

Induction of Anti-inflammatory Functions in Peripheral Blood Monocytes by Dopamine in Vitro

Hanieh Nikkhah¹ , Seyyed Meysam Abtahi Froushani^{1*} , Habbib Dastmalchi Saei¹ ,
Nahideh Afzale Ahangaran¹ 

¹Dept of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:

Received: Oct. 15, 2022

Revised: July. 28, 2023

Accepted: Jan. 01, 2024

Published Online: Jun. 12, 2024

*** Correspondence to:**

Seyyed Meysam Abtahi
Froushani
Dept of Microbiology, Faculty
of Veterinary Medicine,
Urmia University, Urmia, Iran
Email:
sm.abtahi@urmia.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: Nowadays, some aspects of neuroendocrine and immune systems intercalation are already known. Accordingly, it has been shown that certain immune cells, such as monocytes, can produce and store dopamine in their secretory vesicles. This study was conducted to investigate the effects of dopamine on some immunological functions of the rat peripheral blood monocytes.

Material & Methods: In this experimental study, peripheral blood mononuclear cells of rats were isolated by a ficoll-hypaque gradient. Afterward, the plastic adherent fractions were used as monocytes. Monocytes in the treatment group cocultured for 24 h with 5×10^{-7} M dopamine, and then their phagocytosis performance, respiratory burst, killing ability, nitric oxide production, neutral red harvest, vital ability, and NF- κ B gene expression were investigated.

Results: The results of this study showed that both control or treatment monocytes showed no significant difference in phagocytosis after the challenge with opsonized yeast. Nevertheless, the neutral red uptake, respiratory burst, and nitric oxide production after the challenge with opsonized yeast, and also the expression of NF- κ B, were decreased in dopamine-treated monocytes compared to monocytes in the control group ($P < 0.05$). The monocyte vitality of the treatment group did not show any significant effects compared to the monocytes of the control group.

Discussion & Conclusion: It seems that dopamine dynamically creates an anti-inflammatory phenotype in the monocyte. Therefore, alongside a decrease in the lysosomal compartment activity, the monocytes produce lower levels of free oxygen and nitrogen radicals.

Keywords: Dopamine, Monocytes, Rat

How to cite this paper

Nikkhah H, Abtahi Froushani SM, Dastmalchi Saei H, Afzale Ahangaran N. Induction of Anti-inflammatory Functions in Peripheral Blood Monocytes by Dopamine in Vitro. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2024;32(2): 17-31.

القای عملکردهای ضدالتهابی در مونوسیت‌های خون محیطی رت توسط دوپامین در شرایط آزمایشگاهی

هانیه نیک خواه^۱ ID، سید میثم ابطیحی فروشانی^{۱*} ID، حبیب دستمالچی ساعی^۱ ID، ناهیده افضل آهنگران^۱ ID

^۱ گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۲۳

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۵/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۱۱

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۳/۲۳

نویسنده مسئول:

سید میثم ابطیحی فروشانی

گروه میکروبیولوژی، دانشکده

دامپزشکی، دانشگاه ارومیه،

ارومیه، ایران

Email:

sm.abtahi@urmia.ac.ir

مقدمه: امروزه تا حدودی برخی از جنبه‌های ارتباط متقابل دستگاه نوروآندوکراین و دستگاه ایمنی شناخته شده است. بر اساس این، نشان داده شده است که برخی از سلول‌های ایمنی از قبیل مونوسیت‌ها قادر به تولید و ذخیره‌سازی دوپامین در وزیکول‌های ترشحی خود هستند. هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر دوپامین بر عملکردهای ایمونولوژیک مونوسیت‌های خون محیطی رت است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی به کمک گرادیان فایکول-هایپک از خون محیطی رت‌ها جدا شدند؛ سپس از بخش چسبنده این سلول‌ها به کف فلاسک به عنوان سلول‌های مونوسیت استفاده گردید. سلول‌های مونوسیت در گروه تیمار به مدت ۲۴ ساعت با دوپامین در غلظت ۷-۱۰×۵ مولار مجاور شدند و آنگاه عملکرد فاگوسیتوز، انفجار تنفسی، قابلیت کشتار، تولید نیتریک اکساید، برداشت نوترال رد، قابلیت حیاتی و میزان بیان ژن NF-κB آن‌ها بررسی گردید.

یافته‌های پژوهش: نتایج این مطالعه نشان داد که مونوسیت‌های کنترل و تیمار هیچ تفاوت معنی‌داری در فاگوسیتوز پس از چالش با مخمر اپسونیزه نداشتند. با وجود این، میزان برداشت نوترال رد، شدت انفجار تنفسی و تولید نیتریک اکساید پس از چالش با مخمر اپسونیزه و همچنین میزان بیان NF-κB در مونوسیت‌های تیمار شده با دوپامین، نسبت به گروه شاهد، به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$). البته فعالیت زیستی مونوسیت‌های گروه تیمار نسبت به مونوسیت‌های گروه شاهد، تغییر معنی‌داری پیدا نکرد.

بحث و نتیجه‌گیری: در کل به نظر می‌رسد که دوپامین به طور پویا موجب ایجاد یک فنوتیپ ضدالتهابی در سلول‌های مونوسیت می‌شود، به طوری که این مونوسیت‌ها در کنار کاهش فعالیت بخش لیزوزومی، میزان کمتری از رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن را تولید می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: دوپامین، مونوسیت، رت

استناد: نیک خواه هانیه، ابطیحی فروشانی سید میثم، دستمالچی ساعی حبیب، افضا آهنگران ناهیده. القای عملکردهای ضدالتهابی در مونوسیت‌های خون محیطی رت توسط دوپامین در شرایط آزمایشگاهی. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، خرداد ۱۴۰۳؛ ۳۲(۲): ۱۷-۳۱.

شواهد در حال ظهور نشان داده‌اند که دستگاه عصبی ارتباط نزدیکی با دستگاه ایمنی دارد و محیطی که توسط واسطه‌های عصبی ارائه می‌شود، نقش مهمی در پلاریزه شدن پاسخ‌های ایمنی ایفا می‌کند (۱). دوپامین یک ماده شیمیایی آلی از خانواده کاتکول آمین و فنتیل آمین‌ها است که چندین نقش مهم را در مغز و بدن بر عهده دارد؛ در مغز به عنوان یک نوروترانسمیتر عمل می‌کند، درحالی که خارج از دستگاه اعصاب مرکزی، عملکرد دوپامین در چندین بخش از دستگاه اعصاب محیطی به عنوان یک واسطه شیمیایی در عروق خونی است (۲، ۳). سیستم دوپامینرژیک عملکردهای بسیار مهم دستگاه عصبی را تنظیم می‌کند؛ مانند کنترل رفتارهای حرکتی مرتبط با پاداش و همچنین شناخت محیط (۴). تغییرات در سیگنال‌های دوپامینرژیک نقش عمده‌ای در پاتوژنز بیماری پارکینسون و بیماری التهابی روده ایفا می‌نماید. هردوی این بیماری‌ها با شرایط التهابی و اختلالات ایمنی مرتبط هستند (۵، ۴). علاوه بر دستگاه عصبی، اطلاعات فراوانی در دسترس است که نشان می‌دهد توانایی تولید، ذخیره و آزادسازی دوپامین به دستگاه عصبی محدود نمی‌شود و سلول‌های ایمنی نیز چنین قابلیت‌هایی را دارند. توانایی تولید دوپامین در سلول‌های ایمنی، به ویژه سلول‌های دندریتیک و لنفوسیت‌های T به خوبی ثبت شده است (۶). میزان دوپامین در خون رت‌ها در شرایط عادی در حد 6/0 ng/ml تخمین زده شده است (۲). گیرنده‌های دوپامین در سلول‌های پاسخ ایمنی ذاتی از قبیل سلول‌های مونوسیت، دندریتیک، سلول‌های کشنده طبیعی، ماکروفاژها، مونوسیت‌ها و نیز در سلول‌های پاسخ ایمنی اکسپای وجود دارد (۲). دو زیرخانواده از دوپامین به نام‌های D1 و D2 شناسایی شده است؛ زیرخانواده D1 شامل رسپتورهای زیرگونه D1 و D5 است که باعث تشکیل چرخه AMP از طریق تحریک آدنیلات سیکلاز می‌شود و زیر خانواده D2 شامل تحت گونه D2، D3 و D4 است که چرخه آدنیلات سیکلاز را مهار می‌کند (۷).

مونوسیت‌ها عضوی از گروه متنوع سلولی به نام لوکوسیت‌ها هستند. مونوبلاست‌ها و پرومونوسیت‌ها

پیش‌سازهای مونوسیت‌ها هستند که از رده میلوئیدی مغز استخوان منشأ می‌گیرند و در جریان خون تبدیل به مونوسیت می‌شوند (۸). این سلول‌ها در خون، مغز استخوان و طحال حضور دارند و قابلیت تکثیر ندارند. در پاسخ‌های التهابی بدن به واسطه داشتن گیرنده‌های کموکاینی و مولکول‌های چسبنده، با مهاجرت از خون به مکان‌های ملتهب، به ماکروفاژ و سلول‌های دندریتیک التهابی تبدیل می‌شوند که از مقدم‌ترین سلول‌ها در برخورد با عوامل بیگانه هستند (۸، ۹). مونوسیت‌ها حداکثر ۱۰ درصد از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی را تشکیل می‌دهند و علاوه بر تمایز به سلول‌های ماکروفاژ و دندریتیک، عملکرد پاک‌سازی و برداشت مولکول‌های توکسین و بیگانه، به عنوان سلول یاری‌دهنده لنفوسیت‌های B و T عمل می‌کنند. خون محیطی به عنوان منبع اصلی این سلول‌ها به منظور مطالعه روی خصوصیات بیولوژیکی و ایمنی‌شناختی مونوسیت‌ها است (۹).

با وجود اینکه حضور گیرنده‌های پاسخ‌گو به دوپامین در سطح مونوسیت‌ها نشان داده شده است، عمده تحقیقات موجود درباره آثار دوپامین محدود به تأثیرات آن بر ایمونوفنوتیپ و قابلیت‌های مهاجرتی مونوسیت‌ها بوده؛ اما تاکنون تحقیق چندانی درباره نقش دوپامین در شکل‌دهی به اعمال اصلی مونوسیت‌ها صورت نگرفته است؛ بنابراین، در این پژوهش بر آن شدیم که به بررسی تأثیر دوپامین بر عملکردهای فاگوسیتوز، انفجار تنفسی، قابلیت کشتار، تولید نیتریک اکساید، برداشت نوترال رد، قابلیت حیاتی و میزان بیان ژن NF-κB مونوسیت‌های خون محیطی رت بپردازیم. هدف از این تحقیق ارزیابی آثار دوپامین بر میزان فاگوسیتوز، انفجار تنفسی، قابلیت کشتار، تولید نیتریک اکساید، برداشت نوترال رد، قابلیت حیاتی در مونوسیت‌های خون محیطی پس از چالش با مخمر اپسونیزه و ارزیابی آثار دوپامین بر میزان بیان ژن NF-κB است.

مواد و روش‌ها

جامعه پژوهش و گروه‌ها: به منظور مطالعه اثر دوپامین بر عملکرد مونوسیت‌های خون محیطی، دستکم از ۱۰ رأس رت نژاد ویستار شش الی هشت هفته استفاده شد. پس از

جداسازی مونوسیت‌ها از خون محیطی هر رت، به انجام همه آزمایش‌های زیر در حضور دوپامین (۷-۱۰×۵ مولار) و یا حضور نداشتن دوپامین پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته مونوسیت‌ها اقدام گردید. به این منظور، از هر رت سه بار به فاصله دو هفته خون‌گیری به عمل آمد. میزان دوپامین بر اساس غلظت دوپامین در شرایط استرس در محل‌های تحت آسیب بافتی انتخاب شده است (۱۱، ۱۰).

جداسازی مونوسیت‌ها: ابتدا ۳ میلی‌لیتر خون هپارینه از رت‌ها اخذ گردید و با ۳ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 به آرامی فاکون مخلوط شد؛ سپس خون رقیق‌شده حاصل را به آرامی و با پیست پاستور بر روی فایکول (در حجم خون اولیه رقیق نشده) قرار گرفت. پس از آن، نمونه در rpm2500 به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید؛ سپس سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC) که در حد فاصل فایکول و خون رقیق شده به صورت لایه‌ای ابری جمع شده بودند، به آرامی و با حرکت دورانی سمپلر برداشته شد. به منظور حذف بقایای فایکول، تقریباً یک‌ونیم برابر مقدار لایه ابری برداشت شده توسط سمپلر با محیط کشت RPMI-1640 مخلوط و با سرعت rpm2000 در ده دقیقه سانتریفیوژ شد. در ادامه و برای حذف پلاکت‌ها، سلول‌های حاصل با سرعت rpm1000 به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سلول‌های استحصال شده با یک میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 به حالت سوسپانسیون درآمدند.

برای خالص‌سازی سلول‌های مونوسیت از لنفوسیت‌های همراه، از خاصیت چسبندگی مونوسیت‌ها به سطوح پلاستیکی استفاده شد. به منظور بررسی بیان ژن، سلول‌ها در پلیت‌های شش‌خانه و برای آزمایش‌ها ایمونولوژیک، سلول‌ها به پلیت‌های ۲۴ خانه منتقل گردیدند و پس از گذشت دو ساعت، محلول رویی دور ریخته و سلول‌های مونوسیت چسبیده به کف پلیت با استفاده از ترکیب لیدوکائین (۴ mg/ml) و EDTA 10 میلی‌مولار جدا شد. شمارش سلول‌ها به روش متداول تریپان بلو صورت گرفت (۹، ۱۲).

تیمار مونوسیت‌ها با دوپامین: مونوسیت‌های

استحصالی از هر حیوان با غلظت‌های صفر و غلظت ۷-۱۰×۵ مولار از دوپامین به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و کشت شدند. همان‌طور که ذکر گردید، میزان دوپامین بر اساس غلظت دوپامین در شرایط استرس در محل‌های تحت آسیب بافتی انتخاب شده است. (۱۱، ۱۰). آنگاه به منظور حذف دوپامین باقی‌مانده، سلول‌ها چند بار با محیط کشت RPMI-1640 شسته شدند.

آزمون احیای MTT: در هر خانه از پلیت ۹۶ خانه ته‌تخت، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سلول مونوسیت (cell/ml 106×1) در دو گروه تیمار شده و تیمار نشده منتقل گردید؛ سپس ۲۵ میکرولیتر از محلول MTT (پنج میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه شد و به مدت چهار ساعت در انکوباتور قرار گرفت؛ سپس به هر خانه مقدار ۱۰۰ میکرولیتر DMSO افزوده و توسط دستگاه الایزانگار در طول موج ۴۹۲ نتیجه کار قرائت گردید (۱۳).

آزمون برداشت نوترال رد: حجم برابر از سوسپانسیون مونوسیت (cell/ml 106×1) و محلول نوترال رد (۰/۳۳ درصد) به مدت دو ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از دو بار سانتریفیوژ سلول‌ها (rpm 2000 به مدت ده دقیقه) به منظور حذف رنگ‌های نوترال رد برداشت نشده، هم‌حجم مقدار اولیه اسید استیک ۱ درصد در الکل ۵۰ درصد (یک گرم اسید استیک در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول و ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر) به آن‌ها اضافه شد تا رنگ‌های اندوسیتوز شده آزاد گردند. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول حاصل از لیز سلول‌ها در هر چاهک از میکروپلیت ۹۶ خانه ته‌تخت ریخته و توسط دستگاه الایزانگار در طول موج ۴۹۲ نتیجه کار خوانده شد (۱۴).

ارزیابی قابلیت انفجار تنفسی سلول‌های مونوسیت: نیم میلی‌لیتر از سوسپانسیون مونوسیت (cell/ml 106×1) و نیم میلی‌لیتر سوسپانسیون مخمر اپسونیزه (cell/ml 106×5) به‌اضافه نیم میلی‌لیتر محلول NBT 1/0 درصد به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. پس از پایان انکوباسیون، سلول‌ها در rpm 2000 به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از برداشت مایع رویی (حاوی مخمر

از پلیت ۹۶ خانه ته تخت اضافه شد. ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (پنج میلی گرم در میلی لیتر محلول PBS) به هر چاهک افزوده گردید و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند؛ سپس با افزودن ۱۵۰ میکرولیتر DMSO کریستال‌های فورمازان حل گردید و نتیجه در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد. درصد باکتری‌کشی از رابطه شماره ۱ به دست آمد (۱۵):

$$\text{KILLING}\% = 100 - (100 \times \text{ODT}_{90}) / \text{ODT} \quad (1)$$

به منظور تعیین درصد فاگوسیتوز با استفاده از سانتریفیوژ تفریقی (مدت ده دقیقه در ۱۵۰g در چهار درجه سانتی‌گراد)، باکتری‌های فاگوسیت‌نشده پس از ۹۰ دقیقه انکوباسیون جدا گردید و تعداد آن‌ها به شیوه افزون ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی گرم در یک میلی لیتر PBS)، ۳۰ دقیقه انکوبه، افزودن ۱۵۰ میکرولیتر DMSO، حل شدن کریستال‌های فورمازان و خوانش نتیجه در طول موج ۴۹۲ نانومتر صورت گرفت. درصد فاگوسیتوز از رابطه شماره ۲ به دست آمد (۱۵):

$$\text{PHAGOCYTOSIS}\% = 100 \times (\text{ODT}_{90} - (\text{E/G}) / \text{ODT}_0) \quad (2)$$

$$G = \text{ODC}_{90} / \text{ODC}_0$$

ارزیابی میزان بیان ژن NF-κB: به منظور استخراج RNA از سلول‌های مونوسیت تیمار شده با دوپامین و سلول‌های تیمار نشده با دوپامین از کیت استخراج RNA شرکت سیناکلون استفاده گردید (PR891620, SinaPure). غلظت RNA با استفاده از دستگاه NanoDropTM انجام شد. آزمون RT-PCR برای ژن NF-κB با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی ژن NF-κB انجام می‌شود. این پرایمرها توسط شرکت سیناکلون تهیه گردید و اندازه محصول RT-PCR حاصل از تکثیر و ردیف بازهای آن در جدول شماره ۱ آمده است.

برداشت‌نشده)، سه قطره متانول ۷۰ درصد به سلول‌ها افزوده و ده دقیقه صبر گردید تا الکل حذف شود؛ سپس مونوسیت‌ها با بافر PBS به حجم ۱/۵ میلی لیتر رسانیده و به خوبی پیتینگ شدند. در هر خانه پلیت ۹۶ خانه ته تخت، ۲۰۰ میکرولیتر از مونوسیت‌ها افزوده گردید. اکنون به هر کدام از خانه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر KOH دو مولار و ۲۰۰ میکرولیتر DMSO افزوده و با پیتینگ مکرر سلول‌ها لیز شدند در طی این مرحله، فورمازان تشکیل شده در نتیجه احیای NBT به دنبال انفجار تنفسی ناشی از برداشت مخمر اپسونیزه به حالت محلول در خواهند آمد. در نهایت، دانسیته نوری (OD) با دستگاه الیزا نگار در طول موج ۴۹۲nm خوانده شد (۱۴).

سنجش میزان تولید نیتریک اکساید توسط مونوسیت‌ها: به طور خلاصه، یک میلی لیتر سوسپانسیون مونوسیت (106×1 cell/ml) در بافر PBS با یک میلی لیتر مخمر کاندیدا آلیکنس ($106 \times 5/2$ cell/ml) اپسونیزه شده به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. پس از سانتریفیوژ سلول‌ها در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ده دقیقه، محلول رویی برداشته و میزان تولید نیتریک اکساید در آن به شیوه گریس سنجیده شد (۱۳).

سنجش عملکردهای فاگوسیتوز و میکروب‌کشی مونوسیت‌ها: نیم میلی لیتر سوسپانسیون مونوسیت (106×1 cell/ml) با ۱۰۰ میکرولیتر سرم رت به مدت ۵ دقیقه به عنوان گروه آزمایش (T) انکوبه گردید؛ همچنین به عنوان گروه شاهد (C)، نیم میلی لیتر بافر PBS با ۱۰۰ میکرولیتر سرم رت به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. آنگاه ۱۰۰ میکرولیتر مخمر کاندیدا آلیکنس (5×106 ml) در بافر PBS به هر دو گروه آزمایش و شاهد اضافه گردید. از هر دو لوله آزمایش و شاهد به میزان ۱۰ میکرولیتر در زمان‌های صفر و ۹۰ دقیقه نمونه برداری شد. به هر نمونه ده میلی لیتر آب مقطر با pH برابر با ۱۱ اضافه گردید و چندین بار عمل پیتینگ صورت گرفت. از هر لوله ۵ بار نمونه‌های ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به هر خانه

جدول شماره ۱. دستور جستجوی پایگاه‌های اطلاعاتی

پرایمر	نوع پرایمر	طول محصول (bp)	توالی پرایمر (5'-3')
NF- κ B	رفت	۲۹۹	5'-CAGAGGGACAACAGCAATGA-3'
	برگشت		5'-CCGTGTAAACCAAAGCCTA-3'
GAPDH	رفت	۵۳۲	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
	برگشت		5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

و تابش اشعه ماوراءبنفش باندها ظاهر شدند و با مقایسه موقعیت قطعه تکثیرشده با اندازه باندهای مربوط به نشانگر، اندازه محصول RT-PCR مشخص گردید و عکس‌برداری شد. برای Optical Analysis دانسیته باندهای حاصل از الکتروفوریز از نرم‌افزار ImageJ 2x استفاده گردید.

سیکل حرارتی برای تکثیر ژن‌های NF- κ B و GAPDH، به‌عنوان کنترل داخلی، بر اساس کیت DiaStar™ OneStep RT-PCR Kit (DR61-K050,) Solgent, Korean در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. محصولات RT-PCR بر روی ژل آگارز الکتروفورز گردیدند. در انتها با انتقال ژل به دستگاه Trans Illuminator

جدول شماره ۲. برنامه دمایی واکنش RT-PCR برای ژن NF- κ B و GAPDH

چرخه	مراحل	درجه حرارت (درجه سانتی-گراد)	مدت زمان
۱	5X OneStep RT-PCR Buffer	۵۰	۳۰ دقیقه
۱	10mM dNTP mix	۹۵	۱۵ دقیقه
(NF- κ B) ^{۳۵} (GAPDH) ^{۳۰}	Forward Primer Reverse Primer Template DNA	۹۵	۲۰ ثانیه
		۵۲	۴۰ ثانیه
		۷۲	۶۰ ثانیه
۱	™5X Band Doctor	۷۲	۵ دقیقه

زنده‌مانی و قابلیت حیاتی سلول‌های مونوسیت پس از تیمار با دوپامین بود. بر اساس نتایج این تحقیق به‌نظر نمی‌رسد که میزان زنده‌مانی و قابلیت حیاتی سلول‌های مونوسیت پس از مجاورت با دوپامین در حداکثر غلظت فیزیولوژیک (غلظت ۱۰-۵×۷ مولار) پس از گذشت ۲۴ ساعت تغییر معنی‌داری یابد. شدت جذب نوری در گروه مونوسیت‌های شاهد ۰/۵۴۸±۰/۰۹ و در مونوسیت‌های گروه تیمار ۰/۵±۰/۰۸ بود که از نظر آماری اختلافی نداشتند (نمودار شماره ۱).

تجزیه و تحلیل آماری: همه داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار گزارش شد. داده‌ها با استفاده از روش آزمون t-student زوج‌شده در نرم‌افزار SPSS vol.21 تجزیه و تحلیل گردید. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل ویراست ۲۰۱۶ استفاده شد.

یافته‌های پژوهش

تأثیر دوپامین بر قابلیت حیاتی مونوسیت‌ها: هدف از انجام آزمون احیای MTT در این پژوهش ارزیابی میزان



نمودار شماره ۱. نتایج ارزیابی قابلیت حیاتی سلول مونسیت‌ها (MO) پس از تیمار ۲۴ ساعته با دوپامین (۷-۱۰×۵ مولار).

غشایی و قدرت اندوسیتوز سلول‌های مونسیت در نظر گرفته می‌شود. شدت جذب نوری قرائت شده در آزمون برداشت نوترال رد در گروه مونسیت‌های شاهد $1/5 \pm 0/23$ و در مونسیت‌های گروه تیمار $0/39 \pm 0/14$ بود. بر اساس نمودار شماره ۲ به نظر می‌رسد که تیمار سلول‌های مونسیت با دوپامین به‌طوری معنی‌داری به کاهش قابلیت برداشت نوترال رد توسط سلول‌های مونسیت منجر شده است.

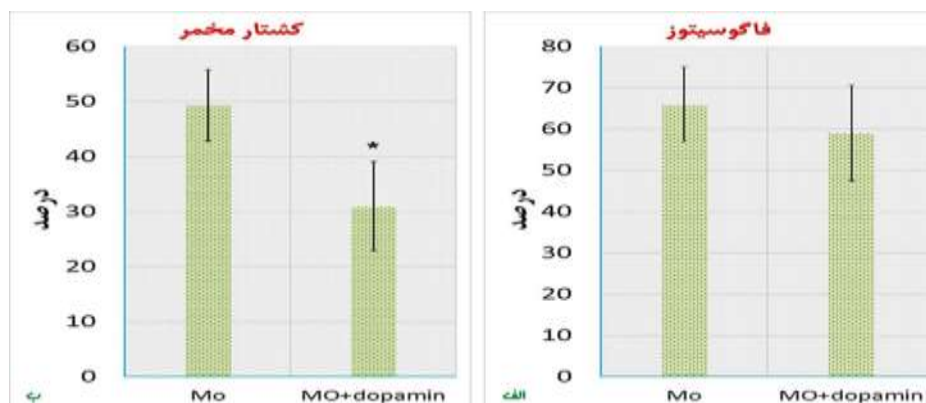
ارزیابی قابلیت اندوسیتوز مونسیت‌ها به دنبال تیمار با دوپامین: قابلیت اندوسیتوز، فاگوسیتوز و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن پس از برداشت میکروب‌های اپسونیزه از جمله مهم‌ترین عملکردهای یک سلول مونسیت/ماکروفاژ است. نوترال رد رنگی کاتیونی است که پس از برداشته شدن توسط مونسیت‌ها در بخش لیزوزومی تغلیظ می‌گردد. آزمایش نوترال رد به‌عنوان شاخصی از قابلیت



نمودار شماره ۲. نتایج ارزیابی برداشت نوترال رد توسط مونسیت‌ها (MO) پس از تیمار ۲۴ ساعته با دوپامین (۷-۱۰×۵ مولار). * نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ نسبت به گروه مونسیت‌های تیمار نشده است.

درصد و در مونسیت‌های گروه تیمار $58/18 \pm 13/09$ درصد بود؛ با این حال، قابلیت نابودسازی یا کشتن سلول‌های مخمر اپسونیزه توسط مونسیت‌ها مطابق نمودار ۳. ب کاهش یافت. درصد فاگوسیتوز در گروه مونسیت‌های شاهد $66/10 \pm 23/33$ درصد و در مونسیت‌های گروه تیمار $58/13 \pm 18/09$ درصد بود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را نشان دادند.

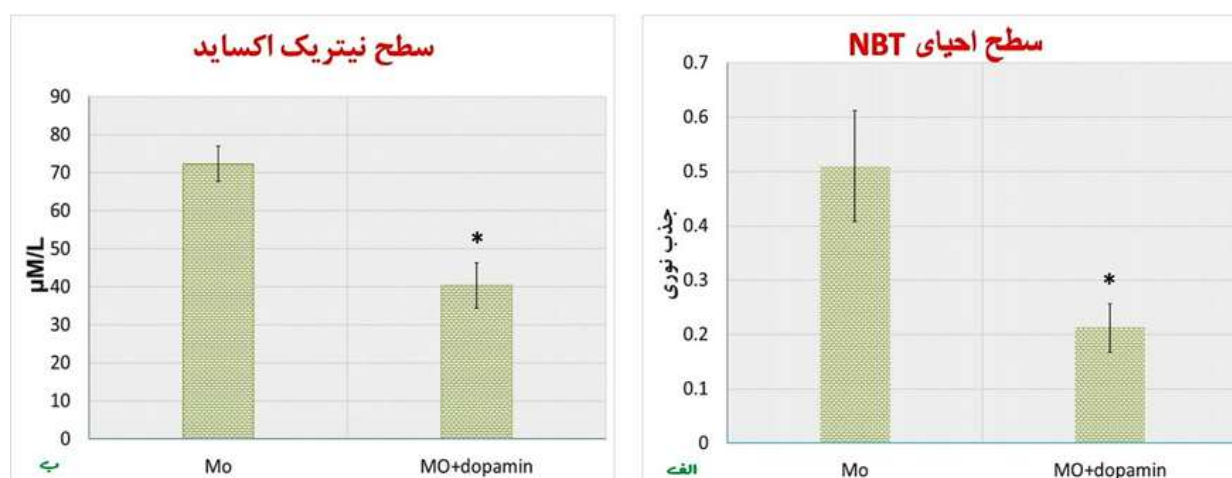
بررسی قابلیت فاگوسیتوز مونسیت‌ها به دنبال تیمار با دوپامین: پس از مواجهه با مخمر اپسونیزه، سلول‌های مونسیت با استفاده از گیرنده‌های اپسونیک خود اقدام به برداشت این عوامل می‌کنند و سپس آن‌ها را نابود می‌سازند. مطابق نمودار شماره ۳. الف مشخص است که میزان فاگوسیتوز مخمر اپسونیزه توسط سلول‌های مونسیت پس از مجاورت با دوپامین تغییر معنی‌داری نیافته است. درصد فاگوسیتوز در گروه مونسیت‌های شاهد $66/23 \pm 10/33$



نمودار شماره ۳. ارزیابی میزان فاکوسیتوز (الف) و کشتن (ب) مخمر اپسونیزه توسط مونسیت‌ها (MO) پس از تیمار ۲۴ ساعته با دوپامین (۷- 5×10^5 مولار). * نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ نسبت به گروه مونسیت‌های تیمار نشده است.

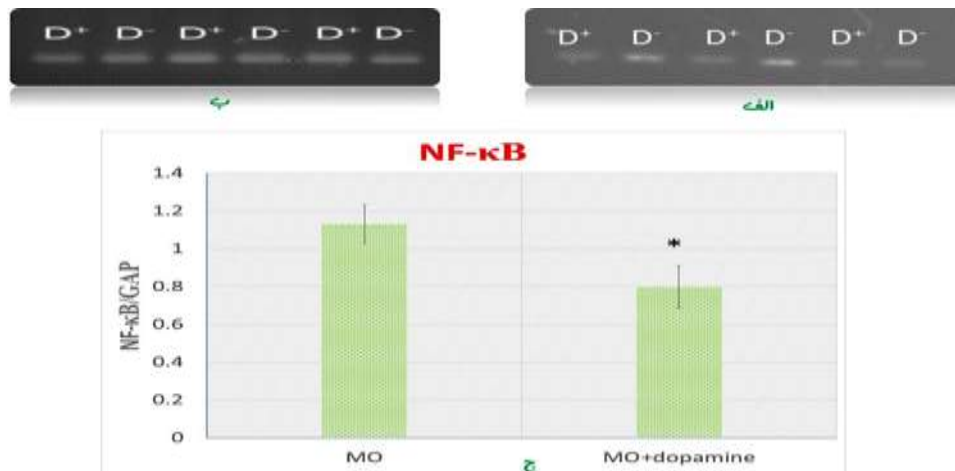
رادیکال‌های آزاد اکسیژن شده است. میزان جذب نوری قرائت‌شده در گروه مونسیت‌های شاهد 0.54 ± 0.13 و در مونسیت‌های گروه تیمار 0.24 ± 0.39 بود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. از آزمون گریس در این مطالعه به‌عنوان شاخصی برای ارزیابی قابلیت تولید رادیکال‌های آزاد نیتروژن توسط مونسیت‌ها استفاده شد. سطح نیتریک اکساید تولیدی در گروه مونسیت‌های شاهد $72/27 \pm 0.43$ میکرومول در لیتر و در مونسیت‌های گروه تیمار $40/0 \pm 1/48$ میکرومول در لیتر بود. بر اساس تجزیه و تحلیل آماری مشخص گردید که تیمار دوپامینی سلول‌های مونسیت به کاهش معنی‌دار شدت تولید رادیکال‌های آزاد نیتروژن منجر شده است (نمودار شماره ۴. ب).

تأثیر تیمار دوپامین بر عملکردهای انفجار تنفسی و تولید نیتریک اکساید توسط مونسیت‌ها: سلول‌های فاکوسیت‌کننده پس از برداشت اجرام اپسونیزه، از طریق تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن اقدام به نابودی میکروب‌ها می‌کنند. آزمون احیای NBT شاخصی از شدت انفجار تنفسی توسط سلول‌های مونسیت است. رنگ NBT پس از برداشته شدن توسط آنیون سوپراکسید در داخل فاکوزوم‌ها احیا می‌شود و تبدیل به کریستال‌های فورمازان می‌گردد. افزوده شدن DMSO و KOH به حل شدن کریستال‌های فورمازان منجر می‌شود که شدت آن متناسب با میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن است. همان‌طور که در نمودار شماره ۴. الف مشخص است، تیمار دوپامین موجب کاهش قابلیت سلول‌های مونسیت در انفجار تنفسی و تولید



نمودار شماره ۴. ارزیابی شدت انفجار تنفسی (الف) و تولید نیتریک اکساید (ب) پس از برداشت مخمر اپسونیزه توسط مونسیت‌ها (MO) پس از تیمار ۲۴ ساعته با دوپامین (۷- 5×10^5 مولار). * نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ نسبت به گروه مونسیت‌های تیمار نشده است.

و در مونوسیت‌های گروه تیمار $0/69 \pm 0/11$ بود. تجزیه و تحلیل آماری نتایج Real-Time PCR نشان داد که تیمار با دوپامین در حداکثر غلظت فیزیولوژیک به مدت ۲۴ ساعت، به کاهش معنی‌دار بیان NF- κ B در مونوسیت‌ها منجر شده است (نمودار شماره ۵).



نمودار شماره ۵. ارزیابی میزان بیان NF- κ B توسط مونوسیت‌ها (MO) پس از تیمار ۲۴ ساعته با دوپامین (5×10^{-7} مولار). محصولات RT-PCR حاصل از رنگ‌آمیزی DNA Safe Stain. نمونه‌های تیمار شده و تیمار نشده (GAPDH)، تصویر الف و NF- κ B، تصویر ب بارگذاری شده در ژل یکسان، تحت شرایط برابر بررسی و با یکدیگر مقایسه شدند و تصاویر تجزیه و تحلیل گردید. نتایج آن نیز در تصویر ج نشان داده شده است.* نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ نسبت به گروه مونوسیت‌های تیمار نشده است.

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های کنونی، در عقده‌های لنفاوی پایانه‌های عصبی آدرنژیک که در ارتباط با سلول‌های ایمنی قرار می‌گیرند، قادر به تولید دوپامین هستند. از سویی، نشان داده شده است که سلول‌های ایمنی از قبیل لنفوسیت‌های Treg برخی از لنفوسیت‌های B، DCs، نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و ماست سل‌ها در شرایط فیزیولوژیک قادر به تولید دوپامین هستند (۱۶). گزارش شده است که انتقال پیام توسط گیرنده‌های دوپامین با میل ترکیبی کم، از جمله DR1 و DR2، برای متوقف کردن فرایندهای التهابی سلول‌های ایمنی ذاتی و در نتیجه، تضعیف سلول‌های ایمنی ذاتی همراه هستند (۱۷). برعکس، تحریک گیرنده‌های دوپامینی با میل ترکیبی بالا مانند DR3 و DR5 موجب تقویت التهاب و پاسخ ایمنی شده است (۱۸، ۱۷). بر اساس تحقیقات صورت گرفته، در شرایط فیزیولوژیک حداکثر غلظت دوپامینی که سلول‌های ایمنی با آن مجاور می‌شوند، در حد 5×10^{-7} مولار است (۱۱، ۱۰).

در این مطالعه سعی شده است که به بررسی آثار دوپامینی بر عملکردهای پایه و فیزیولوژیک سلول‌های مونوسیت در شرایط غلظت حداکثری دوپامین پرداخته شود که در شرایط فیزیولوژیک گزارش شده است.

بر اساس مطالعات مک‌کینا و همکاران، مونوسیت‌های انسان حاوی غلظت بالایی از گیرنده‌های دوپامینی D2R و D3R در مقایسه با گیرنده‌های دوپامینی D4R و D5R است (۱۱). درباره تأثیر دوپامین بر مونوسیت‌ها گزارش‌های اندکی وجود دارد. مونوسیت‌های CD14+ ساکن در خون محیطی تنها گیرنده دوپامینی DRD4 را بیان می‌کنند (۱۹)؛ همچنین مونوسیت‌های CD14+ خون محیطی انسان و رده سلولی U937 (پری مونوسیت‌ها) حاوی دوپامین، اپی نفرین و نوراپی نفرین داخل سلولی هستند. مونوسیت‌های CD14+ همچنین شامل تعدادی متابولیت‌ها از قبیل MT^۳، DHPG و MET هستند (۱۹)؛ با این حال، با مراجعه به منابع مختلف به نظر می‌رسد که بیشتر داده‌های موجود مربوط به

تأثیر دوپامین بر روی سلول‌های ماکروفاژ است.

بر اساس مطالعات گذشته به نظر می‌رسد که دوپامین فنوتیپ و عملکرد مونوسیت‌ها/ماکروفاژها را تنظیم می‌کند. در مطالعات *in vitro* بر روی ماکروفاژهای جوجه نشان داده شده که غلظت بالای دوپامین (5 $\mu\text{g/mL}$) سمی است، به طوری که ۵۳ درصد از سلول‌های تحت تیمار دچار مرگ شدند. انکوباسیون با دوپامین در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت یک ساعت، فعالیت فاگوسیتی ماکروفاژها را افزایش داده است؛ با این حال، اگر ماکروفاژها به مدت ۳ ساعت در معرض همین غلظت‌های دوپامین باشند، فعالیت فاگوسیتی آن‌ها کاهش معنی‌داری خواهد یافت (۲۰). هاسکاو و همکاران نشان دادند، در ماکروفاژ صفافی فعال شده با گیرنده دوپامینی D2R توسط آگونیست‌های (برومو کریپتین و کوئینپیرول)، ترشح نیتریک اکساید و α کاهش می‌یابد؛ همچنین تحریک گیرنده دوپامینی D1R در مقایسه با کنترل، به کاهش تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژها منجر گردیده است (۲۱). گزارش شده است که بیان گیرنده‌های $\text{Fc}\gamma$ و کمپلمان در ماکروفاژهای خوکچه هندی افزایش یافته است که به مدت هفت روز، تحت تیمار با آگونیست‌های دوپامینی (برومو کریپتین، لئوپرولید و پرگولید) یا آنتاگونیست‌های دوپامین (کلرپرومازین، SCH23390، متوکلورامید، سولپیرید، ورالپیرید، آلزپیرید و سیزاپرید) بودند (۲۲).

نتایج ما نیز حاکی از کاهش برخی از فعالیت اصلی مونوسیت‌ها پس از تیمار با دوپامین شامل قدرت اندوسیتوز، کشتار مخمر اپسونیزه، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن بود، درحالی که قابلیت فاگوسیتوز مخمر اپسونیزه توسط مونوسیت‌ها پس از تیمار با دوپامین تغییر معنی‌داری نیافت. فرایند حذف یک عامل پاتوژن توسط مونوسیت شامل مراحل برداشت، به درون کشیده شدن (فاگوسیتوز)، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن، فعالیت آنزیم‌های لیزوزومی و حذف سلول است. بر اساس نتایج به دست آمده، شدت فاگوسیتوز مخمر اپسونیزه میان دو گروه مونوسیت‌های تیمار شده و بدون تیمار تفاوت معناداری را نشان نداد. برداشت

یک عامل اپسونیزه توسط یک سلول فاگوسیتیک از طریق گیرنده‌های متعددی از قبیل گیرنده اپسونیک و غیر اپسونیک القا می‌گردد؛ بنابراین به نظر می‌رسد، با وجود اینکه آزمایش نوترال رد که تا حدودی برای برخی از قابلیت‌های غشایی است، کاهش یافته است، سیگنال‌های حاصل از گیرنده‌های اپسونیک و غیر اپسونیک بر این کاهش فعالیت غشایی در حضور دوپامین غلبه کرده و قابلیت فاگوسیتوز در حضور دوپامین تغییر معنی‌داری نیافته است. تحقیقات اخیر نیز حاکی از افزایش چشمگیر گیرنده‌های اپسونیک توسط ماکروفاژها در شرایط درون‌تنی یا برون‌تنی پس از تحریک آگونیست‌های دوپامینی بوده است (۲۲). گفتنی است، اپسونیزه شدن و برداشت (فاگوسیتوز) سریع در کنار مهار روند انفجار تنفسی یا تولید واسطه‌های نیتراو (نیتریک اکساید) راهکار اصلی عوامل موجد عفونت‌های داخلی سلولی مانند عامل سل است (۹).

پس از برداشت یک پاتوژن، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن لازمه حذف مؤثر آن است. بر اساس نتایج این پژوهش، تیمار دوپامینی به کاهش چشمگیر شدت تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن در مونوسیت‌ها منجر شده است. هرچند که تولید رادیکال‌های اکسیژن و نیتروژن برای حذف عامل پاتوژن لازم و مؤثر است، در صورتی که تولید این رادیکال‌ها به صورت لجام گسیخته و نابجا صورت گیرد، به ایجاد شرایط ایمنوپاتولوژیک و آسیب بافتی منجر می‌گردد (۱۳)؛ بنابراین، به نظر می‌رسد که یکی از وظایف اصلی دوپامین در دستگاه ایمنی کاهش یا تعدیل تولید واسطه‌های بالقوه آسیب‌رسان اکسیژن و نیتروژن باشد. همسو با این امر، تحقیقات پیشین به خوبی نشان داده است که در شرایط بالینی نیز در تغییر سطح دوپامین بر وضعیت التهاب مؤثر است؛ به طور مثال، سطح دوپامین در افراد افسرده کاهش چشمگیری می‌یابد (۲). مطالعات گذشته به خوبی نشان داده است که شیوع بیماری خودالتهابی و خودایمنی که ممکن است ناشی از آسیب‌های رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن باشد، در افراد افسرده به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (۲۳)؛ همچنین در شرایط شوک از قبیل شوک آندوتوکسیک، استفاده از

دوپامین فعال‌سازی NF- κ B به‌واسطه LPS و همچنین اتصال NF- κ B به پروموتور TNF- α به‌واسطه تحریک با LPS را مهار می‌کند؛ بنابراین، محققان نتیجه‌گیری کردند که دوپامین موجب مهار فعال شدن و جابه‌جا شدن NF- κ B از سیتوپلاسم به هسته سلول‌های مونوسیت می‌شود (۵). نتایج ما نیز نشان داد که همسو با تغییر سطح فعالیت سلول‌های مونوسیت در تولید واسطه‌های فعال اکسیژن و نیترژن، تیمار دوپامینی به مدت ۲۴ ساعت در حداکثر غلظت فیزیولوژیک، به کاهش معنی‌دار بیان NF- κ B به‌عنوان یکی از عوامل اثرگذار در تولید واسطه‌های فعال اکسیژن و نیترژن منجر می‌گردد.

تحقیقات گذشته نشان داده‌اند که دوپامین به‌وسیله اتصال به گیرنده‌هایش آثار ضدالتهابی دارد. به دنبال استفاده از رده سلولی J774.1 و یا استفاده از ماکروفاژهای صفاقی موش C57B1/6 که با LPS (ng/ml10) و دوپامین (μ M 01/0) تحریک شده بودند، آنان مشاهده کردند که بیان mRNA مربوط به IL-12 p40 و همچنین ترشح آن به‌صورت وابسته به غلظت کاهش یافت، درحالی‌که ترشح IL-10 افزایش یافته بود (۲۱). گزارش دیگری نشان داد که دوپامین ترشح سایتوکاین‌های ضدالتهابی در ماکروفاژهای نشئت گرفته از مونوسیت انسانی را با و یا بدون تحریک LPS تحریک می‌کند. ماکروفاژهای نشئت گرفته از مونوسیت انسانی فعال شده با LPS که با غلظت بالای دوپامین (μ M 2) و 20 (μ M) تحریک شده بودند، ترشح IL-10 را افزایش دادند، درحالی‌که ترشح TNF- α در آن‌ها کاهش یافت. در مقابل، غلظت پایین دوپامین (20 nM و 200 nM) به‌طور ناچیزی، تنها بر ترشح TNF- α و تنظیم مثبت IL-10 تأثیر می‌گذارد (۲۷).

در آزمایش MTT قابلیت‌های حیاتی سلول‌ها سنجیده می‌شود. ماده MTT پس از برداشته شدن توسط سلول‌های فاگوسیت‌کننده به دنبال رخداد فرایند تنفس سلولی در میتوکندری‌ها تبدیل به کریستال‌های فورمازان می‌گردد (۱۳)؛ بنابراین، هرچقدر که سطح فعالیت متابولیک سلول‌ها افزایش یابد، میزان احیای MTT به کریستال‌های فورمازان افزایش خواهد یافت. با توجه به نتایج به‌دست آمده در این

آنالوگ‌های دوپامین به‌عنوان بخشی از برنامه حفظ فشارخون مرسوم است. در ابتدا، تنها فایده این آنالوگ‌ها را افزایش خون‌رسانی به ارگان‌های حیاتی ذکر می‌کردند؛ اما امروزه مشخص شده است که لااقل بخشی از فواید این داروها در شرایط شوک به علت مهار التهاب و کاهش کموتاکسی سلول‌های ایمنی است (۲۴). از سویی، نتایج مطالعه ما نشان داد که در کنار کاهش قابلیت تولید رادیکال‌های آزاد، میزان کشتار مخمر نیز کاهش می‌یابد؛ بنابراین می‌توان حدس زد در شرایطی که احتمال افزایش بیش‌ازحد سطح دوپامین وجود دارد (از قبیل شرایط افراد معجون)، ممکن است به تشدید عفونت و خطرات ناشی از آن منجر گردد. هرچند تاکنون تحقیق خاص و یا گزارشی درباره تأثیر افزایش سطح دوپامین بر روی احتمال تشدید بیماری‌های عفونی صورت نگرفته است؛ با این حال، بر اساس نتایج، این فرضیه مطرح می‌گردد که در حین استفاده از آگونیست‌های دوپامین در شرایط به‌ویژه شوک عفونی، دقت بیشتری به عمل آید؛ زیرا که ممکن است استفاده از دوپامین به تشدید عفونت به علت مهار قابلیت‌های دستگاه ایمنی در حذف عامل عفونی منجر گردد، هرچند این مسئله تنها در حد فرضیه است و لازم است تحقیقات بیشتر صورت گیرد.

NF- κ B پروتئین هترودایمی است که در سیتوپلاسم سلول‌های در حال استراحت به‌صورت کمپلکس با پروتئین مهار IKB حضور دارد (۲۶، ۲۵). پس از فعال شدن مسیرهای پیام‌رسانی به علت تحریک مونوسیت‌ها با اجزای عوامل عفونی، IKB جدا شده و NF- κ B آزاد شده به هسته سلول منتقل می‌شود. در هسته، این عامل نقش بسیار مهمی در القای تولید سایتوکاین‌ها و کموکاین‌های التهابی و همچنین تولید واسطه‌های فعال اکسیژن و نیترژن بازی می‌کند. به سبب نقش گسترده این عامل در فعالیت دستگاه ایمنی به‌عنوان واسطه مرکزی پاسخ‌های ایمنی نامیده شده است (۲۶). در یک تحقیق جالب، به میزان تغییر اتصال NF- κ B به DNA در مونوسیت‌های استحصالی از خون محیطی انسان و یا رده‌های سلول مونوسیت انسان اشاره شده است که با LPS (ng/ml10) فعال گردیده بودند. بر اساس نتایج آنان مشخص شده است که

تحقیق به نظر می‌رسد، تیمار با دوپامین برخی از عملکردهای فیزیولوژیک مونوسیت‌ها را کاهش می‌دهد؛ اما این کاهش‌ها با توجه به تغییر نکردن قدرت حیاتی سلول‌های مونوسیت به دنبال تیمار دوپامین، مربوط به یک فعالیت مهارکننده کلی یا ساده نیست، بلکه با توجه به تغییر نکردن معنی‌دار شدت احیای MTT به کریستال‌های فورمازان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که دوپامین عمده‌تاً باعث تغییر برنامه‌ریزی و نه مهار سلول‌های مونوسیت می‌گردد.

رنگ نوترال رد رنگی کاتیونی است که به صورت غیرایسونیک توسط سلول‌های فاگوسیت‌کننده اندوسیتوز می‌شود. رنگ نوترال رد پس از برداشته شدن در بخش لیزوزومی سلول‌های فاگوسیت‌کننده تغلیظ می‌گردد، به طوری که میزان برداشت نوترال رد به برخی از عملکردهای سلولی از جمله قابلیت‌های غشایی، یکپارچگی غشایی و فعالیت بخش لیزوزومی بستگی دارد (۱۴). البته مطابق نتایج ما به نظر می‌رسد که تیمار با دوپامین به کاهش برداشته شدن و تغلیظ نوترال رد در لیزوزوم سلول‌های مونوسیت منجر شده است؛ با این حال، بر اساس آزمایش MTT به نظر نمی‌رسد که قدرت حیاتی سلول‌ها تغییر معنی‌داری یافته باشد؛ بنابراین، کاهش برداشت نوترال رد در نتایج ما عمده‌تاً مرتبط با تغییر قابلیت‌های غشایی و همچنین تغییر فعالیت بخش لیزوزومی مونوسیت‌ها خواهد بود. همسو با آن، نتایج آزمایش مخمرکشی پژوهش حاضر نیز حاکی از کاهش میزان کشتار مخمرها پس به دنبال تیمار با دوپامین بود. حذف یک پاتوژن نیازمند عوامل لیزوزومی و همچنین تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن است که نتایج ما حاکی از کاهش سطح تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن در کنار کاهش فعالیت بخش لیزوزومی بود.

بر اساس دانسته‌های کنونی به نظر می‌رسد که سلول‌های مونوسیت پس از مهاجرت آن‌ها به بافت (ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک)، بر اساس ریز محیط اطرافی چندین فوتوتیپ مختلف را پیدا می‌کنند (۲۸، ۲۹)؛ به طور مثال، نشان داده شده است که مونوسیت‌ها پس از مهاجرت به بافت، بسته به شرایط، قادر به تبدیل به حداقل دو

نوع ماکروفاژ هستند. در کنار ریز محیط بافتی که مونوسیت‌ها به آن وارد شده‌اند، وضعیت خود مونوسیت‌ها پیش از ورود به بافت نیز بر نوع فوتوتیپی مؤثر است که پس از تبدیل به ماکروفاژ پیدا می‌کنند. این فوتوتیپ‌ها از لحاظ سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها، گیرنده‌های لیگاند و عملکرد با یکدیگر متفاوت‌اند. ماکروفاژهای کلاسیک یا M1 گروهی از ماکروفاژها با خاصیت ضد میکروبی و التهابی قوی هستند که در پاتوژن بیماری‌های التهابی و خودایمن نقش فعالی را بازی می‌کنند (۲۹). ماکروفاژهای M2 یا ماکروفاژهای فعال‌شده از مسیر آلترناتیو (جایگزین) به میزان کمتری از سایتوکاین‌های التهابی را نسبت به ماکروفاژهای M1 تولید می‌کنند و در مقابل، نقش مهمی را در بازسازی و ترمیم آسیب‌های بافتی ایجاد می‌نمایند. این سلول‌ها نسبت به ماکروفاژهای M1 قابلیت میکروب‌کشی به مراتب کمتری دارند (۲۹). بر اساس نتایج تحقیق ما به نظر می‌رسد که دوپامین به علت کاهش میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن و همچنین کاهش قابلیت کشتار، احتمالاً سلول‌های مونوسیت را به سوی فوتوتیپ ضدالتهابی با قابلیت تبدیل به ماکروفاژهای M2 برنامه‌ریزی می‌کند. در هر حال، این مسئله نیازمند مطالعات بیشتر است.

البته ذکر این نکته اساسی است که تغییر نکردن میزان فعالیت زیستی که در این تحقیق در رابطه با مونوسیت‌های تیمار شده با دوپامین دیده شد، حاکی از القای پویای یک فوتوتیپ ضدالتهابی و نه مهار ساده فعالیت این سلول‌ها توسط دوپامین است؛ همچنین تغییر نکردن قابلیت فاگوسیتوز در کنار کاهش تولید رادیکال‌های آزاد در سلول‌های مونوسیت تیمار شده با دوپامین نسبت به گروه شاهد نیز، تأییدی بر تغییر در برنامه‌ریزی و پلاریزه شدن سلول‌های مونوسیت‌ها پس از مجاورت با دوپامین است.

در کل به نظر می‌رسد که دوپامین به طور پویا موجب ایجاد یک رخ‌نمود ضدالتهابی در سلول‌های مونوسیت می‌گردد، به طوری که این مونوسیت‌ها در کنار کاهش فعالیت بخش لیزوزومی، میزان کمتری از رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن را تولید می‌کنند. این مسئله، یعنی کاهش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، در شرایط ایمونوپاتولوژیک از

قبیل بیماری‌های خودایمن امر مطلوبی به‌شمار می‌آید. البته کاهش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن و همچنین کاهش عملکرد لیزوزومی در شرایط بیماری‌های عفونی ممکن است به گسترش عفونت کمک کند. همسو با این مطلب، نتایج ما حاکی از کاهش قابلیت مخمرکشی سلول‌های مونوسیت استحصالی از رت‌های تحت تیمار با دوپامین در مقایسه با رت‌های شاهد بود؛ بنابراین، لازم است که در حین استفاده از آگونیست‌ها و یا آنتاگونیست‌های دوپامینی در بیماران مختلف به این مسائل نیز توجه شود.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌نمایند که هیچ‌گونه تعارض منفعی وجود ندارد.

کد اخلاق

همهٔ مراحل این تحقیق در کمیتهٔ اخلاق پژوهش دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه ارومیه با کد IR-UU-AEC-3-1530-DA تصویب شده است.

حمایت مالی

از این پژوهش توسط معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه، حمایت مالی به عمل آمده است.

مشارکت نویسندگان

دکتر سید میثم ابطحی فروشانی طرح اولیه مطالعه را مطرح و راهنمایی آن را بر عهده داشتند، اجرای مطالعه و نوشتن متن اولیه مقاله توسط خانم دکتر هانیه نیک خواه، آنالیزهای آماری توسط دکتر دکترا سید میثم ابطحی فروشانی و مشاوره علمی و کمک به انجام بهتر این طرح توسط آقای دکتر دستمالچی ساعی و خانم دکتر ناهیده افضل آهنگران انجام شد. متن نهایی با همکاری همه محققین تهیه شد.

References

1. Jahangiri S, Abtahi Froushani SM, Delirez N. Combination immunotherapy with extract of heated 4T1 and naloxone in mouse model of breast cancer. *Turk J Med Sci* 2016;46:518-23. doi: 10.3906/sag-1410-61.
2. Mohammadi A, Abtahi Froushani SM, Delirez N, Ownagh A. Alum and metoclopramide synergistically enhance cellular and humoral immunity after immunization with heat-killed *Salmonella typhimurium* vaccine. *Int Immunopharmacol* 2021; 101:108185. doi: 10.1016/j.intimp.2021.108185.
3. Arias-Carrión O, Stamelou M, Murillo-Rodríguez E, Menéndez-González M, Pöppel E. Dopaminergic reward system: a short integrative review. *Int Arch Med* 2010; 3:24. doi: 10.1186/1755-7682-3-24.
4. Franco R, Reyes-Resina I, Navarro G. Dopamine in Health and Disease: Much More Than a Neurotransmitter. *Biomedicines* 2021;9:109. doi: 10.3390/biomedicines9020109.
5. Arreola R, Alvarez-Herrera S, Pérez-Sánchez G, Becerril-Villanueva E, Cruz-Fuentes C, Flores-Gutierrez EO, et al. Immunomodulatory Effects Mediated by Dopamine. *J Immunol Res* 2016; 2016:3160486. doi: 10.1155/2016/3160486.
6. Papa I, Saliba D, Ponzoni M, Bustamante S, Canete PF, Gonzalez-Figueroa P, et al. T(FH)-derived dopamine accelerates productive synapses in germinal centres. *Nature* 2017;547:318-23. doi: 10.1038/nature23013.
7. Nourmohammadi K, Babaei-Balderlou F, Abtahi-Foroushani SM. Dopamine D2 Receptor Antagonist Alters the Testosterone Release and Kisspeptin/GPR54 Signaling in Food-Restricted Rats. *Iran J Sci Technol Trans Sci* 2021;45:1879-86. doi:10.1007/s40995-021-01196-z.
8. Ehrchen JM, Roth J, Barczyk-Kahlert K. More Than Suppression: Glucocorticoid Action on Monocytes and Macrophages. *Front Immunol* 2019; 10:2028. doi: 10.3389/fimmu.2019.02028.
9. Esmaili Gourvarchin Galeh H, Meysam Abtahi Froushani S, Afzale Ahangaran N, Hadai SN. Effects of Educated Monocytes with Xenogeneic Mesenchymal Stem Cell-Derived Conditioned Medium in a Mouse Model of Chronic Asthma. *Immunol Invest* 2018;47:504-20. doi: 10.1080/08820139.2018.
10. Torres KC, Antonelli LR, Souza AL, Teixeira MM, Dutra WO, Gollob KJ. Norepinephrine, dopamine and dexamethasone modulate discrete leukocyte subpopulations and cytokine profiles from human PBMC. *J Neuroimmunol* 2005;166:144-57. doi: 10.1016/j.jneuroim.2005.06.006.
11. McKenna F, McLaughlin PJ, Lewis BJ, Sibbring GC, Cummerson JA, Bowen-Jones D, et al. Dopamine receptor expression on human T- and B-lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and NK cells: a flow cytometric study. *J Neuroimmunol* 2002;132:34-40. doi: 10.1016/s0165-5728(02)00280-1.
12. Scriba A, Luciano L, Steiniger B. High-yield purification of rat monocytes by combined density gradient and immunomagnetic separation. *J Immunol Methods* 1996;189:203-16. doi: 10.1016/0022-1759(95)00248-0.
13. Abtahi Froushani SM, Abbasi A. Conditioned Medium of Mesenchymal Stem Cells Pulsed with Theobromine Can Instruct Anti-Inflammatory Neutrophils. *Zahedan J Res Med Sci* 2020;22:e86967. doi:10.5812/zjrms.86967.
14. Shushtari N, Abtahi Froushani SM. Caffeine Augments the Instruction of Anti-Inflammatory Macrophages by The Conditioned Medium of Mesenchymal Stem Cells. *Cell J* 2017;19:415-24. doi: 10.22074/cellj.2017.4364.
15. Fijalkowski K, Czernomysy-Furowicz D, Irwin JA, Nawrotek P, Pobuciewicz A. Secretory virulence factors produced by *Staphylococcus aureus* isolates obtained from mastitic bovine milk--effect on bovine polymorphonuclear neutrophils. *Res Vet Sci* 2012;93:82-7. doi: 10.1016/j.rvsc.2011.08.017.
16. Pacheco R, Riquelme E, Kalergis AM. Emerging evidence for the role of neurotransmitters in the modulation of T cell responses to cognate ligands. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2010;10:65-83. doi: 10.2174/187152410790780154.
17. Pacheco R. Targeting dopamine receptor D3 signalling in inflammation. *Oncotarget* 2017;8:7224-5. doi: 10.18632/oncotarget.14601.
18. Contreras F, Prado C, González H, Franz D, Osorio-Barrios F, Osorio F, et al. Dopamine Receptor D3 Signaling on CD4+ T Cells Favors Th1- and Th17-Mediated Immunity. *J Immunol* 2016;196:4143-9. doi: 10.4049/jimmunol.1502420.
19. Cosentino M, Bombelli R, Ferrari M, Marino F, Rasini E, Maestroni GJ, et al. HPLC-ED measurement of endogenous catecholamines in human immune cells and hematopoietic cell lines. *Life Sci* 2000;68:283-95. doi: 10.1016/s0024-3205(00)00937-1.
20. Arreola R, Alvarez-Herrera S, Pérez-Sánchez G, Becerril-Villanueva E, Cruz-Fuentes C,

- Flores-Gutierrez EO, et al. Immunomodulatory Effects Mediated by Dopamine. *J Immunol Res* 2016; 2016:3160486. doi: 10.1155/2016/3160486.
21. Haskó G, Szabó C, Németh ZH, Deitch EA. Dopamine suppresses IL-12 p40 production by lipopolysaccharide-stimulated macrophages via a β -adrenoceptor-mediated mechanism. *J Neuroimmunol* 2002;122:34-9. doi: 10.1016/s0165-5728(01)00459-3.
 22. Nolan RA, Muir R, Runner K, Haddad EK, Gaskill PJ. Role of Macrophage Dopamine Receptors in Mediating Cytokine Production: Implications for Neuroinflammation in the Context of HIV-Associated Neurocognitive Disorders. *J Neuroimmune Pharmacol* 2019;14:134-56. doi: 10.1007/s11481-018-9825-2.
 23. Dale RC, Merheb V, Pillai S, Wang D, Cantrill L, Murphy TK, et al. Antibodies to surface dopamine-2 receptor in autoimmune movement and psychiatric disorders. *Brain* 2012;135:3453-68. doi: 10.1093/brain/aws256.
 24. Beck G, Brinkkoetter P, Hanusch C, Schulte J, van Ackern K, van der Woude FJ, et al. Clinical review: immunomodulatory effects of dopamine in general inflammation. *Crit Care* 2004;8:485-91. doi: 10.1186/cc2879.
 25. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006;25:6680-4. doi: 10.1038/sj.onc.1209954.
 26. Albensi BC. What Is Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) Doing in and to the Mitochondrion? *Front Cell Dev Biol* 2019; 7:154. doi: 10.3389/fcell.2019.00154.
 27. Gaskill PJ, Carvallo L, Eugenin EA, Berman JW. Characterization and function of the human macrophage dopaminergic system: implications for CNS disease and drug abuse. *J Neuroinflammation* 2012; 9:203. doi: 10.1186/1742-2094-9-203.
 28. Cutolo M, Campitiello R, Gotelli E, Soldano S. The Role of M1/M2 Macrophage Polarization in Rheumatoid Arthritis Synovitis. *Front Immunol* 2022; 13:867260. doi: 10.3389/fimmu.2024.1394108.
 29. Bart VMT, Pickering RJ, Taylor PR, Ipseiz N. Macrophage reprogramming for therapy. *Immunology* 2021;163:128-44. doi: 10.1111/imm.13300.