱) به همراه ۱ میکرولیتر DNA ژنومی (۲۰ نانوگرم) اضافه شد. در تیوپ‌های استاندارد به جای DNA ژنومی، پلاسمید حاوی توالی REP-529 با رقت‌های ۱×۱۰^{۲}، ۱×۱۰^{۳}، ۱×۱۰^{۵} و ۱×۱۰^{۷} اضافه گردید. برای انجام واکنش آنزیمی PCR از دستگاه ترموسایکلر[21] استفاده شد.

جهت واکنش آنزیمی RT-qPCR، سیکل ابتدایی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. سپس ۴۰ سیکل دو مرحله‌ای در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب به مدت ۱۰ و ۳۰ ثانیه برای تکثیر و گزارش فلورسنس واکنش اعمال شد. برای رسم منحنی استاندارد و تعیین دقیق مقادیر توالی REP-529 از نرم افزار ترموسایکلر (استپ وان[22]) استفاده شد.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در RT-qPCR

نام پرایمر (REP-529)	توالی
پیشرو	5'- CTCGCCTTCATCTACAGTCCTG-3'
معکوس	5'- GAGCCACAGAAGGGACAGAAG-3'
پروب	5'-ROX-GATGCCGCTCCTCCAGCCGTCT-BHQ2-3'

[19] FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit
[20] Synerg, BioTek

آنالیز آماری

تفاوت در میزان رشد انگلی با استفاده از آزمون 2-tailed (Unpaired Student t test) مقایسه شد. در تمامی آزمون‌ها مقدار $p < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار درنظر گرفته شد. درصورت استفاده از ترکیب داروها، برای تجزیه و تحلیل آماری، از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون تکمیلی توکی برای شناسایی سطح اثر متقابل داروها استفاده شد.

یافته‌ها

دوره زمانی عفونت سلول‌های HFF-1 با تاکی‌زوایت

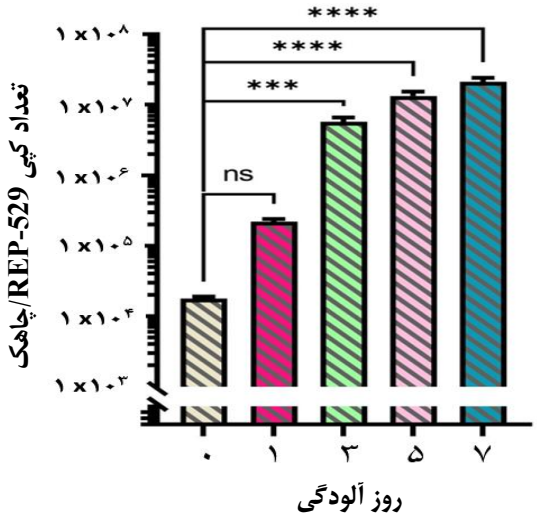
نتایج آلوده‌سازی با تاکی‌زوایت نشان داد که در نسبت‌های ۱، ۲ و ۵ (انگل به سلول) قبل از آنکه تاکی‌زوایت‌ها عمده سلول‌ها را آلوده کنند سلول‌ها وارد فاز مرگ‌ومیر شده و از بین می‌روند. از این رو نسبت ۱۰ برابری تاکی‌زوایت به سلول در همه مراحل بعدی مطالعات برای آلوده‌سازی سلول‌ها انتخاب شد (داده‌ها ارائه نشده است). بررسی روند آلودگی در HFF-1 نشان داد که از روز سوم تا هفت روز بعد از شروع عفونت، تکثیر تاکی‌زوایت به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۰۱$) نسبت به روز اول افزایش پیدا می‌کند (نمودار ۱). با نگاه کلی به نمودار رشد سلولی در دوره رشد یک هفته‌ای تفاوت چشم‌گیر در میزان رشد تاکی‌زوایت‌ها در رده سلولی HFF-1 مشاهده می‌شود.

داروهای مورد مطالعه در غلظت‌های بالا تاثیر منفی در رشد سلول HFF-1 دارند.

نتایج نشان داد که دوپامین (آگونیست گیرنده‌های دوپامین) و سولپیراید (آنتاگونیست انتخابی گیرنده‌های D2 دوپامین) حتی در غلظت‌های خیلی بالا تاثیر معنی‌داری ($p > ۰/۰۵$) در رشد و

[21] StepOnePlus™ Real-Time PCR System
[22] StepOne v2.3

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2024-07-16]



نمودار ۱– دوره زمانی عفونت سلول‌های HFF-1 با تاکی‌زوایت‌های سویه RH. نمودارها میانگین ± SEM را نشان می‌دهند. (ANOVA یک‌طرفه، تست Tukey) ns: معنی‌دار نیست، ***: $p < ۰/۰۰۱$ و ****: $p < ۰/۰۰۰۱$

تکثیر رده سلولی HFF-1 ندارند (نمودار ۲). با این حال *SCH-23390* (آنتاگونیست انتخابی گیرنده‌های *D1* دوپامین) در غلظت بالاتر از ۱۰۰۰ نانومولار به‌طور معنی‌داری اثرات سمی داشته و منجر به کاهش رشد سلول می‌شود (نمودار ۲). با توجه به نتایج فوق تصمیم گرفته شد دوپامین در تمامی آزمایشات با غلظت ۵۰۰ نانومولار و سایر داروها با غلظت ۱۰ نانومولار استفاده شود.

دوپامین در سلول‌های HFF-1 منجر به تسهیل عفونت به تاکی زوایت می‌شود.

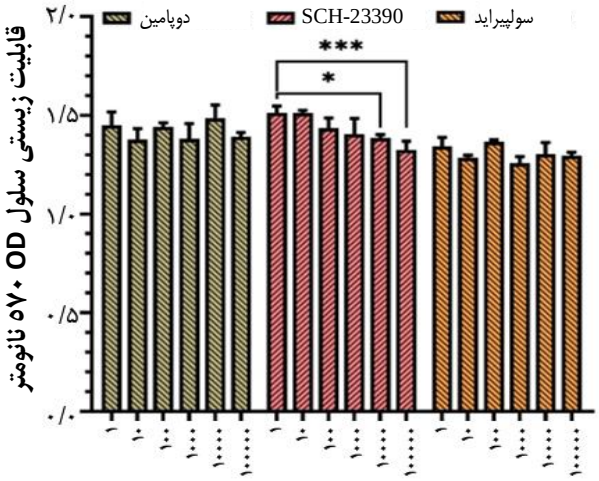
نتایج شمارش تعداد تاکی‌زوایت با استفاده از مشاهده مستقیم تاکی‌زوایت در زیر میکروسکوپ نوری بوسیله لام نئوبار نشان داد که دوپامین در سلول HFF-1 تاثیر معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) در رشد و تکثیر تاکی‌زوایت داشته است به‌طوری‌که تعداد تاکی‌زوایت در سلول‌های تیمار شده با دوپامین ۱/۴ برابر بیشتر از سلول‌هایی بود که دوپامین دریافت نکرده بودند (نمودار ۳الف).

همچنین نتایج RT-qPCR نشان داد که دوپامین تاثیر معنی‌داری ($p < ۰/۰۱$) در رشد و تکثیر تاکی‌زوایت در سلول HFF-1 داشته است به‌طوری‌که مقادیر توالی تکراری ژنومی در سلول‌های تیمارشده با دوپامین ۲/۴۳ برابر بیشتر از سلول‌هایی بود که دوپامین دریافت نکرده بودند (نمودار ۳ب).

گیرنده‌های D1 دوپامین در تسریع عفونت القا شده با دوپامین نقش ایفا می‌کنند.

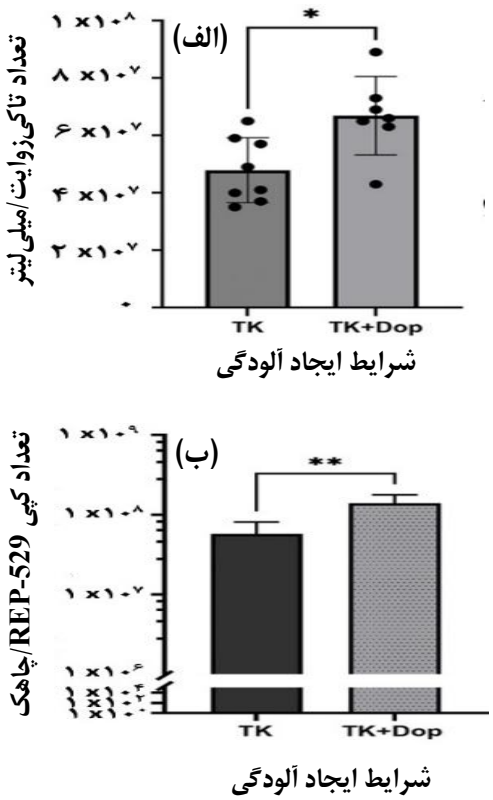
همان‌طورکه در قسمت قبلی گزارش شد دوپامین منجر به تسهیل آلودگی به تاکی‌زوایت شد. برای بررسی این‌که آیا این تاثیر ناشی از مکانیسم‌های مولکولی گیرنده‌های دوپامینی می‌باشد و یا اینکه به‌واسطه مسیرهای دیگر سلولی می‌باشد گیرنده‌های یادشده با آنتاگونیست‌های انتخابی مسدودشده و تاثیر این انسداد بررسی شد.

نتایج نشان داد که حضور کوتریماکسازول به‌طور معنی‌داری منجر به کاهش تکثیر انگل در HFF-1 ($P < ۰/۰۱$) می‌شود. همچنین آنتاگونیست گیرنده D1 (SCH-23390) به‌طور معنی‌داری منجر به کاهش رشد و تکثیر تاکی‌زوایت در HFF-1 ($p < ۰/۰۵$) شد. با این حال، آنتاگونیست گیرنده D2 (سولپیراید) هر چند به‌طور جزیی منجر به کاهش رشد و تکثیر تاکی‌زوایت در رده سلولی HFF-1 شد اما این کاهش معنی‌دار نبود. همچنین ترکیب دو آنتاگونیست یادشده (SCH-23390 و سولپیراید) به‌طور معنی‌داری منجر به کاهش رشد و تکثیر تاکی‌زوایت در سلول HFF-1 ($p < ۰/۰۵$) شد (نمودار ۴).



نمودار ۲– داروهای مورد مطالعه در دوزهای بالا منجر به کاهش رشد HFF-1 می‌شوند. با استفاده از تکنیک ام‌تی‌تی تاثیر داروهای دوپامین، SCH-23390 و سولپیراید روی رشد رده سلولی HFF-1 ارزیابی شد. پلات‌ها نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار (mean ± SD) ۳ تکرار می‌باشد (ANOVA دوطرفه، تست Tukey) *: $p < ۰/۰۵$ و ***: $p < ۰/۰۰۱$.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2024-07-16]

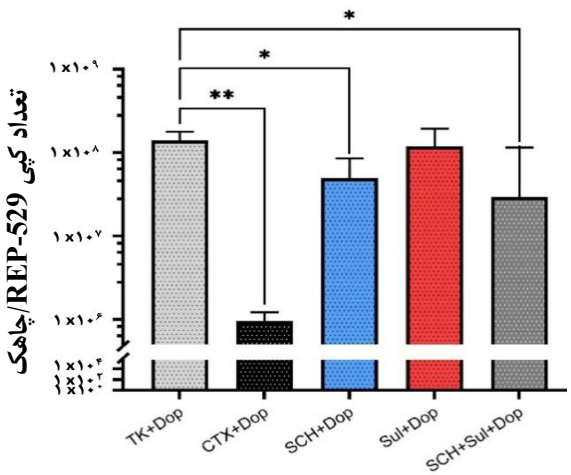


نمودار ۳– دوپامین منجر به تسهیل آلودگی HFF-1 با تاکی‌زوایت می‌شود. (الف) شمارش تعداد تاکی‌زوایت در هر میلی‌لیتر از کشت: شمارش با استفاده از مشاهده مستقیم تاکی‌زوایت در زیر میکروسکوپ نوری بوسیله لام نئوبار انجام گرفت. (ب) بررسی مولکولی شدت آلودگی: با استفاده از تکنیک RT-qPCR شدت آلودگی به تاکی‌زوایت ۳ روز بعد از عفونت نسبت به گروه کنترل مقایسه شد. TK: تاکی‌زوایت، TK + Dop: تاکی‌زوایت به همراه دوپامین. پلات‌ها نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار (mean ± SD) ۵ تا ۹ تکرار می‌باشند. (ANOVA یک‌طرفه و تست Tukey). *: $p < ۰/۰۵$، **: $p < ۰/۰۱$.

بحث

در این مطالعه اثر دوپامین و نقش آن در عفونت سلولی به‌وسیله توکسوپلاسما در مدل کشت سلولی مورد بررسی قرار گرفت. کشت تاکی‌زوایت سوش RH با موفقیت در رده سلولی HFF-1 انجام شده و شرایط آن بهینه گردید. اثر دوپامین، SCH-23390 و سولپیراید روی رشد و تکثیر سلول HFF-1 مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس اثر دوپامین و نقش رسپتورهای دوپامینی، در عفونت *توکسوپلاسما گوندی* مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج نشان داد که دوپامین بطور معنی‌داری منجر به تسهیل عفونت با فرم تاکی‌زوایت انگل و افزایش رشد و تکثیر آن می‌شود. توکسوپلاسما در انواع رده‌های سلولی در کیفیت و کمیت‌های متفاوت کشت شده است. چندین مطالعه گزارش کرده‌اند که فرم تاکی‌زوایت توکسوپلاسما، از جمله تاکی‌زوایت سوش RH، در سلول‌های HFF-1 سریعتر و بهینه‌تر تکثیر می‌شوند [۲۰، ۱۹]. در مطالعه ما هم تاکی‌زوایت در سلول HFF-1 به راحتی تکثیر شد. با اضافه‌شدن دوپامین به محیط کشت، عفونت در سلول HFF-1 به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. به مانند مطالعه ما، در تنها مطالعه انجام‌شده در زمینه نقش دوپامین در تسهیل عفونت توکسوپلاسما، افزودن دوپامین به محیط کشت سلول‌های فیبروبلاستی انسانی و یا آستروسیت اولیه موش صحرایی نوزاد، منجر به تسهیل عفونت و افزایش معنی‌دار تعداد تاکی‌زوایت‌های تولیدی و تخریب بیشتر تک لایه‌ی سلولی شده بود. در مطالعه یاد شده برای بررسی نقش گیرنده‌های دوپامینی در تسهیل عفونت سلول‌ها به تاکی‌زوایت، هر یک از گیرنده‌های D1 و D2 به‌تنهایی آنتاگونیزه شده و در نهایت نتیجه‌گیری شده بود که این گیرنده‌ها نقشی در تسهیل عفونت ندارند [۱۳]. برخلاف مطالعه استرابل[23] [۱۳]، نتایج



نمودار ٤– گیرنده‌های دوپامین در تسریع آلودگی به *تاکی‌زوایت* القا شده با دوپامین نقش ایفا می‌کنند. با استفاده از تکنیک RT-qPCR شدت آلودگی به تاکی‌زوایت طی ۲۴ ساعت بعد از تیمار با آنتاگونیست گیرنده‌های دوپامینی نسبت به هم مقایسه شد. TK: تاکی‌زوایت، Dop: دوپامین CTX: کوتریماکسازول، SCH: SCH-23390، Sul: سولپیراید. پلات‌ها نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار (mean ± SD) ۵ تکرار می‌باشد (ANOVA یک‌طرفه، تست توکی) *: $p < ۰/۰۵$ و **: $p < ۰/۰۱$.

[23] Strobl

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2024-07-16]

مطالعه ما نشان داد که مسدودکردن گیرنده‌های نوع D1 به‌وسیله آنتاگونیست انتخابی خود (SCH-23390) منجر به کاهش تکثیر تاکی‌زوایت‌ها و مسدودشدن کامل اثر دوپامین می‌شود. استرابل و همکاران برای مسدودسازی گیرنده D1 از غلظت ۱۰ میکرومولار SCH-23390 استفاده کرده بودند درحالی‌که در مطالعه ما از غلظت ۱۰ نانومولار استفاده شد که ۱۰۰۰ برابر کمتر بود. چنان‌که در نتایج مشاهده شد غلظت بالای این دارو منجر به کاهش رشد سلول HFF-1 می‌شود. بنابراین یکی از دلایل نتایج متناقض دو مطالعه می‌تواند استفاده از مقادیر بالای آنتاگونیست در مطالعه استرابل باشد.

برخلاف نتایج حاصل از مسدودسازی گیرنده‌های نوع D1 با SCH-23390، مسدودکردن گیرنده‌های نوع D2 با سولپیراید تاثیر معنی‌داری در کاهش تکثیر نداشت. همچنین آنتاگونیزه‌کردن توام D1 و D2 با ترکیب دو آنتاگونیست منجر به مسدودشدن کامل اثر دوپامین در افزایش تکثیر انگل شد. این اثر می‌تواند ناشی از مسدودشدن گیرنده‌های نوع D1 بوده باشد. همچنین سایر گیرنده‌های سلولی می‌توانند در این اثر نقش داشته باشند. مطالعات قبلی بر روی سلول J774 نشان داده است که دوپامین علاوه بر گیرنده‌های دوپامینی به سایر گیرنده‌های سطح سلول ازجمله گیرنده‌های بتا آدرنرژیک متصل می‌شوند [۲۱]. دوپامین با اتصال به گیرنده‌های بتا آدرنرژیک منجر به کاهش تولید اینترلوکین ۱۲ و متعاقبا منجر به اثرات ضدالتهابی متعددی می‌شود که توسط مکانیسم وابسته و مستقل به گیرنده‌های D اعمال می‌شود. بنابراین شاید یکی از مکانیسم‌های سلولی دخیل در نقش تسهیل‌کننده دوپامین روی تکثیر تاکی‌زوایت، اثرات ضدالتهابی دوپامین باشد.

نتیجه‌گیری

مطالعات گذشته نشان داده بود که مقادیر ترشح و سیگنالینگ دوپامین بعد از عفونت حاد و مزمن با *توکسوپلاسما گوندی* افزایش پیدا می‌کند. مطالعه حاضر نشان داد که یکی از اثرات این افزایش مقادیر دوپامین، تغییر سیگنالینگ مسیرهای ورود به داخل سلول می‌باشد به نحوی که انگل به‌واسطه تحریک رسپتورهای دوپامینی شبه D1 موجود در غشا سلول، ورود و تکثیر خود در داخل سلول را تسهیل می‌کند. مطالعه حاضر گامی در جهت روشن شدن نقش دوپامین و گیرنده‌های آن در افزایش عفونت توکسوپلاسما در سلول‌های هدف بود. بااین‌حال برای روشن‌شدن نقش دقیق دوپامین در رشد و تکثیر توکسوپلاسما نیاز به بررسی سایر مکانیسم‌های سلولی می‌باشد.

ملاحظات مالی

پژوهش حاضر تحت حمایت مالی انستیتو پاستور ایران با شماره طرح ۱۲۷۹ انجام شده است.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

س.ی.خ: انجام مطالعه، جمع‌آوری داده‌ها و نگارش مقاله؛ م.م: انجام مطالعه و جمع‌آوری داده‌ها؛ ج.ب: طراحی و انجام مطالعه، نظارت بر اجرای پژوهش، آنالیز داده‌ها و نگارش مقاله؛ م.گ: مشاوره و راهنمایی اجرای پژوهش.

فهرست منابع

[1] Tan K, Current protocols in immunology. In: Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Warrren Strober S, eds, Cell Biochemistry and Function. New York: John Wiley and Sons, 9 (1991) 295-295.

[2] Babaie J, Sayyah M, Fard-Esfahani P, Golkar M, Gharagozli K, Contribution of dopamine neurotransmission in proconvulsant effect of Toxoplasma gondii infection in male mice. ***J Neurosci Res*** 95 (2017) 1894-1905.

[3] Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP, Biology and epidemiology of Toxoplasma gondii in man and animals. ***Anim Health Res Rev*** 6 (2005) 41-61.

[4] Sutterland AL, Kuin A, Kuiper B, van Gool T, Leboyer M, Fond G, de Haan L, Driving us mad: the association of Toxoplasma gondii with suicide attempts and traffic accidents - a systematic review and meta-analysis. ***Psychol Med*** 49 (2019) 1608-1623.

[5] Watts E, Zhao Y, Dhara A, Eller B, Patwardhan A, Sinai AP, Novel approaches reveal that toxoplasma gondii bradyzoites within tissue cysts are dynamic and replicating entities in vivo. ***mBio*** 6 (2015) e01155-01115.

[6] Hay J, Aitken PP, Graham DI, Toxoplasma infection and response to novelty in mice. ***Z Parasitenkd*** 70 (1984) 575-588.

[7] Hutchinson WM, Bradley M, Cheyne WM, Wells BW, Hay J, Behavioural abnormalities in Toxoplasma-infected mice. ***Ann Trop Med Parasitol*** 74 (1980) 337-345.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2024-07-16]

[8] Johnson HJ, Koshy AA, Latent Toxoplasmosis effects on rodents and humans: How much is real and how much is media hype? ***mBio*** 11 (2020) e02164-19.
[9] Meyer CJ, Cassidy KA, Stahler EE, Brandell EE, Anton CB, Stahler DR, Smith DW, Parasitic infection increases risk-taking in a social, intermediate host carnivore. ***Commun Biol*** 5 (2022) 1180.
[10] Stibbs HH, Changes in brain concentrations of catecholamines and indoleamines in Toxoplasma gondii infected mice. ***Ann Trop Med Parasitol*** 79 (1985) 153-157.
[11] Prandovszky E, Gaskell E, Martin H, Dubey JP, Webster JP, McConkey GA, The neurotropic parasite Toxoplasma gondii increases dopamine metabolism. ***PLoS One*** 6 (2011) e23866.
[12] Gaskell EA, Smith JE, Pinney JW, Westhead DR, McConkey GA, A unique dual activity amino acid hydroxylase in Toxoplasma gondii. ***PLoS One*** 4 (2009) e4801.
[13] Strobl JS, Goodwin DG, Rzigalinski BA, Lindsay DS, Dopamine stimulates propagation of Toxoplasma gondii tachyzoites in human fibroblast and primary neonatal rat astrocyte cell cultures. ***J Parasitol*** 98 (2012) 1296-1299.
[14] Schmidt M, Imbs JL, Giesen EM, Schwartz J, Blockade of dopamine receptors in the renal vasculature by isomers of flupenthixol and sulpiride. ***J Cardiovasc Pharmacol*** 5 (1983) 86-89.
[15] Nilsson CL, Ekman A, Hellstrand M, Eriksson E, Inverse agonism at dopamine D2 receptors. Haloperidol-induced prolactin release from GH4C1 cells transfected with the human D2 receptor is antagonized by R(-)-n-propylnorapomorphine, raclopride, and phenoxybenzamine. ***Neuropsychopharmacology*** 15 (1996) 53-61.
[16] Gaskill PJ, Yano HH, Kalpana GV, Javitch JA, Berman JW, Dopamine receptor activation increases HIV entry into primary human macrophages. ***PLoS One*** 9 (2014) e108232.
[17] Hassl A, Aspock H, A rapid and simple method of purification of Toxoplasma gondii trophozoites originating from tissue culture for use in the indirect immunofluorescent antibody test. ***Zentralbl Bakteriol*** 272 (1990) 509-513.
[18] Ehrich M, Sharova L, In vitro methods for detecting cytotoxicity. ***Curr Protoc Toxicol*** 2 (2001) Unit 2.6.
[19] Wu L, Zhang QX, Li TT, Chen SX, Cao JP, In vitro culture of Toxoplasma gondii tachyzoites in HFF and HeLa cells. ***Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*** 27 (2009) 229-231 [in Chinese].
[20] da Costa-Silva TA, da Silva Meira C, Frazzatti-Gallina N, Pereira-Chioccola VL, Toxoplasma gondii antigens: recovery analysis of tachyzoites cultivated in Vero cell maintained in serum free medium. ***Exp Parasitol*** 130 (2012) 463-469.
[21] Hasko G, Szabo C, Nemeth ZH, Deitch EA, Dopamine suppresses IL-12 p40 production by lipopolysaccharide-stimulated macrophages via a beta-adrenoceptor-mediated mechanism. ***J Neuroimmunol*** 122 (2002) 34-39.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2024-07-16]

Research paper

Dopamine facilitates toxoplasma tachyzoite replication by stimulating D1-like dopamine receptors

Setayesh Yasami-Khiabani, Maryam Mostafavi, Jalal Babaie*, Majid Golkar

Department of Parasitology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Received: 23 November 2023 Accepted: 23 December 2023

Abstract

Background and Aim: *Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasite. *T. gondii* leads to increased production of dopamine in the host's brain. It is possible that dopamine plays a role in the proliferation of *T. gondii*. In this study, the effect of dopamine on the proliferation of Toxoplasma tachyzoites in HFF-1 cells was investigated.

Methods: HFF-1 cells were cultured and treated with 500 nM dopamine. 4×10^5 tachyzoites were added to the cell wells. To investigate the role of receptors, first the confluensed cells were treated with dopamine. Dopamine D1 and D2 receptor antagonists (SCH-23390 and sulpiride, respectively), alone and in combination, were added to the culture medium at a concentration of 10 nM. The treated cells were infected with Tachyzoite. The amounts of tachyzoites were evaluated by microscopic counting and by RT-qPCR method.

Results: Dopamine significantly ($p < 0.05$) increases proliferation of tachyzoites in HFF-1 cells. SCH-23390 significantly neutralized the effect of dopamine in treated cells ($p < 0.05$), while sulpiride could not avert the effect of dopamine. Moreover, combination of two antagonists, SCH-23390 and sulpiride, significantly reduced the proliferation of tachyzoites in HFF-1 cells ($p < 0.05$).

Conclusion: Our study showed that dopamine stimulates proliferation of tachyzoites in HFF-1 cell line. In addition, dopamine exerts its effect on parasite proliferation through D1 receptors. These results can help to design and develop effective drugs against Toxoplasma.

Keywords: Antagonist, dopamine, HFF-1, *Toxoplasma gondii*

Please cite this article as follows:

Yasami-Khiabani S, Mostafavi M, Babaie J, Golkar M, Dopamine Facilitates Toxoplasma Tachyzoite Replication by Stimulating D1-Like Dopamine Receptors. ***Iran J Physiol Pharmacol*** 7 (2023) 178-186.

*Corresponding author: jalalbabaie@gmail.com (ORCID ID: 0000-0002-4989-5998)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2024-07-16]