اثرات محافظتی لیتیم در برابر مرگ سلولی ناشی از مرفین در رده سلولی PC12

مجید نجاتی[1*]، موسی صاحبقرانی[2]

خلاصه

سابقه و هدف: مرفین باعث القای مرگ سلولی در برخی رده‌های سلولی مانند سلول‌های عصبی می‌شود. لیتیم علاوه بر درمان و پیشگیری از اختلالات دوقطبی دارای اثرات محافظتی در برابر سمیت عصبی می‌باشد. اگرچه مطالعات حیوانی در مورد تاثیر لیتیم بر برخی از عوارض مرفین وجود دارد. ولی در مورد تداخل این دو دارو در سطح سلولی و اثر بر مرگ سلولی کاری انجام نشده بود، اهمیت این دو دارو ضرورت این مطالعه را ایجاب می‌کرد. در این مطالعه ضمن نشان دادن اثرات مرفین در ایجاد مرگ سلولی، اثر لیتیم را در محافظت از سلول‌ها در برابر مرگ سلولی القا شده با مرفین در رده سلولی PC12 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: این تحقیق با طراحی مطالعه تجربی صورت گرفت. برای تعیین میزان مرگ سلولی از آزمون‌های MTT وانکسین ۵ و برای نشان دادن القا بیان ژن‌های موثر در مرگ سلولی از آزمون RT PCR استفاده گردید. ابتدا غلظت‌های مختلف (0.2 ,0.4 , 0.8, 1.6) mmol/L مرفین را در زمان‌های مختلف به سلول‌های کشت داده شده اضافه شد و سپس میزان مرگ سلولی القا شده را با آزمون‌های فوق تعیین گردید. در بخش دیگر سلول‌های PC12 را ابتدا به مدت ۷۲ ساعت در کلرید لیتیم نگهداری کرده و سپس غلظت‌های مختلف مرفین به آنها اضافه گردید. نتایج با استفاده از آزمون آماری انووای یک طرفه تحلیل شد.

نتایج: مرفین با غلظت‌های mmol/L ۰/۸ و ۱/٦ مرگ سلولی را در سلول‌ها القا نمود که با آزمون‌های MTT وانکسین ۵ به ترتیب پس از ۲٤ و ۱۲ ساعت قابل اندازه‌گیری بود. نتایج آزمون RT PCR نشان داد مرفین با غلظت mmol/L ۰/۸ بیان ژن پیش‌برنده مرگ سلولی Bax و ژن ممانعت‌کننده از مرگ سلولی Bcl-2 را به ترتیب افزایش و کاهش می‌دهد. نتایج آزمون انکسین ۵ نشان داد میزان مرگ سلولی ایجاد شده با غلظت mmol/L ۰/۸ مرفین بعد از پیش‌درمان با لیتیم نسبت به گروه کنترل کمتر است. همچنین نتایج آزمون RT PCR نشان داد با پیش درمان لیتیم میزان بیان ژن Bax که در اثر مرفین mmol/L ۰/۸ افزایش یافته بود، کاهش یافته و میزان بیان ژن Bcl-2 افزایش می‌یابد. از طرفی لیتیم کلراید با غلظت ۱/۲ میلی‌مول بر لیتر به تنهایی اثری بر القای مرگ سلولی و بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 نداشت.

نتیجه‌گیری: لیتیم می‌تواند مرگ سلولی القا شده توسط مرفین را کاهش دهد. این اثر لیتیم با تاثیر آن بر بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 می‌باشد

واژگان کلیدی: مرفین، لیتیم، مرگ سلولی، رده سلولی PC12

۱- کارشناس ارشد سم‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران.

۲- استادیار گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران.

* **نویسنده مسوول:** مجید نجاتی

آدرس: کاشان خیابان شهید بهشتی مقابل سپاه آزمایشگاه رفرانس.

پست الکترونیک: mnjatimt@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۳۲٦۰۷۹۷۷

دورنویس: ۰۳٦۱ ٤٤٤٤۰۱٦

تاریخ دریافت: ۸۵/۸/۱۰

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۵/۱۱/۳۰

مقدمه

آپپتوزیز یا مرگ سلولی بخش عمده‌ای از تحقیقات علوم زیستی و پزشکی را در بر می‌گیرد و سالانه بیش از ۱۳ هزار مقاله در این باره منتشر می‌شود. مرگ سلولی روند طبیعی و اجتناب‌ناپذیر در هموستاز سلول می‌باشد. مکانیسم‌های مولکولی مختلفی که بسیاری از آنها به خوبی شناخته نشده‌اند؛ در مرگ سلولی نقش دارند. صرف نظر از عوامل مختلف القاکننده، مرگ سلولی دارای حالت مورفولوژیکی خاصی می‌باشد و یک قسمت تغییرناپذیر در طول رشد حیوان بوده و در دوران بلوغ هم ادامه دارد. از نشانه‌های بارز مرگ سلولی می‌توان به متورم شدن غشای سیتوپلاسمی، چروکیده شدن سلول، قطعه قطعه شدن DNA به قطعات نوکلئوزمی و بیان ژن‌های خاص و متعاقب آن ساخته شدن mRNA و پروتئین‌های جدید اشاره کرد [۱]. اپیوئیدها و در راس آنها مرفین از جمله مهمترین داروهای تسکین‌دهنده درد

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-26]

می‌باشند. از طرف دیگر سوء مصرف این داروها رو بـه افـزایش است. اپیوئیدها عـلاوه بـر اثـرات ضـد دردی و ایجـاد حالـت تخدیری دارای اثرات جانبی زیادی در بدن هستند. از جمله آنهـا اثر بر دستگاه گوارش، سیستم عصبی و سیستم ایمنی را می‌تـوان نام برد. شیوع عفونت‌های مختلف در افراد معتاد تا حد زیادی بـه سرکوب سیستم ایمنی توسط مرفین مربوط مـی‌شـود. مطالعـات زیادی مبنی بر القای مرگ سـلولی در سـلول‌هـای ایمنـی ماننـد ماکروفاژها توسط مرفین وجود دارد. همچنـین مطالعـات نـشان داده‌اند که مرفین باعث القای مرگ سلولی در سلول‌های عـصبی می‌شود [٢، ٣]. لیتیم بیش از نیم قرن پیش برای درمان بیماری‌های روانی مطرح شد و هنوز هم از مهمترین داروهـا بـرای درمـان و پروفیلاکسی مانیا و دپرسیون باقی مانده است. علی‌رغم تحقیقات فراوان، پایه مولکولی عمل تثبیت خلـق آن کـاملا روشـن نـشده است. چند نظریه از جمله کاهش ذخـایر اینوزیتـول مغـز، مهـار گیرنده‌های سروتونین، تنظیم عملکرد پروتئین جی، فسفوریلاسیون پروتئین و تغییر در سطح آنـزیم Na/K ATPase در ایـن بـاره وجود دارد [٤]. از خواص دیگر لیتـیم اثـر محـافظتی در برابـر سمیت سلولی به ویژه در سلول‌های عصبی مـی‌باشـد. مکانیـسم محافظت عصبی لیتیم نیز به خـوبی شـناخته نـشده اسـت. چنـد مکانیسم مانند غیر فعال شدن رسپتورهای NMDA، کاهش بیـان پـروتئین‌هـای P53 و Bax و افـزایش بیـان پـروتئین‌هـای محافظت‌کننده سلولی Bcl-2 و فعـال شـدن کینازهـای حیـاتی سلول پیشنهاد شده‌اند [٥]. یک مطالعه نشان داده اسـت مواجهـه طولانی مدت با لیتیم کلراید سلول‌های عصبی گرانول‌های مغـزی (CGNS) را در مقابل سمیت بتابانگروتوکسین محافظت می‌کند. این محافظت عصبی با پیش‌درمان غلظت‌های درمانی لیتـیم (١/٢ میلی‌مول) برای ٣ تا ٥ روز ایجاد می‌شـود. از طـرف دیگـر، اثـر محافظت ایجاد شده به وسیله لیتیم به مهار افزایش بـیش از حـد کلسیم نسبت داده شده است. از نشانه‌های مـسیر کلـسیم تولیـد گروه‌های فعال اکسیژن و احیای شدید غشای میتوکندری بوده که همراه با اثرات نوروتوکسیک بتابانگروتوکسین (β- BUTX) بـه وسیله پیش‌درمان بلندمدت لیتیم مسدودکننده مـی‌شـود. احتمـالا یک روش اصلی محافظت لیتیم، تنظیم هموستاز کلسیم و سـمیت آن هم ناشی از فزونی کلسیم در قسمت دیگر می‌باشد [٦]. درمان طولانی مدت (نه حاد) سلول‌ها با لیتیم کلراید باعث القای کاهش سطح mRNA و پروتئین‌های پیش‌اپیتوزی P53 و Bax می‌شود و بر عکس سطوح mRNA و پروتئین محافظـت‌کننـده سـلولی Bcl-2 به طور واضح افزایش می‌یابد. افزایش بیـان ژن Bcl-2 و کاهش بیان ژن‌های P53 و Bax ناشی از لیتیم نقـش مهمـی در محافظت نرون‌ها در برابر سمیت تحریکی دارد [٧، ٨]. علـی‌رغـم گزارشات زیاد در مورد اثرات محافظتی لیتیم و مسیرهای مشترک اثرات مرفین و لیتیم، در مورد اثرات متقابل این دو دارو بر مـرگ سلولی گزارشی وجود نداشت. در این مطالعه اثرات غلظت‌هـای کم لیتیم بر مرگ سلولی ایجاد شده توسط مرفین در رده سـلولی PC12 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

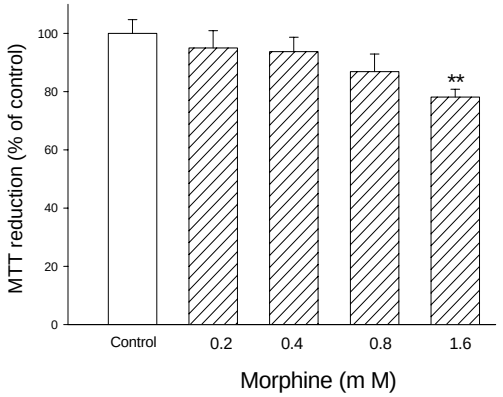
این مطالعه، یـک مطالعـه تجربـی بـوده کـه در محـیط آزمایشگاه و با روش کشت سلولی انجام شده است. سـلول‌هـای استفاده شده در این مطالعه رده سلولی PC12 مـی‌باشـند کـه از بانک سلولی مرکز انستیتو پاستور ایران تهیـه شـدند. منـشا ایـن سلول‌ها از تومور غده فوق کلیه موش صحرایی نر می‌باشد که به عنوان مدلی برای سلول‌های عصبی ترشح‌کننده دوپـامین در نظـر گرفته می‌شوند. سلول‌ها در انکوبـاتور بـا دمـای ٣٧°c و هـوای مرطوب و دارای ٥٪ CO2 در فلاسک های استریل و با اسـتفاده از محیط کشت DMEM همراه با١٠٪ سرم جنین گاو رشـد داده می‌شوند. مرفین، لیتیم، محیط کشت DMEM، سرم جنـین گـاو، کیت MTT وانکسین ٥ همگی از شرکت Sigma تهیـه شـدند. ابتـدا اثـر غلظـت‌هـای مختلـف مـرفین (٠/٢، ٠/٤، ٠/٨ و ١/٦ میلی‌مول بر لیتر) بر مرگ سلولی در زمان ٢٤ ساعت بررسی شد. سپس از پیش‌درمان لیتیم کلراید ١/٢ میلی‌مول به مدت ٧٢ ساعت برای نشان دادن اثر محافظتی لیتیم در برابر مرگ سلولی القا شده توسط مرفین استفاده شد. این غلظت لیتیم معادل غلظت درمـانی آن بوده و هیچ اثر سمی بر سلول‌ها نـدارد. بـرای بررسـی اولیـه میزان القای مرگ سلولی از آزمون MTT و برای تعیـین درصـد سلول‌ها اپیتوتیک از آزمون انکسین ٥ و بـرای نـشان دادن القـای بیان ژن‌های مربوط به مرگ سلولی از آزمون RT PCR اسـتفاده شد. برای انجام آزمون MTT ابتدا تعداد ٥٠٠٠٠ سلول‌ها در هر چاهک میکروپلیت‌های ٩٦ تایی ریخته و ٢٤ ساعت صبر کرده تا سلول‌ها به کف چاهک‌ها چسبیده و شروع به رشـد کننـد. بـرای شمارش سلول‌ها از روش رنـگ‌آمیـزی تریپـان بلـو و شـمارش سلول‌ها با لام نئوبار استفاده گردید، سپس درمان سلول ها با لیتیم و مرفین در داخل چاهک‌ها انجام شد. پس از پایان درمـان رنـگ MTT اضافه گردید. سپس پلیت را ٢ ساعت در انکوباتور قـرار داده و بعد رنگ را خالی کرده و بـه آن حـلال DMSO اضـافه شد. سپس پلیت را به آرامی تکان داده تا کریستال‌ها کـاملا حـل شوند. بعد جذب نوری چاهک‌ها را در طول موج ٥٧٠ نانومتر بـا دستگاه قرائت‌گر میکروپلیت خوانده شد. شدت رنگ تولید شـده

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-26]

با تعداد سلول‌های زنده رابطه مستقیم دارد. درصد سلول‌های زنده با رسم منحنی استاندارد محاسبه شد. آزمون انکسین ۵ یک روش دیگر برای تعیین میزان مرگ سلولی در جمعیت‌های سلولی است که اساس آن تغییرات غشای سیتوپلاسمی در سلول‌های اپیتوتیک بوده و نحوه انجام آزمون به این ترتیب است که کلیه مراحل درمان و پیش‌درمان بر روی سلول‌ها در داخل فلاسک انجام می‌شود. پس از آن فلاسک‌ها تریپسینه شده و حدود یک میلیون سلول از هر فلاسک در لوله ریخته می‌شود. ابتدا سه بار سلول‌ها با بافر فسفات شسته و سپس ۵۰۰ میکرولیتر بافر مخصوص موجود در کیت افزوده و بعد ۵ میکرولیتر انکسین V و۱۰ میکرولیتر رنگ یدید پروپیدیوم اضافه می‌شود. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط نمونه‌ها با دستگاه فلوسیتومتر قرائت می‌شود. سلول‌هایی که نسبت به رنگ (FITC-Annexin V) مثبت هستند (رنگ را به خود می‌گیرند) ولی نسبت به رنگ یدید پروپیدیوم منفی می‌باشند، سلول‌های در حال مرگ سلولی هستند. سلول‌هایی که هر دو رنگ فوق را به خود می‌گیرند در آخرین مرحله مرگ سلولی قرار دارند و یا مسیر نکروز را طی کرده‌اند. سلول‌هایی که نسبت به هر دو رنگ مذکور منفی هستند، سلول‌های زنده و سالم هستند. برای بررسی میزان بیان ژن‌های موثر در مرگ سلولی (Bax و Bcl-2) از آزمون RT PCR استفاده کردیم. این آزمون که واکنش تکثیر زنجیره ژنی با روش رونویسی معکوس می‌باشد یک روش بسیار دقیق برای بررسی میزان بیان ژن‌ها می‌باشد. نحوه انجام آن بدین ترتیب است که پس از انجام درمان‌های مورد نظر با مرفین و لیتیم ابتدا RNA سلول‌ها استخراج شده و سپس با استفاده از آغازگرهای مخصوص ژن‌های فوق که توالی آنها قبلا تعیین شده است، آزمون رونویسی معکوس را انجام می‌دهیم که منجر به تولید cDNA می‌شود که با روش PCR تکثیر شده و با استفاده از آزمون کمی Real time RT PCR میزان بیان ژن‌های مربوط به Bax و Bcl-2 اندازه گرفته می‌شود. کلیه کیت‌های استخراج RNA و RT PCR و آغازگرها از شرکت آلمانی Roche تهیه شدند. برای تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده از اثر غلظت‌های مختلف مرفین و لیتیم بر سلول‌ها از آزمون انووای یک‌طرفه و آزمون کمکی تی‌استیودنت و نیومن کولز استفاده شد.

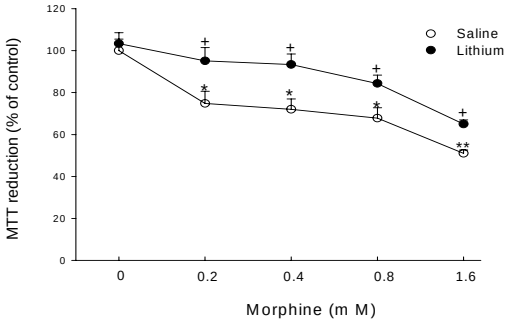
نتایج

نتایج آزمون MTT نشان می‌دهد، فقط غلظت ۱/۶ میلی‌مول بر لیتر مرفین مرگ سلولی را القا نموده است ($p<0/001$). البته غلظت ۰/۸ میلی‌مول بر لیتر مرفین هم بعد از ۲۴ ساعت ۱۵ درصد از میزان سلول‌های زنده کاسته بود. (نمودار شماره ۱)



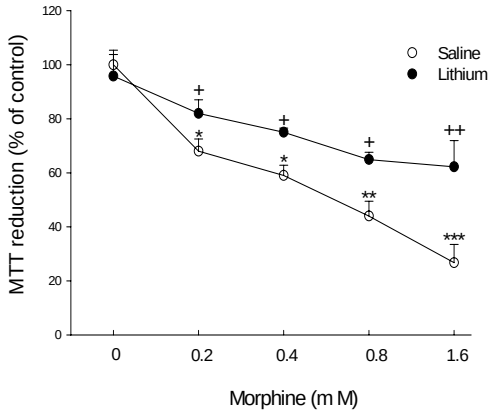
نمودار ۱- مقایسه اثر ۲۴ ساعت مواجهه غلظت‌های مختلف مرفین برسلول‌های PC12 با آزمون MTT نسبت به گروه کنترل

طبق نتایج به دست آمده تعداد سلول‌های زنده در گروه سلول‌هایی که پیش‌درمان لیتیم را قبل از مواجهه با مرفین تجربه کرده بودند بیشتر از گروه کنترل که فقط مرفین دریافت کرده بودند، بود. این نتایج به ویژه برای غلظت ۰/۸ میلی‌مول بر لیتر مرفین کاملا معنی‌دار بود. تجزیه نتایج نشان داد مرفین به صورت وابسته به غلظت مرگ سلولی را القا می‌کند.($p<0/001$) از طرف دیگر مقایسه دو گروه پیش‌درمان شده و نشده با لیتیم نشان داد. لیتیم مرگ سلولی ناشی از مرفین را کاهش می‌دهد. (نمودارهای شماره ۲ و۳)



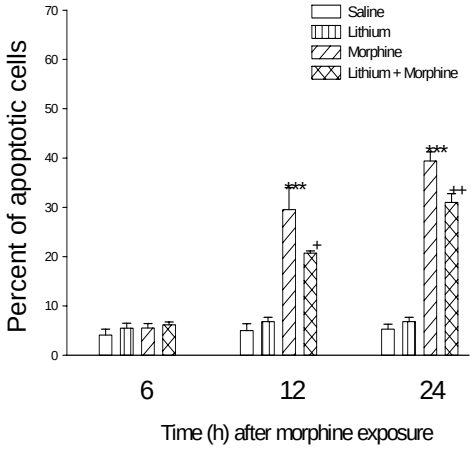
نمودار ۲- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف مرفین پس از ۴۸ ساعت بر سلول‌های PC12. ($p<0/05$* و $p<0/01$**) و اثر ۷۲ ساعت پیش درمان لیتیم در مقایسه با گروه کنترل با آزمون MTT. (++p<0.01 ,+p<0.05.)

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-26]



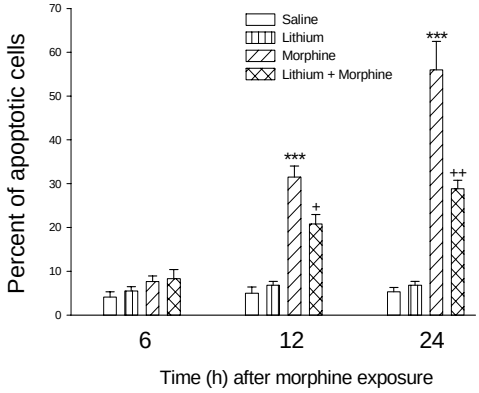
نمودار ٣- مقایسه اثر ٩٦ ساعت غلظت‌های مختلف مرفین بر سلول‌ها (*p<٠/٠٥, **p<٠/٠١, ***p<٠/٠٠١) و اثر پیش‌درمان لیتیم نسبت به گروه کنترل با آزمون MTT. (+p<٠/٠٥ و ++p<٠/٠١)

نتایج آزمون انکسین ٥ نشان می‌دهد مواجهه سلول‌ها با مرفین ٠/٨ میلی‌مول بر لیتر پس از ١٢ و ٢٤ ساعت مرگ سلولی را در آنها القا نموده است. (p<٠/٠٠١). از طرفی سلول‌هایی که به مدت ٧٢ ساعت با لیتیم پیش‌درمان شدند و سپس مرفین ٠/٨ میلی‌مول بر لیتر را در زمان‌های فوق دریافت نمودند. پس از ١٢ ساعت (p<٠/٠٥) و ٢٤ ساعت (p<٠/٠١) مواجهه با مرفین کمتر از گروه کنترل دچار مرگ سلولی شده‌اند (نمودار شماره ٤).



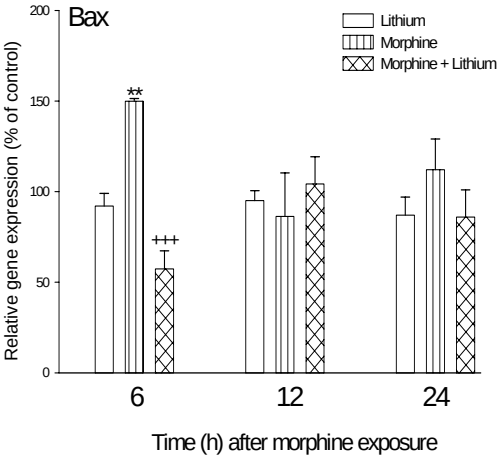
نمودار ٤- مقایسه اثر غلظت ٠/٨ mmol/L مرفین بر سلول‌های PC12 (***p<٠/٠٠١) و اثر پیش‌درمان لیتیم در مقایسه با گروه کنترل با آزمون انکسین V. (+p<٠/٠٥ و ++p<٠/٠١)

همچنین نتایج به دست آمده از اثر مرفین ١/٦ میلی‌مول بر لیتر بر سلول‌ها پس از ٧٢ ساعت مواجهه با لیتیم کلراید ١/٢ میلی‌مول بر لیتر با آزمون انکسین ٥ نشان داد که این غلظت مرفین هم پس از ١٢ و ٢٤ ساعت توانسته است در مقایسه با گروه کنترل مرگ سلولی را القا نماید. (نمودار شماره ٥)



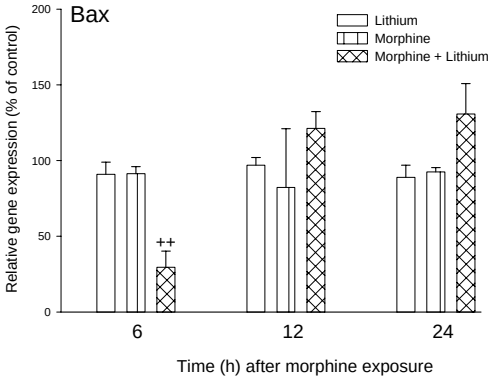
نمودار ٥- مقایسه اثر غلظت ١/٦ mmol/L مرفین بر سلول‌های PC12 (***p<٠/٠٠١) و اثر پیش‌درمان لیتیم در مقایسه با گروه کنترل با آزمون انکسین V. (+p<٠/٠٥ و ++p<٠/٠١)

نتایج آزمون RT PCR: ابتدا اثر غلظت‌های مختلف مرفین بر بیان mRNA، Bax مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد. تجویز غلظت‌های ٠/٨ و ١/٦ میلی‌مول بر لیتر مرفین به مدت ٦ ساعت، سطح بیان mRNA، Bax را در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌دهد. (p<٠/٠١). (نمودارهای شماره ٦ و ٧)



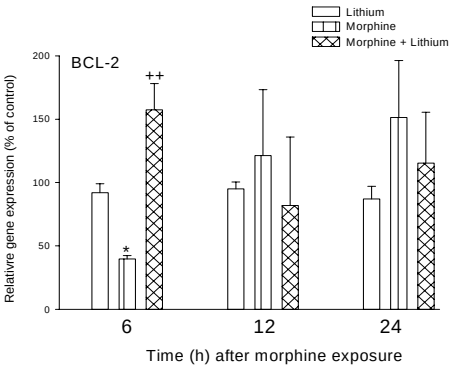
نمودار ٦- مقایسه اثر غلظت ٠/٨ mmol/L مرفین در ساعت‌های مختلف (**p<٠/٠١) و پیش‌درمان لیتیم نسبت به گروه کنترل بر بیان ژن Bax (+++p<٠/٠٠١) نتایج به صورت درصد بیان ژن نسبت به گروه کنترل گزارش شده است

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-26]



نمودار ۷- مقایسه اثر غلظت ۱/٦ mmol/L مرفین در ساعت‌های مختلف و پیش‌درمان لیتیم نسبت به گروه کنترل بر بیان ژن Bax. (++p<۰/۰۱)

از طرفی پیش‌درمان لیتیم کلراید (۱/۲ میلی‌مول بر لیتر) به مدت ۷۲ ساعت سطح افزایش یافته بیان mRNA، Bax پس از ٦ ساعت مواجهه با مرفین ۰/۸ و ۱/٦ میلی‌مول بر لیتر را کم می‌کند (p<۰/۰۰۱). در بخش دیگر اثر مرفین ۰/۸ میلی‌مول بر لیتر بر بیان mRNA، Bcl-2 در زمان‌های ٦ و ۱۲ و ۲٤ ساعت بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد تجویز مرفین ۰/۸ میلی‌مول بر لیتر بعد از ٦ ساعت میزان بیان mRNA، Bcl-2 را در مقایسه با گروه کنترل کاهش می‌دهد (p<۰/۰۵). همچنین گروهی از سلول‌ها که قبل از مرفین ۰/۸ میلی‌مول بر لیتر به مدت ۷۲ ساعت با لیتیم کلراید مواجه شده بودند میزان بیان mRNA، Bcl-2 در آنها در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته بود. (p<۰/۰۵). (شکل شماره ۸)



نمودار ۸- مقایسه اثر غلظت ۰/۸ mmol/L مرفین در ساعت‌های مختلف و پیش‌درمان لیتیم نسبت به گروه کنترل بر بیان ژن Bcl-2 در سلول‌های PC12 .

بالاخره تغییرات نسبی بیان mRNA، Bcl-2 در سلول‌ها در اثر مواجهه با مرفین ۱/٦ میلی‌مول بر لیتر با یا بدون انکوباسیون قبلی با لیتیم کلراید در زمان‌های فوق بررسی شد. نتایج نشان داد تجویز مرفین ۱/٦ میلی‌مول بر لیتر در هیچ کدام از زمان‌های فوق اثری بر بیان mRNA، Bcl-2 در مقایسه با گروه کنترل ندارد. (p<۰/۰۵). همچنین در گروهی از سلول‌ها که ۷۲ ساعت پیش‌درمان لیتیم را دریافت نموده بودند، تجویز مرفین ۱/٦ میلی‌مول بر لیتر اثری بر بیان mRNA، Bcl-2 در مقایسه با گروه کنترل نداشت. از طرفی مواجهه سلول‌ها با لیتیم کلراید ۱/۲ میلی‌مول بر لیتر به تنهایی اثری بر بیان mRNA، Bax و Bcl-2 نداشت.

بحث

مطالعات نشان داده است تجویز طولانی مدت مرفین باعث ایجاد مرگ سلولی در سلول‌های عصبی می‌شود. ممکن است این خاصیت القای مرگ سلولی که بیشتر توسط غلظت‌های بالای مرفین ایجاد می‌شود از طریق افزایش تحریک گیرنده‌های NMDA و افزایش دسترسی به گلوتامات سیناپسی در شاخ پشتی نخاع ایجاد شود. مرفین، مرگ سلولی را در سلول‌های شاخ پشتی طناب نخاعی القاء می‌کند. به نظر می‌رسد مرگ سلولی بیشتر در نرون‌های ترشح‌کننده گابا اتفاق می‌افتد که این می‌تواند عاملی برای ایجاد مقاومت مرفین شمرده شود. فعال شدن گیرنده‌های NMDA می‌تواند باعث شروع مسیرهای داخل سلولی، مرگ سلولی شود. مطالعات نشان داده است درمان مزمن با مرفین باعث فراتنظیمی گیرنده‌های پیش‌اپیتوزی Fas و فروتنظیمی Bcl-2 در مغز موش صحرایی نر می‌شود [۸، ۹]. در این مطالعه از سلول‌های PC12 به عنوان مدل سلول‌های عصبی استفاده شد. این سلول‌ها از تومور غده فوق کلیه موش صحرایی (Rat) گرفته شده و به عنوان مدلی برای سلول‌های عصبی ترشح‌کننده دوپامین در نظر گرفته می‌شوند. روش‌های سنجش میزان مرگ سلولی در این مطالعه آزمون‌های MTT و انکسین ۵ و همچنین RT PCR برای بررسی میزان بیان ژن‌های موثر در مرگ سلولی می‌باشند. در مرحله اول آزمایشات ابتدا غلظت‌های مختلف مرفین با سلول‌های مجاور می‌شود. نتایج آزمون MTT نشان داد مرفین به صورت وابسته به غلظت تعداد سلول‌های زنده را کاهش می‌دهد. همچنین نتایج آزمون انکسین ۵ نشان داد مرگ سلولی پس از تجویز مرفین القا می‌شود و بالاخره نتایج RT PCR نشان داد، مواجهه سلول‌ها با مرفین بیان mRNA پروتئین پیش‌آپیتوزی Bax را افزایش داده و بیان mRNA پروتئین ضد

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-26]

اپیتوزی Bcl-2 را کاهش می‌دهد. بر طبق تحقیقات پیشین Bax به وسیله اتصال به غشای میتوکندری و آزاد شدن سیتوکروم C مرگ سلولی را القا می‌کند. این در نتیجه تحریک کاسپازها و کاهش سوبسترای پروتئین‌های اختصاصی می‌باشد. از طرف دیگر خاصیت ضد اپیتوزی Bcl-2 با توقف آزاد شدن سیتوکروم C و فعال شدن کاسپازهای ایجاد شده توسط Bax می‌باشد. همچنین Bcl-2 فعالیت فاکتور رونویسی NFKB را که فعالیتش در طول اپیتوز افزایش می‌یابد را تضعیف کرده و آزاد شدن کلسیم از شبکه آندوپلاسمی در اثر استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد. بنابراین به نظر می‌رسد که نسبت Bax/Bcl-2 سرنوشت زنده ماندن سلول را مشخص می‌کند [١٠]. در بخش دیگر نقش لیتیم در ممانعت از مرگ سلولی ایجاد شده توسط مرفین، مورد بررسی قرار گرفت. لیتیم بیشترین استفاده را در درمان و پیشگیری از اختلالات دوقطبی دارد با این وجود هنوز مکانیسم دقیق این اثر دارویی لیتیم به طور کامل شناخته نشده است. مطالعات زیادی اثر لیتیم در محافظت از سلول‌های عصبی در برابر مرگ سلولی را نشان می‌دهد. تحقیقات نشان داده لیتیم سلول‌های گرانول‌های مغزی (CGCs) را در برابر مرگ سلولی ناشی از سمیت تحریکی گلوتامات محافظت می‌کند که به نظر می‌رسد این محافظت در اثر مهار گیرنده‌های NMDA با ورود کلسیم می‌باشد [١١]. نتایج مطالعه ما نشان داد مواجهه طولانی مدت سلول‌ها با لیتیم بر بیان ژن‌های کلیدی موثر در مرگ سلولی نظیر Bax و Bcl-2 موثر است. حداقل ٥-٣ روز پیش‌درمان سلول‌ها با لیتیم برای القای کامل این اثر محافظتی ضروری است. مواجهه کوتاه مدت (چند ساعته) یا بیش از ٧ روز و همچنین غلظت‌های بالای لیتیم اثر محافظتی نداشته و حتی سمی است. از طرف دیگر مواجهه سلول‌ها با لیتیم کلراید ١/٢ میلی‌مول بر لیتر به تنهایی اثری بر بیان ژن پیش‌اپیتوزی Bax و ژن ضد اپیتوزی Bcl-2 ندارد. نتایج به دست آمده از مطالعه ما نشان داد در ساعت‌های مختلف در ٦ ساعت اول مرفین بر بیان ژن‌های Bax را افزایش داده و بیان ژن Bcl-2 را کاهش می‌دهد. ولی در زمان‌های ١٢ و ٢٤ ساعت این اثر از بین رفته است. این نتایج مطالعات گذشته را مبنی بر اینکه القای بیان ژنی در ساعات اولیه قابل شناسایی است را تایید می‌کند. کاهش سطح mRNA پس از ١٢ ساعت را می‌توان به ناپایداری mRNA نسبت داد. همچنین پس از این مدت ژن‌ها، بیان شده و سلول‌ها به طرف اپیتوز رفته و توانایی بیان بیشتر ژن‌ها را از دست می‌دهند و با توجه به تغییرات سطح غشای سلول‌های اپیتوتیک با آزمون انکسین سلول قابل شناسایی هستند. پس از ٢٤ ساعت سلول‌ها به مراحل آخر مرگ سلولی رسیده و با آزمون MTT نیز قابل شناسایی هستند. مکانیسم‌های بیوشیمیایی احتمالی لیتیم شامل مهار تولید و مصرف اینوزیتول فسفات، تغییر غلظت کلسیم داخل سلولی و اثر بر پروتئین G و پروتئین کیناز C می‌باشد. مکانیسم دقیق اثر محافظتی لیتیم نیز مانند اثردرمانی آن به طور واضح مشخص نشده است. البته مهار آنزیم گلوکوژنیک فروکتوز-١ و ٦- بی فسفات و آنزیم اینوزیتول مونوفسفات واینوزیتول پلی فسفات ـ ١ ـ فسفاتاز گزارش شده است. همچنین مولکول P53 به طور مثبت Bax را و به طور منفی Bcl-2 را تنظیم می‌کند. بنابراین تغییرات ناشی از لیتیم در بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 می‌تواند در نتیجه مهار بیان P53 باشد [١٢]. مطالعه ما نیز به خوبی کاهش بیان Bax و افزایش بیان Bcl-2 در اثر مرفین متعاقب پیش‌درمان لیتیم کلراید را نشان داد. زمینه‌های زیادی برای تداخل بین خواص فارماکولوژیکی مرفین و لیتیم وجود دارد. این تداخلات در مطالعات حیوانی به صورت تداخل در اعتیاد دارویی، مقاومت، خود تحریکی و خواص ضد دردی مرفین می‌باشد [١٣، ١٤]. برخی گزارشات مبنی بر استفاده از لیتیم در درمان اعتیادهای دارویی وجود دارد. لیتیم می‌تواند بر تمایل آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های مرفین برای اتصال به گیرنده‌هایشان موثر باشد. این شاید در اثر تغییر در شکل فضایی گیرنده‌ها یا تعدیل تمایل گیرنده‌های اپیوئیدها به پپتیدهای اپیوئیدی داخلی باشد [١٥]. در مدل‌های حیوانی لیتیم آزاد شدن اپیوئیدهای داخلی در مغز را افزایش می‌دهد. لیتیم آنزیم‌های موثر در ساخت و چرخه مجدد اینوزیتول مانند اینوزیتول مونوفسفاتاز و اینوزیتول پلی‌فسفات ـ ١ فسفاتاز را مهار می‌کند. این باعث کاهش ذخیره اینوزیتول و اینوزیتول تری‌فسفات در سلول می‌شود. در ضمن لیتیم هیدرولیز اینوزیتول فسفات وابسته به کلسیم را مهار می‌کند. علاوه بر این مرفین هم روی سوخت و ساز اینوزیتول موثراست [١٦] و تداخل دو دارو می‌تواند در اینجا اتفاق بیفتد. همچنین لیتیم با مهار زیرواحدهای کاتالیتیکی آدنیلیل سیکلاز تشکیل آدنیلات سیکلاز حلقوی (cAMP) را مهار می‌کند. بنابراین لیتیم تجمع cAMP ناشی از آگونیست‌های مرفین را مهار می‌کند. این نقاط مشترک، تداخل بین مرفین و لیتیم را توجیه می‌کند [١٧].

نتیجه‌گیری

لیتیم می‌تواند روند القای مرگ سلولی توسط مرفین را متوقف نموده و میزان مرگ سلولی را کاهش دهد. به احتمال زیاد این اثر لیتیم با تداخل در اثر مرفین بر بیان ژن‌های Bax وBcl-2 می‌باشد. البته در صورت تایید این اثر با مطالعات بیشتر شاید

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-26]

بتوان از لیتیم برای جلوگیری از اثرات مخرب مرفین بر سلول‌های عصبی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

از دکتر محمود قاضی خوانساری دانشیار محترم گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران برای مشاوره و حمایت بی‌دریغ در انجام این مطالعه کمال تشکر را داریم. همچنین از پرسنل گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی، گروه بیوتکنولوژی دانشکده داروسازی و گروه ایمونوژنتیک دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران قدردانی می‌نماییم.

References:

[1] Lawen A. Apoptosis-an introduction. ***Bioessays*** 2003; 25: 888-896.
[2] Pravin C. Singhal AA. Kapasi N. Franki K. Morphine induced macrophage apoptosis: The role of transforming growth factor– β. ***Immunology*** 2000: 7-62
[3] Nestler EJ. Hope BT. Widnel KL. Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity. ***Neuron*** 1993: 11: 995-1006.
[4] Schou M. Lithium Treatment of Manic-depressive Illness: A Practical Guide, Karger: **Basel**: 1998: 6 th edn.
[5] Thuile J. Even C. Guelfi JD. Mixed states in bipolar disorders: a review of current therapeutic strategies **Encephale**. 2005; 31: 5 Pt 1: 617-623.
[6] Wen-Pei Tseng1 and Shoei-Yn Lin-Shiau1,2. Long-term Lithium Treatment Prevents Neurotoxic Effects of -bungarotoxin in Primary Cultured Neurons. ***Journal of Neuroscience Research*** 2002; 69: 633-641.
[7] Ren-Wu Chen. De-Maw Chuang. Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression. ***The journal of biological chemistry*** 1999; 10: 6039-6042.
[8] Oliveira MT. Rego AC. Morgadinho MT. Macedo TR. Oliveira CR. Toxic effects of opioid and stimulant drugs on undifferentiated PC12 cells. ***Ann N Y Acad Sci*** 2002; 965: 487-496.
[9] Mao J. Sung B. Ji RR. Lim G. Neuronal Apoptosis Associated with Morphine Tolerance: Evidence for an Opioid-Induced Neurotoxic Mechanism. ***The Journal of Neuroscience*** 2002; 22: 7650-7661.
[10] Chan YM. Wu W. Yip HK. So KF. Oppenheim RW Caspase inhibitors promote the survival of avulsed spinal motoneurons in neonatal rats. ***NeuroReport*** 2001; 12: 541-545.
[11] Nonaka S. Hough CJ. Chuang DM. Chronic lithium treatment robustly protects neurons in the central nervous system against excitotoxicity by inhibiting N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium influx. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 1998; 95: 2642-2647.
[12] Corbella B. Vieta E. Molecular targets of lithium action. ***Acta Neuropsychiatrica*** 2003: 15: 316-340.
[13] Liebman JM. Segal DS. Lithium differentially antagonises self-stimulation facilitated by morphine and (+) -amphetamine. ***Nature*** 1976; 260: 161-163.
[14] Johnston IN. Westbrook RF. Inhibition of morphine analgesia by lithium: role of peripheral and central opioid receptors. ***Behav Brain Res*** 2004; 151: 151-158.
[15] Jasinski DR. Nutt JG. Haertzen CA. Grifith JD. Bunney WE. Lithium: effects on subjective functioning and morphine-induced euphoria. 1977; 195: 582-584.
[16] Standifer KM. Pasternak GW. G proteins and opioid receptor-mediated signalling. ***Cell Signal*** 1997; 9: 237- 248.
[17] Mork A. Geisler A. The effects of lithium in vitro and ex vivo on adenylate cyclase in brain are exerted by distinct mechanisms. ***Neuropharmacology*** 1989; 28: 307-311

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-26]