

## بررسی تاثیر داروی ریسپیریدون در مهار تکثیر انگل توکسوپلازما گوندی در مغز موش

مرجان انشاییه<sup>۱</sup>، گیتا سعادت نیا\*<sup>۱</sup>، جلال بابایی<sup>۳</sup> و مجید گلکار<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

<sup>۲</sup> گروه زیست‌شناسی، موسسه آموزش عالی نقش جهان، بهارستان، اصفهان، ایران

<sup>۳</sup> بخش انگل‌شناسی مولکولی، گروه انگل‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۲

### چکیده

افراد آلوده به توکسوپلازما گوندی مستعد ابتلا به اختلالات رفتاری روانی، به ویژه اسکیزوفرنی و دوقطبی هستند. داروهای ضدسایکوز و تثبیت‌کننده‌های خلق، مانع تکثیر تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلازما گوندی در شرایط آزمایشگاهی می‌شوند لیکن، نتایج درمورد حیواناتی که تحت درمان با چنین داروهایی قرار گرفته‌اند متناقض است. در این مطالعه، از Quantitative real-time PCR (qPCR) برای تعیین دقیق میزان نسخه‌برداری BAG1 و SAG1 (به ترتیب پروتئین اختصاصی مرحله برادی‌زوئیت و تاکی‌زوئیت توکسوپلازما گوندی) و تعداد رونوشت قطعه REP529 (قطعه تکراری از DNA انگل) در مغز موش‌های NMRI مبتلا به عفونت مزمن و تحت درمان با داروی اعصاب ریسپیریدون، استفاده شد. نتایج نشان داد که درمان با این دارو به طور قابل توجهی منجر به مهار عفونت مزمن و کاهش تعداد رونوشت BAG1، SAG1 و REP529 در مغز موش‌ها ( $P < 0.0001$ ) می‌شود که قابل مقایسه با کوتریموکسازول، داروی استاندارد برای درمان عفونت توکسوپلازمایی ( $P > 0.05$ ) می‌باشد. علاوه بر این، بیان TNF- $\alpha$  در مغز پس از تیمار با داروی آزمایش شده به طور قابل توجهی کاهش یافت ( $P < 0.0001$ ) که نتایج قابل مقایسه‌ای با داروی کوتریموکسازول ( $P > 0.05$ ) فراهم آورد. بررسی بافت‌شناسی مغز موش‌ها، کاهش قابل توجهی در استقرار کیست، نفوذ اطراف عروقی لنفوسیت‌ها، گره‌های گلیال و التهاب مغزی در موش‌های تیمار شده با داروی مورد آزمایش، به همان میزان گروه کوتریموکسازول نشان داد. این نتایج برای اولین بار شواهد مستقیمی در مورد اثر این داروی ضد روان‌پریشی در برابر عفونت مزمن توکسوپلازمایی ارائه می‌کند. این نتایج می‌تواند به تعدیل رژیم‌های درمانی برای بیماران اسکیزوفرنی و طراحی داروهای موثرتر ضد توکسوپلازمایی کمک کند.

واژه‌های کلیدی: توکسوپلازما گوندی، اختلالات عصبی، ریسپیریدون، PCR

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: [gitasaadat@irost.ir](mailto:gitasaadat@irost.ir)

### مقدمه

حدود یک‌سوم جمعیت جهان به انگل توکسوپلازما گوندی آلوده هستند. این انگل تک‌یاخته‌ای نوروتروپیک است که قابلیت ایجاد عفونت در تمامی حیوانات خون‌گرم را دارد. انتقال انگل عمدتاً از طریق مصرف آب یا غذای آلوده به اووسیت‌های

دفع‌شده از گربه‌سانان آلوده، که میزبان قطعی انگل هستند، صورت می‌گیرد. همچنین مصرف گوشت نیم‌پخته حاوی کیست‌های بافتی انگل می‌تواند منجر به انتقال آن شود. پس از ورود انگل به بدن میزبان، تاکی‌زوئیت‌ها به سرعت در سلول‌های روده تکثیر یافته و از طریق جریان خون به بافت‌های مختلف، از جمله سیستم عصبی مرکزی گسترش می‌یابند. در پاسخ به فشار ایمنی بدن، این تاکی‌زوئیت‌ها به برادی‌زوئیت‌هایی با تکثیر آهسته تبدیل شده و در قالب کیست‌های بافتی، عمدتاً در مغز و عضلات، برای مدت طولانی یا حتی تمام عمر باقی می‌مانند (۹، ۱۶، ۲۴).

در سال‌های اخیر، ارتباط میان عفونت مزمن توکسوپلازما گوندی و بروز اختلالات روانی، به‌ویژه اسکیزوفرنی، توجه بسیاری را جلب کرده است (۲۱). شواهد اپیدمیولوژیک، بالینی و مطالعات تجربی در مدل‌های حیوانی و آزمایشگاهی، همگی بر این ارتباط دلالت دارند (۳، ۲۰، ۲۳). از آنجایی که برخی از داروهای ضد روان‌پریشی و تثبیت‌کننده‌های خلق نیز فعالیت ضد ویروسی و ضد انگلی از خود نشان داده‌اند، این احتمال مطرح شده که این داروها ممکن است در کنترل عفونت ناشی از توکسوپلازما گوندی نیز نقش داشته باشند. برای مثال، مشخص شده که متابولیت فعال ریسپریدون (9-OH-risperidone) دارای فعالیت ضد انگلی متوسط است، در حالی که کلوزاپین و اولانزاپین اثر ضعیف‌تری دارند (۱۰).

در همین راستا، مطالعه‌ای گسترده نشان داد که بیماران مبتلا به اختلالات روان‌پریشی که با داروهای دارای فعالیت ضد توکسوپلازمایی (+TATA) درمان شده‌اند، پاسخ بالینی بهتری نسبت به بیماران دریافت‌کننده داروهای فاقد این فعالیت (-TATA) داشته‌اند، ریسپریدون یکی از داروهای بررسی‌شده در این مطالعه بود (۴). همچنین، در مطالعه‌ای دیگر مشاهده شد که سطح آنتی‌بادی IgG ضد توکسوپلازما در مایع مغزی نخاعی (CSF) و سرم بیماران مبتلا به اسکیزوفرنی درمان‌نشده، به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل سالم بود. این سطح پس از درمان ضد روان‌پریشی کاهش یافته و به سطح گروه شاهد نزدیک شد (۱۳) با این وجود، تجویز داروهای ضد روان‌پریشی و تثبیت‌کننده‌های خلق در مدل‌های حیوانی، منجر به محافظت کامل در برابر عفونت مزمن با این انگل نشده است (۶، ۱۷، ۱۸).

یکی از دلایل احتمالی این تناقض، زمان‌بندی نامناسب تجویز دارو یا استفاده از روش‌های کم‌دقت مانند شمارش میکروسکوپی کیست‌های انگلی برای ارزیابی اثربخشی داروها است. در این میان، شمارش تعداد برادی‌زوئیت‌ها درون کیست‌ها ممکن است شاخص دقیق‌تری برای بررسی اثر داروها باشد.

با توجه به یافته‌های متناقض پیشین، در مطالعه حاضر، ریسپریدون به عنوان یک داروی ضد روان‌پریشی نسل دوم، به منظور ارزیابی فعالیت ضد توکسوپلازمایی مورد بررسی قرار گرفته است. هدف این مطالعه، بررسی بیان ژن‌های اختصاصی برادی‌زوئیت (BAG1) و تاکی‌زوئیت (SAG1) به روش Real-time PCR است. برای این منظور، پلاسمید حاوی cDNA این دو ژن جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شده و بیان آن‌ها در بافت مغز موش‌های مورد مطالعه اندازه‌گیری گردیده است. همچنین ژن REP-529، به عنوان یک توالی تکرارشونده اختصاصی توکسوپلازما گوندی، جهت تعیین بار انگلی به کار رفته است. در صورتی که ریسپریدون بتواند تکثیر یا فعالیت تاکی‌زوئیت‌ها و برادی‌زوئیت‌ها را مهار کند، انتظار می‌رود که بیان ژن‌های BAG1 و SAG1 کاهش یابد.

## مواد و روشها

### حیوانات مورد استفاده و طراحی گروه‌های مورد مطالعه

در این مطالعه از ۴۵ سر موش سوری نر نژاد ان ام آر آی با سن حدود ۵ هفته و میانگین وزنی معادل ۲۰ تا ۲۵ گرم در محل انستیتو پاستور تهران استفاده شد. توزین حیوانات قبل از آلوده‌سازی انجام پذیرفت. حیوانات به ۵ گروه ۹ تایی تقسیم شدند. یک گروه شاهد آلوده بدون دریافت دارو، یک گروه شاهد غیر آلوده، یک گروه برای بررسی اثر داروی ضد توکسوپلازما (کوتریماکسازول)، یک گروه برای بررسی اثر داروی ریسپریدون و یک گروه برای دریافت حلال دارویی در نظر گرفته شد. تمامی آزمایشات با توجه به قوانین مرتبط با حقوق حیوانات موسسه پاستور انجام پذیرفت (شماره تأییدیه کمیته اخلاق ۱۳۰۸۵-۰۲۰۱). در این تحقیق از توکسوپلازماگوندی سوش تهران (سویه تیپ II) استفاده شد (۵). برای القای عفونت توکسوپلازما در موش‌ها، ده کیست مغزی معلق در ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین (PBS) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. موش‌ها به مدت یک تا دو ماه مشاهده شدند و پس از آن مغز آنها برداشته شد و کیست‌های مغزی زیر میکروسکوپ شمارش شدند. عفونت توکسوپلازما توسط ۲۰ کیست مغزی به صورت داخل صفاقی القا شد.

### تهیه دارو و تیمار حیوانات

برای تایید آلودگی با انگل چهار هفته پس از آلودگی (قبل از شروع دارو درمانی) از حیوانات خون گرفته شد و به روش الیزا وجود آنتی بادی اختصاصی علیه توکسوپلازما در سرم حیوانات بررسی گردید. برای انجام الیزا از آنتی بادی Goat anti-mouse IgG (Cat NO: 97023) استفاده شد و مراحل الیزا مطابق با شرایط کیت پیشنازطب (Toxoplasma IgG kit) انجام داده شد. دارو درمانی ۲۸ روز پس از عفونت شروع شد و به مدت ۱۴ روز ادامه یافت. تجویز داروی ریسپریدون (داروسازی رها، اصفهان، ایران) به صورت داخل صفاقی انجام شد. ریسپریدون در ابتدا با استفاده از HCL (۱۰Mm) رقیق شده و پس از آن با رقیق سازی در PBS و افزایش pH مورد استفاده قرار گرفت. مقدار نهایی در نظر گرفته شده برای داروی ریسپریدون با تکیه بر مطالعات قبلی معادل ۲۰٪ مقدار کشنده دارویی (میزان معادل ۶mg/Kg روزانه) به مدت ۱۴ روز در نظر گرفته شد (۱۲، ۱۹). از آنتی‌بیوتیک کوتریماکسازول به عنوان داروی ضد انگلی استفاده گردید (ترکیب ۴۰۰mg سولفومتاکسازول و ۸۰mg تریمتوپریم، شرکت دارویی کاسپین، ایران) به ۸۰۰ میلی‌لیتر از آب آشامیدنی روزانه موش‌های سوری (برابر با ۹۵ میلی‌گرم/کیلوگرم/۲۴ ساعت) به مدت ۱۰ روز اضافه شد. گروه شاهد نیز حلال دارویی یعنی بافر فسفات را دریافت کردند.

### ارزیابی هیستوپاتولوژی حیوانات

پس از دارو درمانی، نمونه مغزی از سه سر موش تهیه شده و پس از آماده سازی و تهیه برش‌های ۵ میکرونی، میزان التهاب و ضایعات عصبی تعیین گردید. برش مقاطع به صورت ۵μm با استفاده از دستگاه میکروتوم تهیه گردید. همچنین وجود انگل با رنگ آمیزی همتوکسیلین-ائوزین و مشاهده مستقیم کیست‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری متصل به دوربین دیجیتال (ToupTek E3ISPM) تایید گردید.

تاثیر دارو درمانی در کاهش تجمع لنفوسیت‌ها به صورت گره‌های گلپال، تراوش لنفوسیت‌ها، التهاب پیرامون رگ، نکروز بافتی، التهاب پرده منژ و التهاب مغزی بررسی گردید. تعدادی از مقاطع بافتی به روش نمونه‌گیری تصادفی سیستماتیک

انتخاب شده و با استفاده از رنگ هماتوکسیلین و اتوزین (H&E) رنگ آمیزی شد. پس از آن با استفاده از میکروسکوپ نوری (ToupTek E3ISPM) مورد بررسی قرار گرفت.

### استخراج DNA و RNA از مغز موش و تهیه cDNA

از مغز شش موش در هر گروه DNA و RNA با استفاده از کیت تجاری شرکت کیاژن تخلیص شد. کیت Qiagen (DNAeasy Blood & Tissue Kit, No.69504) برای استخراج DNA استفاده شد. برای این منظور، نیمی از مغز منجمد در ۵۰۰ میکرولیتر PBS با ۲۰ بار عبور از سرنگ، همگن شد. ۵۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل با استفاده از کیت DNAeasy Blood & Tissue از کیاژن خالص سازی شد. در مورد استخراج RNA، نیمه دیگر مغز در ۵۰۰ میکرولیتر معرف کیاژن از کیاژن همگن شد. از این همگن، ۱۰۰ میکرولیتر برای خالص سازی RNA، با کیت کیاژن استفاده شد (RNAeasy plus universal mini k)، سپس RNA خالص شده برای تهیه cDNA با استفاده از کیت رونویسی معکوس QuantiTect کیاژن مورد استفاده قرار گرفت. ساخت cDNA طبق دستورالعمل کیت کیاژن (QuantiTectReverse Transcription kit, No. 205311) انجام شد.

### بررسی میزان بیان ژن‌های SAG1 و BAG1 و تعداد رونوشت قطعه REP-529

یک PCR کمی دوطرفه (qPCR) طبق رفرنس با استفاده از سه مجموعه مجزا از پرایمرها و پروب‌ها برای SAG1، BAG1 و REP-529 انجام شد (۱). شماره دسترسی توالی قطعات SAG1، BAG1 و REP-529، در سایت NCBI به ترتیب، عبارت است از: X82213، XM-002368164 و AF146527. فهرست پرایمرهای استفاده شده برای تکثیر قطعات مورد نظر در RT-qPCR و جدول شماره ۱ آمده است. تعداد رونوشت های SAG1، BAG1 و شماره های رونوشت REP-529 با مقایسه آنها با منحنی های استاندارد تولید شده به طور همزمان تعیین شدند. لازم به توضیح است بررسی تعداد رونوشت cDNA از ژن‌های BAG1 و SAG1 و نیز تعداد رونوشت توالی REP-529 با روش RT-qPCR (Absolute Real Time qPCR) انجام داده می‌شود. پروتئین‌های ساختاری BAG1 و SAG1 اختصاصی برادی‌زوئیت و تاکی‌زوئیت انگل هستند و به عنوان شاخص تعداد برادی‌زوئیت و تاکی‌زوئیت اندازه‌گیری می‌شوند. قطعه REP-529 توالی تکرار شونده در ژنوم انگل می‌باشد که ۲۰۰-۳۰۰ بار در ژنوم تکرار شده است. تکثیر این قطعه در RT-qPCR تایید کننده وجود خود انگل فارغ از شکل انگل (تاکی‌زوئیت یا برادی‌زوئیت) می‌باشد. برنامه دمایی مرتبط با انجام RT-PCR در جدول شماره ۲ آمده است.

### محاسبه میزان بیان TNF- $\alpha$ مغز با استفاده از qPCR

برای محاسبه میزان نسخه‌های TNF- $\alpha$  (accession number: NM\_013693) از qPCR و پروب و پرایمرهای موجود در جدول شماره ۱ استفاده شد (۲). میزان نسخه‌های TNF- $\alpha$  با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمده مورد محاسبه قرار گرفت.

## تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  SD ارائه داده شدند. از نرم افزار GraphPad Prism نسخه 8.0.2 نیز برای محاسبات آماری استفاده شد. استاندارد بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk انجام شد و پس از آن از تجزیه و تحلیل ANOVA استفاده شد. با توجه به تعدد گروه‌ها و کمی بودن متغیرهای اندازه‌گیری شونده از تحلیل واریانس یک طرفه جهت بررسی تفاوت گروه‌ها استفاده شد. در همه جا  $P < 0.05$  ملاک وجود تفاوت معنی دار بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

## نتایج

در بررسی مقاطع بافت‌شناسی مغز موش‌های آلوده به توکسوپلازما در مرحله مزمن و بدون دریافت درمان دارویی، کیست‌های انگلی به همراه نشانه‌هایی از التهاب مانند گره‌های گلیال، تراوش برون‌عروقی لنفوسیت‌ها و التهاب بافت مغزی مشاهده گردید. در مقابل، در موش‌های آلوده‌ای که با داروی ضدروان‌پریشی ریسپریدون یا آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول درمان شده بودند، این علائم التهابی کاهش یافت.

یافته‌های کمی هیستوپاتولوژیک نیز نشان داد که میزان تراوش برون‌عروقی لنفوسیت‌ها، گره‌های گلیال و کیست‌های مغزی در گروه‌های درمان‌شده، به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه حلال و گروه آلوده کاهش یافته است ( $P < 0.01$ ) نتایج در جدول شماره ۳ خلاصه گردیده است. همچنین، تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه‌های دریافت‌کننده ریسپریدون و کوتریموکسازول مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ) (شکل ۱).

تحلیل میزان بیان ژن SAG1 نشان داد که در گروه ریسپریدون، میزان رونویسی این ژن نسبت به گروه‌های شاهد آلوده و کوتریموکسازول به ترتیب ۴ و ۷/۰ برابر کاهش یافته است. آزمون نرمال بودن داده‌ها با روش Shapiro-Wilk انجام شد و پس از تأیید نرمال بودن، آنالیز آماری با ANOVA یک‌طرفه صورت گرفت. نتایج نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های دارویی و گروه شاهد آلوده ( $P < 0.0001$ ) بود، اما تفاوت معنی‌داری بین گروه ریسپریدون و کوتریموکسازول مشاهده نگردید ( $P > 0.05$ ) (شکل ۲ الف).

بیان ژن BAG1 نیز در گروه ریسپریدون نسبت به گروه آلوده و گروه کوتریموکسازول به ترتیب ۱/۳ و ۶/۰ برابر کاهش یافت (شکل ۲ ب). به‌علاوه، بررسی بیان توالی ژنومی REP-529 نشان داد که میانگین تعداد رونوشت این توالی در گروه ریسپریدون نسبت به گروه آلوده و کوتریموکسازول به ترتیب ۲/۶ و ۳/۱ برابر کاهش داشته است (شکل ۲ ج). این نتایج بیانگر آن است که اثر مهارتی ریسپریدون بر انگل مشابه یا حتی بیش از کوتریموکسازول بوده است. همانطور که مشخص است تزریق حلال دارویی نیز تأثیری در کاهش رونویسی هیچ یک از پارامترهای مورد بررسی نداشته است. میزان بیان  $TNF-\alpha$  نیز در گروه ریسپریدون به‌طور قابل توجهی کاهش یافت ( $P < 0.0001$ ) که با اثر کوتریموکسازول قابل مقایسه بود ( $P > 0.05$ ) (شکل ۳). گروه حلال تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد آلوده نشان نداد.

۱. پرایمرهای استفاده شده برای تکثیر قطعات SAG1, BAG1, REP-529, و TNF- $\alpha$  در PCR و RT-qPCR

نام پرایمر	توالی 5' to 3'	ناحیه اتصال پرایمرها (bp) روی توالی‌ها
F BAG1	5'-CAGTGCAAGATAATAAATAGTAC-3'	616 – 633
R BAG1	5'-GGACAAGTCCTCTAAAGA-3'	725 – 742
Probe BAG1	5'-FAM-AAGAAGACCTCCCGTTTGCTG-BHQ1-3'	696 – 717
F SAG1	5'-CCTCAAGACAACAATCAG-3'	801 – 823
R SAG1	5'-CACCATTATCACTCGAAG-3'	908 – 926
Probe SAG1	5'-HEX-CTGCCACGGGTTCTCACTTAAT-BHQ1-3'	837 – 857
REP-529 Forward	5'-TCTCGTCGCTTCCCAACCA-3'	several locations
REP-529 Reverse	5'-GTGCTTGGAGCCACAGAAGG-3'	several locations
REP-529 Probe	5'-ROX- CCACCCTCTCATCCTCACCCCTCGCC- BHQ2-3'	several locations
TNF- $\alpha$ Forward	CACGTCGTAGCAAACCACCA	-
TNF- $\alpha$ Reverse	CAGCCTTGTCCTTGAAGAGAA	-
TNF- $\alpha$ probe	CAATGCACAGCCTTCTCACAGAGCCA	-

جدول ۲. جدول دمایی مرتبط با انجام RT-PCR

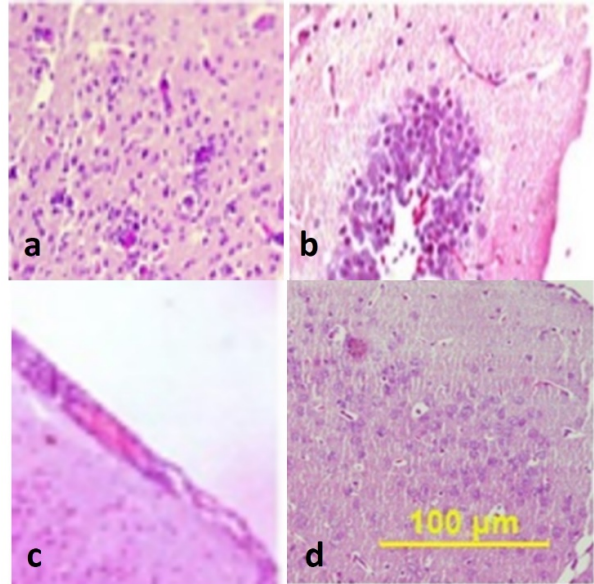
1 cycle	Hot start	15 min	95 °C
		5 sec	95 °C
45 cycles	Annealing (Touch down)	10 sec	55 °C
		10 sec	72 °C
	End	10 sec	72 °C

جدول ۳. سنجش کیست مغزی، نفوذ اطراف عروقی و گره‌های گلپال در بخش‌های مختلف مغز موش‌ها

گروه‌های دارویی*	کیست*	گره‌های گلپال*	تراوش عروقی
گروه سالم	۰	2.3 (1.0)	4.0 (2.3)
گروه آلوده	10.3 (2.1)	32.7 (10.0)	243.1 (78.5)
گروه حلال	9.7 (2.8)	35.3 (8.1)	221.3 (91.1)
گروه TMP/SMZ یا کوتریماسازول	3.7 (1.0)	11 (2.6)	90.6 (18.1)
ریسپریدون	2.7 (1.1)	13.1 (6.3)	83.2 (19.0)

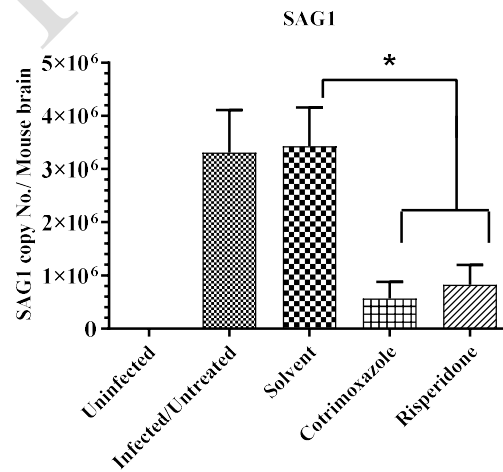
داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  SD نشان داده شده است.

\* موش‌ها با توکسوپلازما گوندی آلوده شده و در هفته چهارم پس از آلودگی به مدت دو هفته تحت درمان با داروی ریسپریدون و کوتریماکسازول قرار گرفتند و به طور معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) کیست، تراوش اطراف عروقی و گره‌های گلیال کمتری نسبت به موش‌های آلوده (بدون تیمار دارویی) نشان دادند.

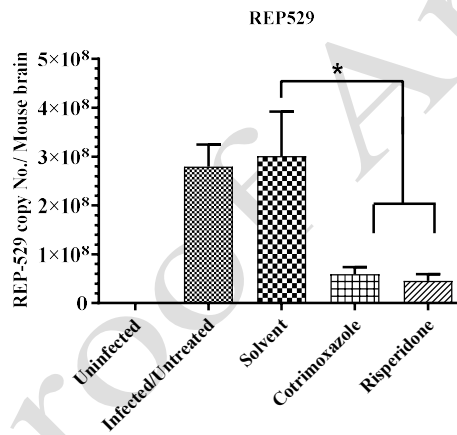
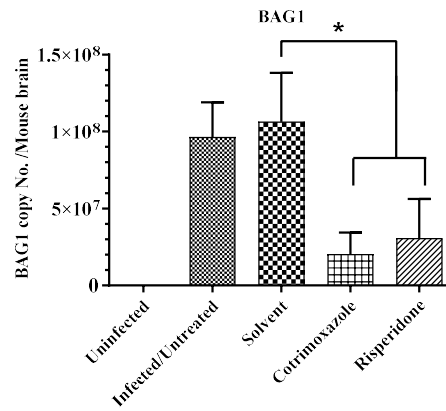


شکل ۱. بررسی بافت‌شناسی مغز موش‌ها با رنگ‌آمیزی H&E

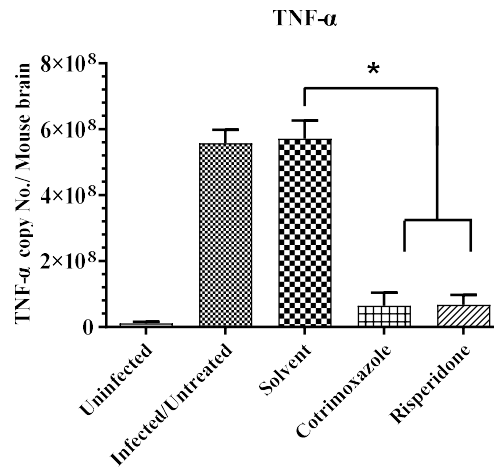
الف) ضایعات هیستوپاتولوژی مرتبط با عفونت مزمن توکسوپلازمایی در موش‌هایی که حلال دارویی دریافت کرده‌اند. ب) تصویر مرتبط با گروه دریافت‌کننده داروی ریسپریدون. ج) تصویر التهاب مغزی مربوط به گروه شاهد آلوده. د) نماینده مغز موش‌هایی که داروی کوتریماکسازول دریافت کرده‌اند.



الف



شکل ۲. مقایسه میزان بیان ژن های مورد بررسی در گروه های مختلف. تعداد ۶ عدد موش در هر گروه برای qPCR مورد بررسی قرار گرفت. میزان خطا با توجه به میانگین داده ها و انحراف معیار در گروه ۶ تایی موش های مورد بررسی نشان داده شده است. نتایج به دست آمده مربوط به دو آزمایش کاملاً مستقل است که نتایج مشابهی به دست آمده است (\*\*:  $P < 0.0001$ ). الف. BAG1 به عنوان شاخصی برای میزان تاکی زونیت انگل ب. BAG1 به عنوان شاخصی برای میزان کیست های انگل ج. REP-529 به عنوان شاخصی برای میزان انگل



شکل ۳. مقایسه میزان بیان TNF- $\alpha$  در موش‌های تحت درمان با ریسپریدون، گروه کوتریماکسازول و گروه‌های شاهد با استفاده از روش qPCR پس از ۱۴ روز دارودرمانی، (\*\*:  $P < 0.0001$ ).

## بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تکثیر انگل در کیست‌های مغزی موش‌های آلوده و درمان‌نشده ادامه دارد که با داده‌های مطالعات پیشین هم‌خوانی دارد. در مقابل، درمان با ریسپریدون و کوتریماکسازول منجر به مهار چشمگیر تکثیر انگل شد. کاهش بیان ژن BAG1 و REP-529 در گروه‌های درمان‌شده بیانگر اثر مهاری این داروها بر بایزویت‌های درون کیست‌ها است. مقایسه میانگین بیان این ژن‌ها نیز نشان می‌دهد که اثر داروی ریسپریدون هم‌تراز و در مواردی حتی مؤثرتر از کوتریماکسازول است.

همچنین، بررسی‌های هیستوپاتولوژیک نشان داد که ریسپریدون موجب کاهش التهاب مغزی ناشی از عفونت توکسوپلازما می‌شود. این یافته‌ها مؤید اثر ضدالتهابی و احتمالی ضدتوکسوپلازمایی ریسپریدون است. مکانیسم اثر احتمالی این دارو ممکن است ناشی از مهار مسیرهای وابسته به کلسیم در انگل باشد، که با توجه به اثرات شناخته‌شده ریسپریدون بر گیرنده‌های D2 و HT2a $\alpha$  منطقی به نظر می‌رسد (۲۵). همچنین، رهاسازی کلسیم از ذخایر داخل سلولی و اختلال در تنظیم آن ممکن است منجر به مرگ انگل شود (۱۴، ۱۵، ۲۲).

این احتمال وجود دارد که ریسپریدون از سد خونی مغزی عبور می‌کند به واسطه تداخل در انتقال کلسیم در میکروگلیال و سایر سلول‌های مغزی منجر به ممانعت از تکثیر برادی‌زویت‌ها شوند. به این ترتیب، کاهش میزان TNF- $\alpha$  و همچنین کاهش میزان ضایعات هیستوپاتولوژیک در مغز موش‌های تیمار شده با ریسپریدون ممکن است به دلیل فعالیت ضدتوکسوپلازمایی و ضدالتهابی این دارو باشد.

با توجه این‌که کیست‌های مغزی بعد از تولید توسط سیستم ایمنی قابل حذف نیستند، تعداد برادی‌زویت‌های داخل کیست، و نه تعداد کیست، معیار مناسب‌تری برای ارزیابی اثر ضد توکسوپلازمایی داروها هستند. در این مطالعه تأثیر داروی ریسپریدون در مهار عفونت مزمن توکسوپلازما بررسی شد. به بیان دیگر مهار تکثیر برادی‌زویت و یا تاکی‌زویت در مغز موش آلوده و

درمان شده با این دارو مورد بررسی قرار گرفت. این هدف با اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های BAG1 و SAG1، به ترتیب اختصاصی برادی‌زوئیت و تاکی‌زوئیت با روش absolute quantitative real-time PCR محقق شد. داروی فوق توانست تکثیر تاکی‌زوئیت و برادی‌زوئیت را در مغز کاهش معنی‌دار دهد و اثر مهاري آن مشابه داروی استاندارد توکسوپلاسمایی، کوتریموکسازول، بود. این برای اولین بار است که تاثیر این دارودر مهار عفونت مزمن در *In vivo* نشان داده می‌شود. در مطالعات قبلی، کاهش تعداد کیست مغزی، به عنوان معیار اثر مهار کننده عفونت مزمن این دارو در نظر گرفته شده بود و کاهش در تعداد کیست مشاهده نکردند (۶، ۷، ۱۷). تناقض نتایج ما با چند مطالعه پیشین ممکن است خطای زیاد روش شمارش میکروسکوپی تعداد کیست در مغز باشد. در این مطالعه ما از روش استاندارد شده absolute quantitative real-time PCR برای اندازه‌گیری تعداد ژن‌های شاخص تاکی‌زوئیت و برادی‌زوئیت استفاده کردیم.

همچنین مطالعه هیستولوژی روی مغز موش‌ها نشان داد که عفونت توکسوپلازما باعث التهاب شدید مغزی می‌شود که با *perivascular cuffing* و رگ‌زایی عمدتاً مشخص می‌شود. در حالی‌که داروی مورد استفاده و کوتریموکسازول علاوه بر کاهش تعداد کیست توانستند شاخص‌های التهابی ذکر شده را کاهش دهند، گروهی که فقط حلال دارویی را گرفته بودند چنین اثری نداشتند. کاهش التهاب مغزی خود نشانه اثر این دارو در مهار عفونت مزمن توکسوپلاسمایی است. نتایج مطالعه ما از چند جهت اهمیت دارند. ممکن است رژیم درمانی بعضی بیماران اسکیزوفرنی را بتوان تغییر داد، از داروی فوق یا از درمان استاندارد علیه توکسوپلازما استفاده کرد، تا بهتر بتوان علایم بیماری را شاهد کرد. همچنین ممکن است بتوان، با توجه به ساختمان داروی فوق، مطالعات جدیدی برای یافتن داروهای موثرتر علیه مرحله مزمن عفونت پیدا کرد.

در مطالعه‌ای تاثیر داروهای ضد سایکوز متفاوتی مورد بررسی قرار داده شد. در بین این داروها هالوپریدول و ریسپریدون و همچنین یک داروی تثبیت کننده خلق (والپرات) مورد بررسی قرار داده شد، طبق گزارشی که در این مطالعه داده شده است والپرات دارای تاثیر ضد توکسوپلاسمایی بر رشد انگل نبوده و هالوپریدول و ریسپریدون نیز با تاثیر متوسطی گزارش داده شده‌اند. هر چند فلوفنازین (مربوط به کلاس فنوتیازین) و زوکلوپتیکسول (از داروهای نسل اول ضدسایکوز متعلق به کلاس تیوزانتن) به عنوان داروهای با فعالیت بالای ضدتوکسوپلاسمایی گزارش شده‌اند. این مطالعه در شرایط *in-vitro* در محیط کشت DMEM و HFF و با استفاده از تاکی‌زوئیت‌های سویه RH توکسوپلازماگوندی انجام داده شد (۴). با توجه به اینکه امکان تعیین غلظت داخل سلولی این داروها در مغز فراهم نیست، لازم است مطالعات بیشتری برای تعیین امکان استفاده از نتایج *in-vitro* این مطالعات در درمان بیماران اسکیزوفرنی آلوده به توکسوپلازما، انجام داده شود. چنین مطالعاتی می‌تواند در انتخاب داروهای ضدسایکوز و یا تثبیت کننده خلق در بیماران آلوده کمک کننده باشد. اخیراً عنوان شده است که امکان فعال شدن رتروویروس اندوزن انسانی (Human endogenous retroviruses HERV) توسط توکسوپلازما وجود دارد که می‌تواند منجر به التهاب مغزی و اختلالات عصبی گردد (۸، ۱۱). به این ترتیب احتمالاً استفاده از داروهای سایکوز و یا تثبیت کننده‌های خلقی که دارای فعالیت ضدتوکسوپلاسمایی هستند، در بیمارانی که دارای سابقه عفونت با توکسوپلازما می‌باشند، مفید می‌باشد. هر چند نتایج بحث برانگیزی در زمینه تاثیر ضدتوکسوپلاسمایی داروهای سایکوز وجود دارد.

### نتیجه گیری کلی

دوام طولانی مدت انگل توکسوپلازماگوندی بر فیزیولوژی سلول‌های مغز میزبان تاثیر گذاشته و منجر به اختلالات اعصاب و روان می‌گردد. چنین تاثیراتی ممکن است با استفاده از داروهای ضد روانپریشی که دارای قابلیت ضدتوکسوپلاسمایی هستند

قابل پیش‌پیش باشد. در این پژوهش نشان داده شد داروهای ضدروان‌پریشی قابلیت درمان عفونت توکسوپلاسمایی مزمن را با کاهش تعداد رونوشت‌های BAG1 دارند که این تعداد رابطه مستقیمی با برادی‌زوئیت‌های داخل کیست دارد. این مطالعه طراحی جامعی با استفاده از RT-qPCR بر اساس ژن‌های اختصاصی توکسوپلازما جهت ارزیابی تاثیر داروی ریسپریدون بر عفونت مزمن توکسوپلاسمایی فراهم آورد. با استفاده از ساختار داروهایی از این دسته، امکان انجام مطالعات جدید برای طراحی داروهای موثر علیه عفونت مزمن توکسوپلاسمایی فراهم می‌گردد.

### سپاسگزاری

نویسندگان از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و انستیتو پاستور ایران برای حمایت از این طرح که قسمتی از پایان‌نامه دکتری است تشکر و قدرانی می‌کنند.

### منابع

1. Babaie, J., et al., 2017. Contribution of dopamine neurotransmission in proconvulsant effect of *Toxoplasma gondii* infection in male mice. *Journal of neuroscience research*, 95(10): p. 1894-1905.
2. Babaie, J., M. Sayyah, and M. Golkar, 2019. Effect of co-trimazole on REP-529 and TNF- $\alpha$  transcription levels in the brain of *Toxoplasma gondii* infected-mice. *Iranian Journal of Physiology and Pharmacology*, 3(2): p. 107-99.
3. Chaudhury, A. and B. Ramana, 2019. Schizophrenia and bipolar disorders: The: *Toxoplasma*: connection. *Tropical parasitology*, 9(2): p. 71-76.
4. Fond, G., et al., 2015. Treatment with anti-toxoplasmic activity (TATA) for toxoplasma positive patients with bipolar disorders or schizophrenia: a cross-sectional study. *Journal of psychiatric research*, 63: p. 58-64.
5. Ghorbani, M. and A. Sami, 1973. *Toxoplasmic lymphadenitis in Iran*.
6. Goodwin, D.G., et al., 2008. Evaluation of the mood-stabilizing agent valproic acid as a preventative for toxoplasmosis in mice and activity against tissue cysts in mice. *Journal of Parasitology*, 94(2): p. 555-557.
7. Goodwin, D.G., J.S. Strobl, and D.S. Lindsay, 2011. Evaluation of five antischizophrenic agents against *Toxoplasma gondii* in human cell cultures. *The Journal of parasitology*, 97(1): p. 148-151.
8. Hamdani, N., R. Tamouza, and M. Leboyer, 2012. Immuno-inflammatory markers of bipolar disorder: a review of evidence. *Frontiers in Bioscience-Elite*, 4(6): p. 2170-2182.
9. Haroon, F., et al., 2012. *Toxoplasma gondii* actively inhibits neuronal function in chronically infected mice. *PLoS One*, 7(4): p. e35516.
10. Jones-Brando, L., E.F. Torrey, and R. Yolken, 2003. Drugs used in the treatment of schizophrenia and bipolar disorder inhibit the replication of *Toxoplasma gondii*. *Schizophrenia research*, 62(3): p. 237-244.
11. Leboyer, M., et al., 2013. Human endogenous retrovirus type W (HERV-W) in schizophrenia: a new avenue of research at the gene-environment interface. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 14(2): p. 80-90.
12. Lee, K.S., et al., 2013. Effects of single or repeated silymarin administration on pharmacokinetics of risperidone and its major metabolite, 9-hydroxyrisperidone in rats. *Xenobiotica*, 43(3): p. 303-310.

13. Leweke, F.M., et al., 2004. Antibodies to infectious agents in individuals with recent onset schizophrenia. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 254: p. 4-8.
14. Lovett, J.L. and L.D. 2003. Sibley, Intracellular calcium stores in *Toxoplasma gondii* govern invasion of host cells. *Journal of cell science*, 116(14): p. 3009-3016.
15. Qin, J., et al., 2009. Trifluoperazine: a ryanodine receptor agonist. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 458: p. 643-651.
16. Saadatnia, G. and M. Golkar, 2012. A review on human toxoplasmosis. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 44(11): p. 805-814.
17. Saraei, M., et al., 2016. The effect of fluphenazine and thioridazine on *Toxoplasma gondii* in vivo. *Iranian Journal of Parasitology*, 11(2): p. 226.
18. Saraei, M., et al., 2015. In vivo anti-*Toxoplasma* activity of aripiprazole. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 18(9): p. 938.
19. Sun, F., et al., 2010. Studies on the acute toxicity, pharmacokinetics and pharmacodynamics of paliperidone derivatives—comparison to paliperidone and risperidone in mice and rats. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 107(2): p. 656-662.
20. Torrey, E.F., 2002. Studies of individuals with schizophrenia never treated with antipsychotic medications: a review. *Schizophrenia Research*, 58(2-3): p. 101-115.
21. Tyebji, S., et al., 2019. Toxoplasmosis: a pathway to neuropsychiatric disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 96: p. 72-92.
22. Wagner, R., R. Fink, and D. Stephenson, 2004. Effects of chlorpromazine on excitation–contraction coupling events in fast-twitch skeletal muscle fibres of the rat. *British journal of pharmacology*, 141(4): p. 624-633.
23. Webster, J.P., et al., 2013. *Toxoplasma gondii* infection, from predation to schizophrenia: can animal behaviour help us understand human behaviour? *Journal of Experimental Biology*, 216(1): p. 99-112.
24. Weiss, L.M., 2013. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan—perspectives and methods, Academic press.
25. Wu, S.-N., et al., 2000. Characterization of inhibition by risperidone of the inwardly rectifying K<sup>+</sup> current in pituitary GH3 cells. *Neuropsychopharmacology*, 23(6): p. 676-689.

## Investigating the effect of risperidone drug in inhibiting the proliferation of *Toxoplasma gondii* parasite in the mice brain

Marjan Enshaeieh<sup>1,2</sup>, Geita Saadatnia<sup>1\*</sup>, Jalal Babaie<sup>3</sup>, Majid Golkar<sup>3</sup>

1. Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran
2. Department of Biology, Naqsh-e Jahan Institute of Higher Education, Baharestan, Isfahan, Iran
3. Molecular Parasitology Laboratory, Department of Parasitology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

\* Correspondence to: [gitasaadat@gmail.com](mailto:gitasaadat@gmail.com)

### Abstract

Individuals infected with *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) are prone to psycho-behavioral disorders, most notably schizophrenia and bipolar disorder. Antipsychotic and mood-stabilizing drugs inhibited proliferation of *T. gondii* tachyzoites in vitro. However, results are controversial for animals which has treated with such drugs. In this study, an absolute quantitative real-time PCR (qPCR) was applied to accurately quantify the transcription level of BAG1 and SAG1 (a specific protein of *T. gondii* bradyzoite and tachyzoite, respectively) and copy number of REP529 DNA (a repetitive DNA fragment of the parasite) in brains of chronically infected NMRI mice treated by a neuroleptic drug; risperidone. The results showed treatment with this drug significantly inhibited the chronic infection and decreased BAG1, SAG1 and REP529 copy numbers in mice brains ( $P < 0.0001$ ), comparable to cotrimoxazole, the standard drug for the treatment of *Toxoplasma* infection ( $P > 0.05$ ). Moreover, brain TNF- $\alpha$  expression was significantly reduced upon treatment ( $P < 0.0001$ ), comparable to cotrimoxazole ( $P > 0.05$ ). Histological examination of mice brains showed marked reduction in cyst establishment, as well as in perivascular infiltration of lymphocytes, glial nodules, and encephalitis in the animals administered with the tested drug, to the same level as the cotrimoxazole group. The results provided direct evidence for the efficacy of this antipsychotic drug against chronic *Toxoplasma* infection. These results might help modulate therapeutic regimens for schizophrenia patients and design more effective anti-*Toxoplasma* drugs.

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, Neurological Disorders, Risperidone, PCR