

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

Hanieh Nikkhah<sup>1</sup> , Seyyed Meysam Abtahi Froushani<sup>1\*</sup> , Habib Dastmalchi Saei<sup>1</sup> ,  
Nahideh Afzale Ahangaran<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Dept 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  $5 \times 10^{-7}$  M dopamine, and then their phagocytosis performance, respiratory burst, killing ability, nitric oxide production, neutral red harvest, vital ability, and NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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<sup>۱</sup> ID، سید میثم ابطیحی فروشانی<sup>۱\*</sup> ID، حبیب دستمالچی ساعی<sup>۱</sup> ID، ناهیده افضل آهنگران<sup>۱</sup> ID

<sup>۱</sup> 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 به‌عنوان 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 نیتریک‌اکساید، 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 ندارند. با وجود این، میزان برداشت نوترال رد، شدت انفجار تنفسی و تولید نیتریک‌اکساید پس از چالش با مخمر اپسونیزه و همچنین میزان بیان NF-κB در مونوسیت‌های تیمار شده با دوپامین، نسبت به گروه شاهد، به‌طور 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 به‌طور پویا موجب ایجاد یک فنوتیپ ضدالتهابی در سلول‌های مونوسیت می‌شود، به‌طوری‌که این مونوسیت‌ها در کنار کاهش فعالیت بخش لیزوزومی، میزان کمتری از رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن را تولید می‌کنند.

**واژه‌های کلیدی:** دوپامین، مونوسیت، رت

**استاد:** 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): ۳۱-۱۷.

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 کاتکول‌آمین و فنتیل‌آمین‌ها است که چندین نقش مهم را در مغز و بدن بر عهده دارد؛ در مغز به‌عنوان یک نوروترانسمیتر عمل می‌کند، درحالی‌که خارج از دستگاه اعصاب مرکزی، عملکرد دوپامین در چندین بخش از دستگاه اعصاب محیطی به‌عنوان 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. هر دوی 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، به‌ویژه سلول‌های دندریتیک و لنفوسیت‌های T به‌خوبی 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 اکتسابی وجود دارد (۲). دوزیر خانواده 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 تحت‌گونه D2، D3 و D4 است که چرخه آدنیلات سیکلاز را مهار می‌کند (۷).

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

پیش‌سازهای مونوسیت‌ها هستند که از ردهٔ 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 به‌واسطهٔ 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، به‌عنوان سلول یاری‌دهندهٔ لنفوسیت‌های B و T عمل می‌کنند. خون محیطی به‌عنوان منبع اصلی این سلول‌ها به‌منظور مطالعه روی خصوصیات بیولوژیکی و ایمنی‌شناختی مونوسیت‌ها است (۹).

با وجود اینکه حضور گیرنده‌های پاسخ‌گو به دوپامین در سطح مونوسیت‌ها نشان داده شده است، عمدهٔ تحقیقات موجود دربارهٔ آثار دوپامین محدود به تأثیرات آن بر ایمونوفونوتیپ و قابلیت‌های مهاجرتی مونوسیت‌ها بوده؛ اما تاکنون تحقیق‌چندانی دربارهٔ 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 نیتریک‌اکساید، برداشت نوترال رد، قابلیت حیاتی و میزان بیان ژن NF-κB مونوسیت‌های خون محیطی رت پردازیم. هدف از این تحقیق ارزیابی آثار دوپامین بر میزان فاگوسیتوز، انفجار تنفسی، قابلیت کشتار، تولید نیتریک‌اکساید، 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: به‌منظور مطالعهٔ اثر دوپامین بر عملکرد مونوسیت‌های خون محیطی، دستکم از ۱۰ رأس رت نژاد ویستار شش الی هشت هفته استفاده شد. پس از

جداسازی مونسیت‌ها 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 مونسیت‌ها 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 مونسیت‌ها: ابتدا ۳ میلی‌لیتر خون هیپارینه 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 برداشت‌شده 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 استحصال‌شده با یک میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 به حالت سوسپانسیون درآمدند.

برای خالص‌سازی سلول‌های مونسیت از لنفوسیت‌های همراه، از خاصیت چسبندگی مونسیت‌ها 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 مونسیت 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 مونسیت‌ها با دوپامین: مونسیت‌های

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 مونسیت (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 الیزانگار در طول موج ۴۹۲ نتیجه کار قرائت گردید (۱۳).

آزمون برداشت نوترال رد: حجم برابر از سوسپانسیون مونسیت (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 برداشت‌نشده، 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 الیزانگار در طول موج ۴۹۲ نتیجه کار خوانده شد (۱۴).

ارزیابی قابلیت انفجار تنفسی سلول‌های مونسیت: نیم میلی‌لیتر از سوسپانسیون مونسیت (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 خانهٔ ته‌تخت 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):

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

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

ارزیابی میزان بیان ژن NF-κB: به منظور استخراج RNA از سلول‌های مونسیت تیمار شده با دوپامین و سلول‌های تیمار نشده با دوپامین از کیت استخراج RNA شرکت سیناکلون استفاده گردید (SinaPure, PR891620, RNA, Iran). غلظت RNA با استفاده از دستگاه NanoDrop<sup>TM</sup> 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 مونسیت‌ها با بافر PBS به حجم ۱/۵ میلی لیتر رسانیده و به خوبی پیتینگ شدند. در هر خانه پلیت ۹۶ خانه ته‌تخت، ۲۰۰ میکرولیتر از مونسیت‌ها 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 نتیجهٔ 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 مونسیت‌ها: به طور خلاصه، یک میلی لیتر سوسپانسیون مونسیت ( $106 \times 1$  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 مونسیت‌ها: نیم میلی لیتر سوسپانسیون مونسیت ( $106 \times 1$  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 ( $5 \times 106$  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

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

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 عکس برداری شد. برای Optical Analysis دانسیته باندهای حاصل از الکتروفوریز از نرم افزار ImageJ 2x استفاده گردید.

سیکل حرارتی برای تکثیر ژن‌های NF-κB 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 Trans Illuminator در انتها با انتقال ژل به دستگاه

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

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

زنده‌مانی و قابلیت حیاتی سلول‌های مونسیت پس از تیمار با دوپامین بود. بر اساس نتایج این تحقیق به نظر نمی‌رسد که میزان زنده‌مانی و قابلیت حیاتی سلول‌های مونسیت پس از مجاورت با دوپامین در حداکثر غلظت فیزیولوژیک (غلظت ۱۰-۵×۷ مولار) پس از گذشت ۲۴ ساعت تغییر معنی‌داری بیابد. شدت جذب نوری در گروه مونسیت‌های شاهد ۰/۵۴۸±۰/۰۹ و در مونسیت‌های 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 مونسیت‌ها: 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 به طوری معنی‌داری به کاهش قابلیت برداشت نوترال رد توسط سلول‌های مونسیت منجر شده است.

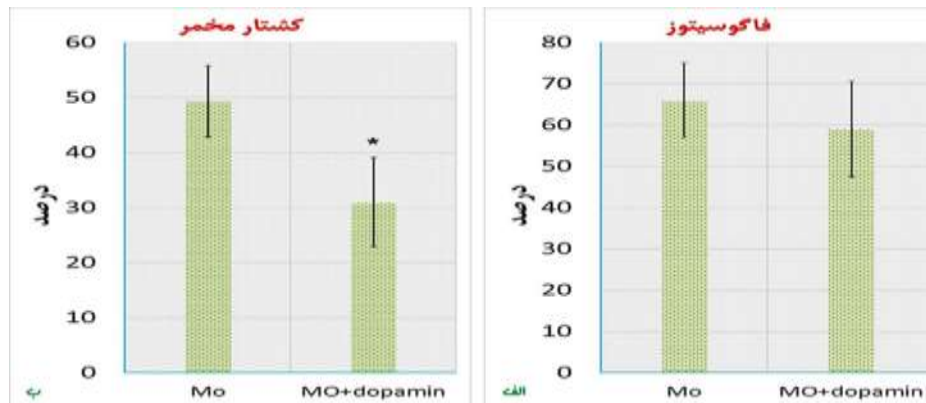
ارزیابی قابلیت اندوسیتوز مونسیت‌ها به دنبال تیمار با دوپامین: قابلیت اندوسیتوز، فاگوسیتوز و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیترژن پس از برداشت میکروب‌های اپسونیزه از جمله مهم‌ترین عملکردهای یک سلول مونسیت/ماکروفاژ است. نوترال رد رنگی کاتیونی است که پس از برداشته شدن توسط مونسیت‌ها در بخش لیزوزومی تغلیظ 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  $66/23 \pm 10/33$

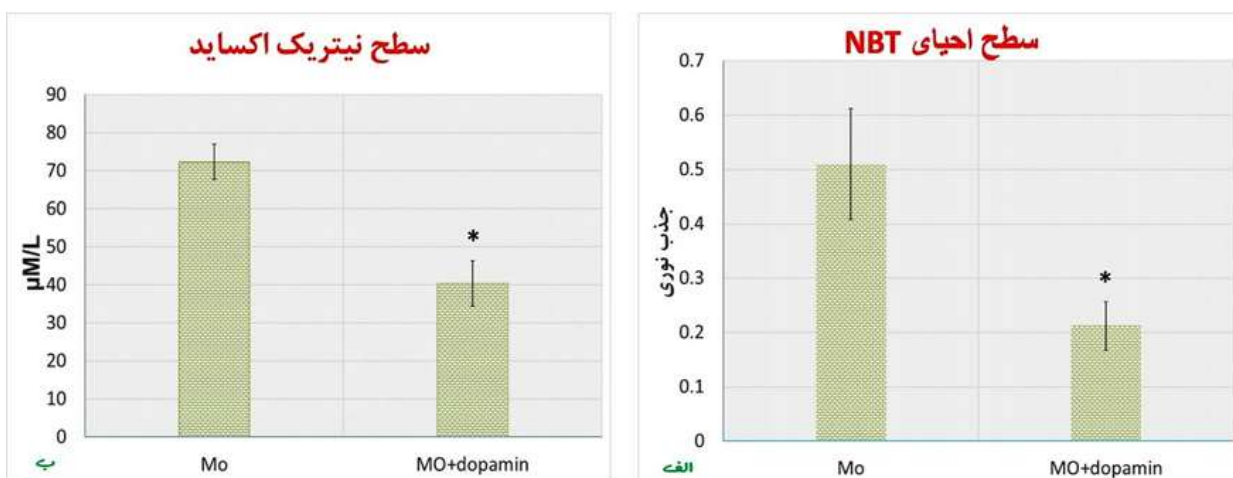


**نمودار شماره ۳.** ارزیابی میزان فاکوسیتوز (الف) و کشتن (ب) مخمر اپسونیزه توسط مونسیت‌ها (MO) پس از تیمار ۲۴ ساعته با دوپامین (۷- $5 \times 10^7$  مولار). \* نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  نسبت به گروه مونسیت‌های تیمار نشده است.

رادیکال‌های آزاد اکسیژن شده است. میزان جذب نوری قرائت‌شده در گروه مونسیت‌های شاهد  $0.54 \pm 0.13$  و در مونسیت‌های گروه تیمار  $0.24 \pm 0.09$  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).

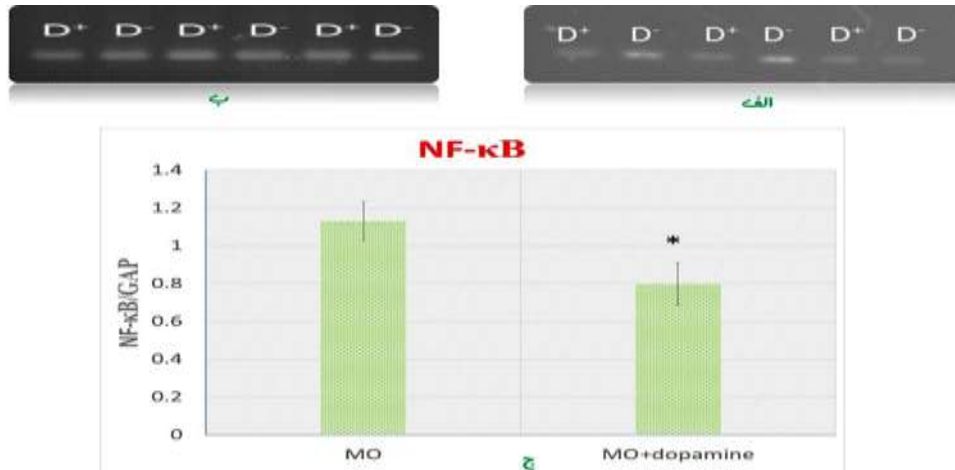
تأثیر تیمار دوپامین بر عملکردهای انفجار تنفسی و تولید نیتریک اکساید توسط مونسیت‌ها: سلول‌های فاکوسیت‌کننده پس از برداشت اجرام اپسونیزه، از طریق تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن اقدام به نابودی میکروب‌ها می‌کنند. آزمون احیای NBT شاخصی از شدت انفجار تنفسی توسط سلول‌های مونسیت است. رنگ NBT پس از 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- $5 \times 10^7$  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- $\kappa$ B در مونوسیت‌ها منجر شده است (نمودار شماره ۵).



**نمودار شماره ۵.** ارزیابی میزان بیان NF- $\kappa$ B توسط مونوسیت‌ها (MO) پس از تیمار ۲۴ ساعته با دوپامین ( $5 \times 10^{-7}$  مولار). محصولات RT-PCR حاصل از رنگ‌آمیزی DNA Safe Stain. نمونه‌های تیمار شده و تیمار نشده (GAPDH)، تصویر الف و NF- $\kappa$ 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

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 (پری‌مونوسیت‌ها) حاوی دوپامین، اپی‌نفرین و نوراپی‌نفرین داخل سلولی هستند. مونوسیت‌های CD14+ همچنین شامل تعدادی متابولیت‌ها از قبیل MT<sup>3</sup>، DHPG و MET هستند (۱۹)؛ با این حال، با مراجعه به منابع مختلف به نظر می‌رسد که بیشتر داده‌های موجود مربوط به

ارزیابی تیمار دوپامین بر بیان NF- $\kappa$ B در مونوسیت‌ها: NF- $\kappa$ B از مهم‌ترین عامل‌های نسخه‌برداری است که به دنبال برداشت اجرام اپسونیزه در سلول‌های فاگوسیت‌کننده فعال می‌شود. بر اساس یافته‌های این پژوهش، نسبت بیان NF $\kappa$ B/GAP در مونوسیت‌های شاهد  $1/16 \pm 0/71$

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 ماست‌سل‌ها 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  $5 \times 10^{-7}$  مولار است (۱۱، ۱۰).

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 صفاقی فعال شده با گیرنده دوپامینی D2R توسط آگونیست‌های (بروموکریپتین و کوبینپیرول)، ترشح نیتریک اکساید و TNF- $\alpha$  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 FC $\gamma$  و کمپلمان در ماکروفاژهای کوچک هندی افزایش یافته است که به مدت هفت روز، تحت تیمار با آگونیست‌های دوپامینی (بروموکریپتین، لئوپروئید و پرگولید) یا آنتاگونیست‌های دوپامین (کلرپرومازین، SCH23390، متوکلوپرامید، سولپیرید، ورالپیرید، آلزایپرید 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، در حالی 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 نیترا تیو (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. هر چند 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 ایمنونوپاتولوژیک 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- $\kappa$ B به واسطه LPS و همچنین اتصال NF- $\kappa$ B به پروموتور TNF- $\alpha$  به واسطه تحریک با LPS را مهار می‌کند؛ بنابراین، محققان نتیجه‌گیری کردند که دوپامین موجب مهار فعال شدن و جابه‌جا شدن NF- $\kappa$ B از سیتوپلاسم به هسته سلول‌های مونسیت می‌شود (۵). نتایج ما نیز نشان داد که همسو با تغییر سطح فعالیت سلول‌های مونسیت در تولید واسطه‌های فعال اکسیژن و نیتروزن، تیمار دوپامینی به مدت ۲۴ ساعت در حداکثر غلظت فیزیولوژیک، به کاهش معنی‌دار بیان NF- $\kappa$ B به‌عنوان یکی از عوامل اثرگذار در تولید واسطه‌های فعال اکسیژن و نیتروزن 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 ( $\mu$ 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 نشئت‌گرفته از مونسیت انسانی را با و یا بدون تحریک LPS تحریک می‌کند. ماکروفاژهای نشئت‌گرفته از مونسیت انسانی فعال‌شده با LPS که با غلظت بالای دوپامین ( $\mu$ M 2) و  $\mu$ M 20 تحریک شده بودند، ترشح IL-10 را افزایش دادند، درحالی‌که ترشح TNF- $\alpha$  در آن‌ها کاهش یافت. در مقابل، غلظت پایین دوپامین (20 nM و 200 nM) به‌طور ناچیزی، تنها بر ترشح TNF- $\alpha$  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 لاقط 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 مجنون)، 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- $\kappa$ B پروتئین هترودایمی است که در سیتوپلاسم سلول‌های در حال استراحت به‌صورت کمپلکس با پروتئین مهار I $\kappa$ B حضور دارد (۲۶، ۲۵). پس از فعال شدن مسیرهای پیام‌رسانی به علت تحریک مونسیت‌ها با اجزای عوامل عفونی، I $\kappa$ B جداشده و NF- $\kappa$ B آزادشده 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 نیتروزن بازی می‌کند. به سبب نقش گسترده این عامل در فعالیت دستگاه ایمنی به‌عنوان واسط مرکزی پاسخ‌های ایمنی نامیده شده است (۲۶). در یک تحقیق جالب، به میزان تغییر اتصال NF- $\kappa$ B به DNA در مونسیت‌های استحصالی از خون محیطی انسان و یا رده‌های سلول مونسیت 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 مونسیت‌ها را کاهش می‌دهد؛ اما این کاهش‌ها با توجه به تغییر نکردن قدرت حیاتی سلول‌های مونسیت 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 عمدتاً باعث تغییر برنامه‌ریزی و نه مهار سلول‌های مونسیت می‌گردد.

رنگ نوترال رد رنگی کاتیونی است که به صورت غیراِسونیک 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 مونسیت 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 عمدتاً مرتبط با تغییر قابلیت‌های غشایی و همچنین تغییر فعالیت بخش لیزوزومی مونسیت‌ها 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 مونسیت 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 مونسیت‌ها پس از مهاجرت به بافت، بسته به شرایط، قادر به تبدیل به حداقل دو

نوع ماکروفاژ هستند. در کنار ریز محیط بافتی که مونسیت‌ها به آن وارد شده‌اند، وضعیت خود مونسیت‌ها 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 پاتوژن‌ز 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 مونسیت 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 مونسیت‌های 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 مونسیت تیمار شده با دوپامین نسبت به گروه شاهد نیز، تأییدی بر تغییر در برنامه‌ریزی و پلاریزه شدن سلول‌های مونسیت‌ها پس از مجاورت با دوپامین است.

در کل به نظر می‌رسد که دوپامین به طور پویا موجب ایجاد یک رخ‌نمود ضدالتهابی در سلول‌های مونسیت می‌گردد، به طوری که این مونسیت‌ها 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 منافی 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 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

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Fijalkowski K, Czernomysy-Furowicz D, Irwin JA, Nawrotek P, Pobucewicz 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.
- 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.
- Pacheco R. Targeting dopamine receptor D3 signalling in inflammation. *Oncotarget* 2017;8:7224-5. doi: 10.18632/oncotarget.14601.
- 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.
- 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.
- 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  $\beta$ -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- $\kappa$ 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.