Archive of SID

● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ دوازدهم شماره 1، ص 49-39، 1383

مقالة

بررسی فعالیت لنفوسیت‌های T کمک کننده در افراد وابسته و غیروابسته به تریاک

فرزانه اسمعیلی[1] و دکتر غلامرضا مشتاقی کاشانیان[2]

خلاصه

استفاده از مواد افیونی، به طور مستقیم یا غیر مستقیم بر عملکرد گلبول‌های سفید خون محیطی تأثیر می‌گذارد. در مطالعات گذشته، ثابت گردیده که این سلول‌ها از طریق گیرنده‌های اپیوئیدی (σ و μ و κ) به اندورفین‌ها پاسخ می‌دهند. تاکنون تحقیقات متعددی در مورد آثارمصرف مرفین و هروئین بر سیستم ایمنی افراد وابسته گزارش شده، لیکن تحقیقی که به بررسی لنفوسیت‌های کمک کننده (T-helpers) افراد وابسته به تریاک پرداخته باشد، انجام نگرفته است. لذا در این تحقیق بر آن شدیم تا اثرات وابستگی به تریاک استنشاقی را، بر سیستم ایمنی افراد به دو صورت *in-vivo* و ex-vivo بررسی نماییم. جهت انجام تحقیق، 23 مرد وابسته به تریاک استنشاقی با میانگین سنی 28/4±4/1 سال که سیگار نیز مصرف می‌نمودند به عنوان گروه وابسته، و تعداد 12 مرد سیگاری با میانگین سنی 26/5±4/3 سال نیز به عنوان گروه کنترل انتخاب گردیدند. از هر فرد 5 میلی‌لیتر خون وریدی گرفته و هپارینه شد. مقداری از نمونه جهت آزمایش CBC و 0/5 میلی‌لیتر پلاسما جهت تعیین غلظت سیتوکین‌های IL-2، IL-10 و TGFβ1 نیز جدا گردید. مابقی خون جهت تحریک سلول‌ها با مخلوطی از LPS (1 μg/ml) و PHA (10 μg/ml) به مدت 4، 24، 48 و 72 ساعت استفاده شد. بر اساس نتایج به دست آمده غلظت پایه پلاسمایی IL-10 و TGF-β1 افراد وابسته بیشتر ($P<0/05$) و غلظت IL-2 آنان کمتر از گروه کنترل بود($P<0/05$). پس از تحریک خون تام افراد دو گروه الگوی زمانی مشابهی برای سنتز TGF-β1 به دست آمد. در افراد وابسته سنتز IL-10 کمتر ($P<0/001$)، و سنتز IL-2 بیشتر از افراد گروه کنترل بود ($P<0/05$). از نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه‌گیری نمود که افراد وابسته به تریاک استنشاقی، در مقایسه با افراد غیر وابسته دارای لنفوسیت‌های کمک کننده TH2 و TH3 بیشتری در خون محیطی‌شان هستند در صورتی که لنفوسیت‌های کمک کننده TH1 آنان کمتر است. لیکن در زمان ابتلاء به عفونت، به دلیل فعالیت کمتر لنفوسیت‌های TH2 و فعالیت بیشتر TH1 ممکن است در معرض آسیب بیشتری باشند.

1- مربی، گروه فیزیولوژی فارماکولوژی، 2- استادیار بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان

دریافت مقاله: 1383/3/2 دریافت مقاله اصلاح شده: 1383/9/25 پذیرش مقاله: 1383/10/23

www.SID.ir

Archive of SID

واژه‌های کلیدی: فعالیت لنفوسیت‌های T کمک کننده ، IL-2، IL-10، TGF-β1، اعتیاد به تریاک

مقدمه

استفاده از مواد افیونی، به طور مستقیم یا غیر مستقیم بر عملکرد بافت‌های مختلف بدن تاثیر می‌گذارد. گلبول‌های سفید خون محیطی نیز تحت تاثیر مواد افیونی قرار می گیرند. گر چه این سلول‌ها عمر کوتاهی دارند، لیکن ثابت گردیده که آنها گیرنده‌های اپیوئیدی (σ و μ و κ) دارند و به اندورفین‌ها (β-endorphin, dynorphin , Met-enkephalin) پاسخ می‌دهند (7,19,20,26,29,32,35).

مطالعات اخیر که اکثراً بر روی حیوانات آزمایشگاهی (3,15,27,29,40)، گلبول‌های خون محیطی تفکیک شده حیوانات مختلف (5,6,15,28,38,40)، انسان (12,38) و یا با استفاده از رده‌های سلولی (لنفوسیت و منوسیت) شناخته شده انجام گردیده (10,15,31,38,40)، نشانگر اثرات مستقیم و غیر مستقیم مرفین یا مشتقات آن بر سیستم‌های ایمنی (humoral و cellular) می‌باشند. نتایج این تحقیقات نشان داده که اشغال گیرنده‌های اپیوئیدی توسط اندورفین‌ها و یا مواد افیونی تأثیر مستقیم بر آزادسازی سیتوکین‌ها، رشد سلولی، تقسیم سلولی و تمایز (Cell differentiation) گلبول‌های سفید خون محیطی دارد.

از طرف دیگر، نتایج به دست آمده همخوان، و بعضاً نتایج متضادی را اعلام نموده‌اند. برای مثال در تحقیقی که توسط Chao و همکاران (11) انجام گرفته، نشان داده شده که استفاده از دوز کم مرفین (1 pM, 10 nM) هیچ اثری بر تولید سیتوکین‌های IL-6 و TNF-α توسط سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی ندارد، در صورتی که در حضور LPS یا PHA سیتوکین‌های تولید شده بیشتر از گروه کنترل می‌باشد (11). این نتایج با نتایج به دست آمده توسط Houghting و همکاران که نشان دادند تولید سیتوکین‌های خونی از جمله IL-6 در موش‌هایی که به آنان مرفین تزریق گردیده بود (یک دوز10mg/kg) به طور چشمگیری (4-2 برابر گروه کنترل) افزایش داشت، متناقض می‌باشند(17).

بررسی اثرات دراز مدت مواد افیونی خاص همچون هروئین، بر سیستم ایمنی انسانی محدود به چند پژوهش می‌باشد که به صورت *in-vitro* به بررسی سیتوکین‌ها پرداخته‌اند (12,31). تریاک حاوی بیش از 40 آلکالوئید مختلف شامل مرفین، کدئین و مقدار زیادی ناخالصی می‌باشد (33, 41). ضمناً اکثر افراد وابسته به مواد مخدر سیگار نیز استعمال می‌نمایند که خود می تواند بر سیستم ایمنی تأثیر داشته باشد. به دلیل ناهماهنگی نتایج تحقیقات گذشته که اکثراً بر روی گلبول‌های تفکیک شده انجام گرفته و با توجه به اینکه تا کنون تحقیقی که به بررسی لنفوسیت‌های کمک کننده (T-helpers) افراد وابسته به تریاک پرداخته باشد، انجام نگرفته است, بر آن شدیم تا اثرات دراز مدت وابستگی به تریاک استنشاقی را، بر سیستم ایمنی افراد بررسی نماییم. بدین منظورغلظت پلاسمایی IL-2 که نشانگرتعداد و فعالیت لنفوسیت‌های کمک کننده تیپ یک (Th1) ، IL-10 که نشانگرتعداد و فعالیت لنفوسیت‌های کمک کننده تیپ دو (Th2) و TGF-β که نشانگرتعداد و فعالیت لنفوسیت‌های کمک کننده تیپ سه (Th3, لنفوسیت‌های کمک کننده تنظیمی) می‌باشند تعیین شد (*in-vivo* investigation) و سپس تولید سیتوکین‌های نام برده شده در حضور محرک‌های LPS و PHA در محیط آزمایشگاه (*ex-vivo*) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

در این مطالعه تعداد 23 نفر مرد وابسته به تریاک استنشاقی، که سیگار نیز استعمال می‌نمودند و محدوده سنی آنان 28/4±4/1 (میانگین±انحراف معیار) سال بود به عنوان گروه وابسته، و تعداد 12 مرد سیگاری که مواد افیونی مصرف نمی‌کردند و محدوده سنی آنان 26/5 ±4/3 سال بود به عنوان گروه کنترل شرکت داده شدند. افراد وابسته از میان مراجعه کنندگان به مجتمع خدمات بهزیستی نوید کرمان و افراد گروه کنترل از میان افراد سیگاری جامعه انتخاب شدند. معیارهای ورود به مطالعه در دو گروه شامل جنس (مرد)، سن (25-35 سال)، تعداد سیگار مصرفی در روز (25-15 سیگار در روز) و شمارش گلبول‌های سفید خون محیطی بین 3000 تا 10000 در میلی‌متر مکعب بود. به علاوه معیارهای ذکر شده، افراد گروه وابسته سه معیار ورودی دیگر شامل مدت وابستگی (حداقل 8 ماه و حداکثر 2

www.SID.ir

Archive of SID

سال)، نوع وابستگی (تنها به تریاک)، طریقه مصرف (تنها استنشاقی) را دارا بودند.

بعد از دادن توضیحاتی در باره چگونگی تحقیق و با کسب رضایت از افراد، در ساعت هشت صبح از هر کدام از افراد شرکت کننده در طرح، مقدار 5 میلی‌لیتر خون وریدی هپارینه گرفته شد. خون سریعاً به آزمایشگاه کشت سلولی مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی کرمان انتقال داده شد. یک میلی‌لیتر از خون گرفته شده در ظرف جداگانه‌ای ریخته شد تا جهت شمارش گلبولی (CBC) و تشخیص افتراقی گلبول‌های سفید (diff) استفاده گردد. دو میلی لیتر خون نیزبا سرعت 800g به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ گردید، تا پلاسما جدا گردد. پلاسمای جدا شده مجدداً با سرعت 1200g به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ گردید تا پلاکت‌های موجود در پلاسما کاملاً جدا گردد. این نمونه‌ها جهت مطالعه سیتوکین‌ها تا زمان اندازه‌گیری در فریزر در دمای c °20– نگهداری شد. دو میلی‌لیتر خون نیز جهت آزمایش‌های تحریکیex-vivo مورد استفاده قرار گرفت.

جهت مطالعه ex-vivo پاسخ گلبول‌های خون محیطی به تحریک های ایمنی (پاسخ به عفونت و عوامل محیطی) بررسی گردید. به این منظور از محرک های استاندارد لیپوپلی ساکارید (LPS) و فتو هموآگلیتونین(PHA) استفاده گردید. LPS (Cat No. L-8274)، PHA (Cat No. L-9132) و محیط کشت RPMI-1640 (Cat No. R-8758) ساخت کارخانه سیگما بودند. از پلیت‌های24 خانه ساخت کارخانه (Orange Scientific) انگلستان جهت انکوباسیون سلولی استفاده شد. جهت جلوگیری از آلودگی نمونه‌ها تمامی مواد و وسایل مورد استفاده، یا استریل بوده (محیط کشت، پلیت، و مخلوط PHA/LPS) و یا توسط اتوکلاو (سر سمپلرو سمپلر) استریل شدند.

جهت تحریک سلولی برای هر فرد، چهار چاهک یک پلیت در نظر گرفته شد. به هر چاهک مقدار 500µl خون تام، 450µl محیط کشت (RPMI-1640) و 50µl مخلوطی از PHA/LPS که حاوی 20 میکروگرم LPS و 200 میکروگرم PHA بود اضافه گردید (غلظت نهایی محرک‌ها به ترتیب 1 و 10µg/ml خواهد شد). سپس پلیت‌ها به انکوباتور کشت سلولی که حاوی 95٪ O2 و 5 ٪ CO_2 بود منتقل گردید. پس از گذشت 4، 24، 48 و 72 ساعت (یک چاهک برای هر یک از زمان‌ها)، محتوای چاهک مربوطه به لوله اپندورف منتقل گردید. نمونه مربوطه با سرعت 800g به مدت پنج دقیقه جهت جدا نمودن محلول روئی سانتریفیوژ گردید. محلول جدا شده مجدداً با سرعت 1200g به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ گردید تا پلاکت‌های موجود در پلاسما کاملاً جدا گردد. محلول‌های جدا شده مرحله دوم، جهت مطالعه سیتوکین‌ها (مطالعه *ex-vivo*) استفاده گردید. نمونه‌ها تا زمان اندازه‌گیری سیتوکین‌ها در فریزر با دمای 20– درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جهت تحریک گلبول‌های سفید در این تحقیق از خون تام استفاده گردید. مزیت استفاده از خون تام بر سلول‌های تفکیک شده در مطالعات دیگر، یکی حضور پلاسمای خود فرد می باشد که حاوی مرفین و ترکیبات آن بوده و دیگر اینکه تماس بین سلول‌ها (cell-communication) قطع نمی‌گردد. به علاوه جدا نمودن گلبول‌ها خود ممکن است باعث آلودگی و تحریک یا مرگ برخی از سلول‌ها گردد.

برای هر نمونه (پلاسمای اولیه بدون تحریک = زمان صفر و پلاسماهای جدا شده پس از 4، 24، 48 و 72 ساعت تحریک) غلظت سیتوکین‌های IL-2، IL-10 و1 TGF-β به روش الیزا تعیین گردید. کیت‌های (01620528) IL-2، (01620525) IL-10 و کیت (01205634)TGF-β1 ساخت کارخانه Biosource بلژیک بودند. کلیه مراحل انجام آزمایش طبق دستورالعمل کارخانه‌های سازنده کیت‌ها انجام گرفت. برای قرائت جذب نوری از دستگاه الیزا ریدر (Plate reader) استاد فاکس ساخت آمریکا استفاده گردید.

بررسی آماری نتایج با برنامه SPSS-11.5 انجام گردید. ابتدا تست آماری نرمالیتی برای هر یک از پارامتر ها صورت گرفت و با توجه به توزیع نرمال از روش آماری پارامتریک استفاده گردید. برای مقایسه بین گروه‌ها از تست آماری تی غیروابسته (unpaired t-test) و جهت مقایسه بین گروهی در زمان‌های مختلف از تست آماری repeated measure ANOVA استفاده گردید. تفاوت‌هایی معنی دار تلقی گردید که مقدارp آنان کمتر از 0/05 بود. در نمودارها میانگین±خطای معیار نمایش داده شده، در صورتی که در متن میانگین و انحراف معیار بیان شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

میانگین سن افراد وابسته برابر 4/1 ± 28/4 سال بود، که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با گروه غیروابسته (4/3± 26/5) نداشت. متوسط روزانه استعمال سیگار نیز بین دو گروه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (21/3 در مقابل 20/3 نخ سیگار در روز). افراد وابسته شرکت داده شده در این مطالعه (n =23)، روزانه بین 1 تا 6 گرم تریاک به صورت استنشاقی مصرف می‌نمودند (3/05±1/52). این افراد به طور متوسط روزانه بین 15 تا 25 نخ سیگار نیز استعمال می‌نمودند. دو گروه از لحاظ سن نیز تفاوت معنی‌داری نداشتند (جدول 1).

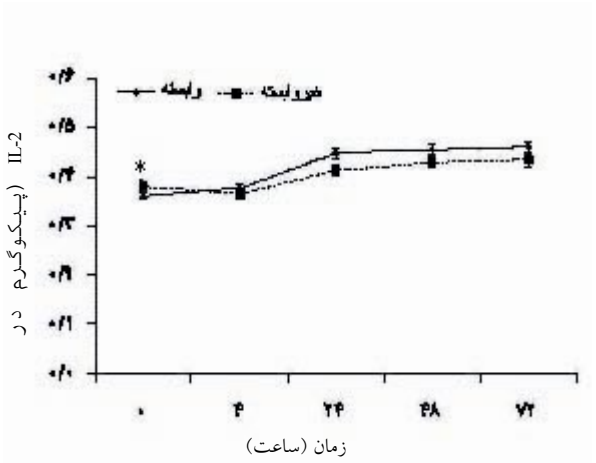
جدول 1: *نتایج آزمایش CBC، تفکیک گلبول‌های سفید خون محیطی، اندکس گلبول‌های قرمز و سن افراد در دو گروه وابسته به تریاک استنشاقی و افراد گروه کنترل*

گروه / پارامتر	وابسته به تریاک میانگین ± انحراف معیار	کنترل میانگین ± انحراف معیار	اختلاف آماری (p)
سن (سال)	28/43±4/05	26/50±4/30	0/211
WBC ($x10^3/\mu L$)	6/30±2/11	5/23±1/45	0/082
RBC ($x10^6/\mu L$)	4/79±0/63	5/56 ± 0/58	0/01
Hb (g/dl)	13/91±1/87	16/45±1/45	0/01
Hct (%)	39/82±5/28	48/40±4/15	0/01
MCV (fL)	82/41±5/88	86/39±6/01	0/074
MCH (pg)	28/73±2/57	29/21±1/66	0/515
MCHC (g/dl)	34/90±1/91	33/97±1/24	0/092
Poly (%)	60/00±11/75	50/33±6/84	0/004
Lymph (%)	34/74±11/47	44/50±6/93	0/004
Mono (%)	2/96±1/11	2/67±0/65	0/335
Eosin (%)	1/91±0/85	1/92±0/29	0/985
Baso (%)	0/30±0/64	0/39±0/17	0/434
PLT ($x10^3/\mu L$)	153/48±38/14	190/67±45/23	0/025

www.SID.ir

Archive of SID

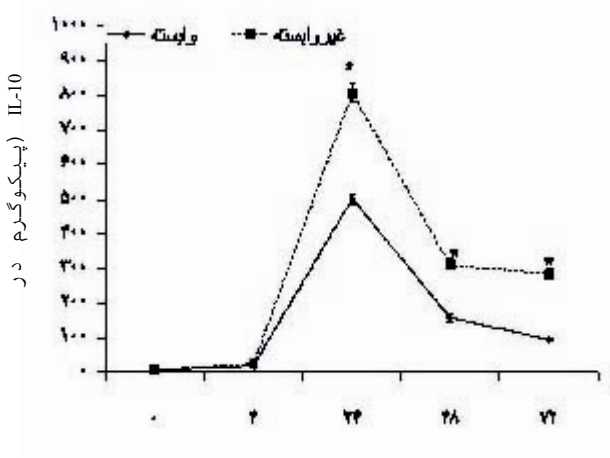
میانگین غلظت پلاسمایی IL-2 در افراد گروه کنترل 0/020 ± 0/381 pg/ml بود. این مقدار برای گروه وابسته به تریاک 0/023 ± 0/361 pg/ml بود، که از نظر آماری اختلاف بین دو گروه معنی‌دار است (P<0/05). پس از تحریک خون محیطی با مخلوطی از LPS و PHA برای 4، 24، 48 و 72 ساعت، افزایش مختصری در غلظت IL-2 در هر دو گروه مشاهده شد. در گروه کنترل، پس از چهار ساعت تحریک، کاهش اندکی در غلظت IL-2 مشاهده شد که این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود (P<0/072).



نمودار 1: *غلظت پلاسمایی IL-2 (زمان صفر) و در محیط کشت پس از 4، 24، 48 و 72 ساعت تحریک با مخلوطی از LPS و PHA*

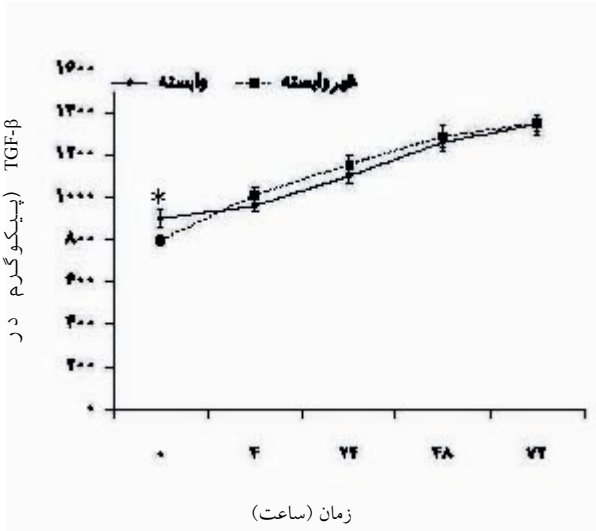
از نظر آماری بین غلظت ساعات 4، 24، 48 و 72 ساعت با کنترل در هر دو گروه اختلاف معنی داری مشاهده گردید (p<0/005)، لیکن پس از ساعت 24 تغییرات به صورت کفه در آمد. علامت ستاره اختلاف معنی‌دار بین دو گروه را نشان می‌دهد (p<0/05).

پاسخ به تحریک در زمان‌های 24، 48 و 72 ساعت، در مقایسه با زمان صفر و یا زمان 4 ساعت اختلاف معنی‌داری داشت (P<0/05)، اما تفاوت بین نتایج 24، 48 و 72 ساعت معنی‌دار نبود. در گروه وابسته به تریاک بر خلاف گروه کنترل، افزایش مختصری پس از 4 ساعت تحریک مشاهده شد که از نظر آماری معنی‌دار بود (P<0/05). به علاوه نتایج تحریک در ساعت‌های 24، 48 و 72 ساعت نیز در مقایسه با زمان صفر یا 4 ساعت، افزایش معنی داری را نشان می‌داد (P<0/001)، لیکن مقایسه نتایج 24، 48 و 72 ساعت با هم تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. نهایتاً، مقایسه آماری نتایج تحریک بین گروه کنترل و گروه وابسته تنها در زمان 24 ساعت معنی‌دار گردید (P<0/05). خلاصه نتایج IL-2 در نمودار شماره یک نشان داده شده است.



نمودار 2: غلظت پلاسمایی IL-10 (زمان صفر) و در محیط کشت پس از 4، 24، 48 و 72 ساعت تحریک با مخلوطی از LPS و PHA

از نظر آماری بین غلظت ساعات 4، 24، 48 و 72 ساعت با کنترل در هر دو گروه اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید (P<0/001). اختلاف بین دو گروه نیز معنی‌دار بود. علامت * اختلاف معنی‌دار بین دو گروه را نشان می‌دهد (P<0/001).



نمودار 3: *غلظت پلاسمایی TGF-β1 (زمان صفر) و در محیط‌های کشت پس از 4، 24، 48 و72 ساعت تحریک با مخلوطی از LPS و PHA*

www.SID.ir

Archive of SID

از نظر آماری بین غلظت ساعات 4، 24، 48، 72 با کنترل در هر دو گروه اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ($P<0/001$). علامت ستاره اختلاف معنی‌دار بین دو گروه را نشان می‌دهد ($P<0/05$).

میانگین غلظت پایه پلاسمایی TGF-β1 در افراد گروه کنترل pg/ml 92/42±798/40 و در افراد گروه وابسته به تریاک pg/ml 196/8±900/5 بود، که از نظر آماری اختلاف بین دو گروه معنی‌دار است ($P<0/05$). پس از تحریک خون محیطی با مخلوطی از PHA/ LPS برای 4، 24، 48 و 72 ساعت، افزایش معنی‌داری در غلظت TGF-β1 در هر دو گروه مشاهده شد ($P<0/001$)، اما تغییرات بین نتایج 48 و 72 ساعت در هیچ‌کدام از دو گروه معنی‌دار نگردید. مقایسه آماری نتایج تحریک بین گروه کنترل و گروه وابسته در هیچ یک از زمان‌های تحریک معنی دار نگردید. خلاصه نتایج TGF-β1 در نمودار3 نشان داده شده است.

نتایج CBC دو گروه وابسته و غیروابسته در جدول شماره یک نشان داده شده است. مقایسه آماری دو گروه نشان داد که افراد وابسته به تریاک استنشاقی دارای تعداد گلبول قرمز کمتری نسبت به افراد گروه کنترل می‌باشد ($P<0/001$). همچنین مقدار هموگلوبین و هماتوکریت آنان نیز از گروه کنترل کمتر بود ($P<0/001$)، در صورتی که در دیگر اندکس‌های گلبول قرمز (MCV، MCH و MCHC) اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. از نظر نوع گلبول‌ها درصد پلیمورف‌ها در افراد وابسته بیشتر از غیر وابسته بود ($P<0/001$)، در صورتی که در صد لنفوسیت‌های آنان کمتر از گروه غیر وابسته بود ($P<0/01$). نهایتاً، پلاکت‌های گروه وابسته نیز به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود ($P<0/03$).

بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از مواد افیونی به عنوان ضد درد از دیرباز رایج بوده، لیکن استفاده مداوم آن باعث وابستگی می‌گردد. یکی از دلایل وابستگی، کاهش یا عدم سنتز اندورفین‌ها می‌باشد که به طور مستقیم یا غیرمستقیم بر عملکرد بافت‌های مختلف بدن تأثیر می‌گذارد. این اختلال در عملکرد بافتی و یا سلولی نتیجه اشغال بیش از حد گیرنده‌های اپیوئیدی (σ و μ و κ) توسط مواد افیونی می‌باشد. مطالعات مختلف وجود هر سه نوع گیرنده را بر روی گلبول‌های سفید خون محیطی نشان داده است (7,19,20,26,28,29,32,35). نتایج به دست آمده از مطالعات مختلف که بر روی حیوانات آزمایشگاهی (3,15,27,29,40)، گلبول‌های خون محیطی تفکیک شده حیوانات مختلف (5,6,15,28,38,39,40) انسان (12,38) و یا با استفاده از رده‌های سلولی شناخته شده (لنفوسیت و منوسیت) انجام گردیده (40-38, 10,15,31)، نشانگر اثرات مستقیم و یا غیرمستقیم مرفین یا مشتقات آن بر سیستم‌های ایمنی (humoral و cellular) می‌باشند. نتایج تحقیقات گذشته نشان دادند که اشغال گیرنده‌های اپیوئیدی توسط اندورفین‌ها و یا مواد افیونی تأثیر مستقیم بر آزادسازی سیتوکین‌ها، رشد سلولی، تقسیم سلولی و تمایز (cell differentiation) گلبول‌های سفید خون محیطی دارد. در مورد وابستگی به تریاک استنشاقی و اثرات آن بر سیستم ایمنی اطلاعاتی یافت نگردید، و نتایج تحقیق حاضر شاید اولین موردی باشد که به بررسی این موضوع به صورت واقعی‌تر (مصرف تریاک به همراه سیگار) پرداخته است.

بررسی غلظت پلاسمایی IL-2 نشان داد که غلظت این سیتوکین در افراد وابسته به تریاک به طور معنی‌داری کمتر از افراد غیر وابسته می‌باشد ($P<0/05$). این نتایج با نتایج مطالعات دیگری که در این زمینه صورت گرفته (14,23,34) همخوانی کامل دارد. دلیل این کاهش که توسط این محققین (14,23,34) عنوان گردیده، این نکته می‌باشد که مرفین سنتز IL-2 را در سطح پیش از ترجمه mRNA کاهش می‌دهد، در صورتی که در حضور محرکی همچون LPS اثر محرک را تشدید نموده و باعث سنتز بیشتر IL-2 می‌گردد (27,35). نتایج تحریک خون تام با مخلوطی از LPS و PHA افزایش اندکی در غلظت IL-2 را در هر دو گروه سبب گردید. گرچه از نظر آماری اختلاف بین زمان تحریک 4 و 24 ساعت در هر دو گروه معنی‌دار بود ($P<0/05$)، لیکن ادامه زمان تحریک باعث افزایش غلظت IL-2 در هیچ یک از گروه‌ها نگردید. این نتایج نیز با نتایج Roy و همکاران که اثر مرفین و LPS را در موش به صورت *in-vivo* بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که مرفین اثرات LPS را تشدید می‌نماید، همخوانی دارد

www.SID.ir

Archive of SID

(35). احتمالاً، اندک افزایش گروه وابسته نسبت به گروه کنترل در تحقیق حاضر (اگر چه از نظر آماری تنها در 24 ساعت پس از تحریک اختلاف معنی دار بود) نیز به همین دلیل باشد.

غلظت پلاسمایی IL-10 افراد وابسته نسبت به افراد غیر وابسته افزایش مختصری را نشان می داد که از لحاظ آماری معنی دار بود ($P<0/05$). این نتایج با مطالعه Pacifici و همکاران همخوانی داشت (27). پس از تحریک خون تام با مخلوطی از LPS و PHA در زمان‌های مختلف، افزایش در ترشح IL-10 در هر دو گروه مشاهده گردید که الگویی موازی یکدیگر داشتند. حداکثر افزایش‌های مشاهده شده پس از 24 ساعت سیر نزولی داشت (نمودار 2). نتایج به دست آمده نشان داد که غلظت IL-10 تولید شده در گروه وابسته نسبت به گروه غیر وابسته کمتر است ($P<0/001$). این نتایج نیز با نتایج قبلی همخوانی کامل دارد (16,22). افزایش مختصر IL-2 و کاهش چشمگیر IL-10 در افراد وابسته به تریاک استنشاقی ممکن است نشانگر این نکته باشد که در زمان عفونت، روند تمایز (cell differentiation) لنفوسیت‌های کمک کننده (TH) از TH2 به سمت TH1 تغییر می‌نماید، در صورتی که در حالت عادی، عملکرد لنفوسیت‌ها از TH1 به سمت TH2 تغییر می نماید. این فرضیه با نتایج به دست آمده در مدل‌های حیوانی (35, 36) که فقط از مرفین تزریقی استفاده نموده و نتیجه گرفتند که روند عملکرد از TH1 به TH2 می‌باشد، فقط در قسمت دوم همخوانی دارد. شاید دلیل تفاوت در نتیجه‌گیری‌ها به دلیل اختلاف در ماده افیونی مصرفی و عدم تحریک با مخلوطی از LPS و PHA در تحقیق آنان باشد. پی‌بردن به دلیل این اختلاف مطالعات بیشتری را طلب می نماید.

غلظت پایه پلاسمایی TGF-β1 افراد وابسته به تریاک استنشاقی به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود ($P<0/05$)، در صورتی که پس از تحریک خون تام آنان با مخلوط PHA/LPS برای زمان‌های مختلف، سیر صعودی (تا 72 ساعت پس از تحریک) در غلظت این سیتوکین مشاهده گردید که با افزایش به دست آمده در گروه کنترل تفاوتی نداشت. افزایش مشاهده شده در غلظت پلاسمایی افراد وابسته می‌تواند به دلیل مصرف تریاک (11) و یا به دلیل چسبندگی و یا لیز پلاکت‌های این افراد باشد (2). به علاوه، Bhat و همکاران از مطالعه خود چنین نتیجه گرفتند که افزایش TGF-β1 افراد وابسته به دلیل مرفین مصرفی آنان می باشد، که خود می‌تواند باعث مرگ برنامه ریزی شده (apoptosis) ماکروفاژهای این افراد گردد (4). TGF-β1 که به آن لقب سیتوکین سلول‌های TH3 داده شده (1, 21, 42, 43) در تنظیم سیستم ایمنی (21, 42, 44)، مرگ برنامه‌ریزی شده ماکروفاژها (4) و سرکوب (suppression) TH1 (43) نقش دارد. نقش دیگر آن, فاکتور ضد مرگ سلولی لنفوسیت‌های T عنوان گردیده است (9). به همین دلایل این سیتوکین را یک تنظیم کننده سیستم ایمنی لقب داده‌اند. از نتایج تحقیق حاضر می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که در اثر عفونت (تحریک سیستم ایمنی) تولید TGF-β1 افراد وابسته به تریاک استنشاقی در مقایسه با افراد سیگاری هیچ تفاوتی ندارد، در صورتی که مصرف تریاک باعث افزایش سطح پایه این سیتوکین می‌گردد.

مقایسه آماری نتایج به دست آمده نشان داد که بین تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت افراد گروه وابسته نسبت به گروه غیر وابسته کاهش معنی‌داری ($P< 0/001$) وجود دارد، در صورتی که در دیگر اندکس‌های گلبول قرمز (MCV، MCH و MCHC) اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید.

در گذشته نشان داده شده که کشیدن سیگار باعث افزایش تعداد گلبول‌های قرمز، مقدار هموگلوبین و درصد هماتوکریت می‌گردد (8, 25, 30). با توجه به این نکته که تفاوت معنی‌داری بین مصرف سیگار، سن و جنس افراد دو گروه در این مطالعه نبود، شاید این گونه بتوان نتیجه گرفت که کاهش در تعداد گلبول‌های قرمز، مقدار هموگلوبین و در صد هماتوکریت در گروه وابسته در تحقیق حاضر به دلیل مصرف تریاک استنشاقی بوده است. دلایل مختلفی برای این کاهش‌ها در میان افراد وابسته می‌توان عنوان نمود. یکی از این دلایل ناخالصی‌های موجود در تریاک مصرفی آنان می‌باشد. این مطلب در مقاله مروری Dams و همکاران بررسی گردیده است (13). آنها نشان دادند که ناخالصی‌های موجود در مواد مخدر همیشه یکسان نمی‌باشد، و باعث اختلالات متفاوتی در مصرف کنندگان می‌گردد. کاهش گلبول‌های قرمزدر افراد گروه وابسته در این تحقیق، ممکن است به دلیل ناخالصی‌های موجود در تریاک مصرفی آنان باشد، که در

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه سبب کاهش غلظت هموگلوبین و هماتوکریت آنان نیز گردیده است. از طرفی Malik و همکاران نشان داده‌اند که مرفین وارد شده به مغز استخوان باعث مرگ سلولی (apoptosis) 20٪ از سلول‌های مغز استخوان می‌گردد (24). این نکته نیز احتمالا دلیل دیگری برای کاهش در تعداد گلبول‌های قرمز افراد وابسته می‌باشد.

پلاکت افراد وابسته نیز به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود ($P<0/05$). نتایج تحقیقات گذشته نشان داده که مرفین می‌تواند باعث چسبندگی پلاکت‌ها (platelet aggregation) شده و کلسیم داخل سلولی این سلول‌ها را نیز افزایش دهد (18,37). در نتیجه ممکن است کاهش تعداد پلاکت‌ها در افراد وابسته به دلیل چسبندگی آنها باشد. از طرفی وجود ناخالصی‌های تریاک مصرفی نیز احتمالاً به این سلول‌ها آسیب رسانده و باعث لیز آنان شده باشد.

از نتایج تحقیق حاضر می‌توان نتیجه‌گیری نمود که افراد سیگاری وابسته به تریاک استنشاقی، در مقایسه با افراد سیگاری غیر وابسته دارای لنفوسیت‌های کمک‌کننده TH2 و TH3 بیشتری در خون محیطی‌شان هستند، در صورتی که لنفوسیت‌های کمک کننده TH1 آنان کمتر است، لیکن در زمان ابتلاء به عفونت، به دلیل فعالیت کمتر لنفوسیت‌های TH2 و فعالیت بیشتر TH1 ممکن است آنها را در معرض آسیب بیشتری قراردهد.

تشکر و قدردانی

کلیه هزینه‌های این تحقیق توسط مرکزتحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی کرمان بر اساس طرح شماره (ع/16-81) تأمین گردیده و با همکاری مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام شده است. بدین وسیله نویسندگان تشکر و قدردانی خود را از این مراکز اعلام می‌دارند.

Summary

Activity of T-Helper Lymphocytes in Opium Dependent and Non-dependent Individuals

Esmaeili F., MSc.[1] and Moshtaghi-Kashanian Gh., PhD.[2]

1. Faculty Member, Department of Physiology and Pharmacology, 2. Assistant Professor of Biochemistry, Department of Biochemistry, Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran

Opium derivatives affect the function and differentiation of peripheral leucocytes, directly or indirectly. Previous researches have shown that these cells respond to the endorphins through their opioid receptors (σ, μ and κ). There are many reports about the effect of morphine and heroin on immune system of dependent people, but there is no report on the functions of T-helper lymphocytes in opium dependent individuals. For this reason, this study was designed to survey (in-vivo and ex-vivo) the effect of opium smoking on immune system of dependent male individuals. To carry out the investigation, 5 ml of heparinized peripheral blood was collected from each of the 23 opium dependant males (28.44±4.05 years old) and 12 males (26.50±4.30 years old) who served as control group. Individuals in both groups were smoking cigarettes (15-25 cigarettes per day). Part of the collected blood was used for blood cell count (CBC) and preparation of 0.5 ml plasma for evaluation of IL-2, IL-10 and TGFβ1 and the rest was used for stimulation of the whole blood with a mixture of LPS (10 μg/ml) and PHA (10μg/ml) for 4, 24, 48 and 72 hours. According to the results, in the dependent group plasma concentration of IL-10 and TGF-β1 were higher ($P<0.05$), while IL-2 concentration was lower ($P<0.05$) comparing to the control group. Evaluation of TGF-β1 in the supernatant of stimulated whole blood of both groups showed similar pattern for TGF-β1 (non- significant), while synthesis and release of IL-10 were less and concentration of IL-2 was higher ($P<0.001$) in the opium dependent group. In conclusion opium dependent cigarette smokers have higher numbers of circulating TH2 and TH3 lymphocytes and lower number of TH1 than non-dependent cigarette smokers. However, due to lower activity of TH2 and higher activity of TH1 lymphocytes, dependent individuals may be at higher risk during infections.

Key words: *T-helper lymphocytes, IL-2, IL-10, TGF-β1, opium dependency*
Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2005; 12(1): 39-49

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Andersson P.O, Olsson A and Wadenvik H. Reduced transforming growth factor-beta1 production by mononuclear cells from patients with active chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2002; 116(4): 862-7.
2. Andersson P.O, Stockelberg D, Jacobsson S, Wadenvik H. A transforming growth factor-beta1-mediated bystander immune suppression could be associated with remission of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol* 2000; 79(9): 507-13.
3. Barr M.C, Billaud J.N, Selway D.R, *et al.* Effects of multiple acute morphine exposures on feline immunodeficiency virus disease progression. *J Infect Dis* 2000; 182(3): 725-32.
4. Bhat RS, Bhaskaran M, Mongia A, Hitosugi N and Singhal P.C. Morphine-induced macrophage apoptosis: oxidative stress and strategies for modulation. *J Leukoc Biol* 2004; 75(6): 1131-8.
5. Bian T.H and Li X.Y. Immunomodulating effects of morphine microinjected into periaqueductal gray. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1995; 16(2): 121-4.
6. Bian T.H, Wang X.F and Li X.Y. Effect of morphine on interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha production from mouse peritoneal macrophages *in vitro*. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1995; 16(5): 449-51.
7. Bidlack JM. Detection and function of opioid receptors on cells from the immune system. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7(5): 719-23.
8. Bjorke Monsen A.L, Vollset S.E, Refsum H, Markestad T and Ueland P.M. Hematological Parameters and Cobalamin Status in Infants Born to Smoking Mothers. *Biol Neonate* 2004; 85(4): 249-255.
9. Cerwenka A and Swain SL. TGF-beta1: immunosuppressant and viability factor for T lymphocytes. *Microbes Infect* 1999; 1(15): 1291-6.
10. Chao C.C, Gekker G, Sheng W.S, Hu S, Tsang M and Peterson P.K. Priming effect of morphine on the production of tumor necrosis factor-alpha by microglia: implications in respiratory burst activity and human immunodeficiency virus-1 expression. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 269(1): 198-203.
11. Chao C.C, Hu S, Molitor T.W, *et al.* Morphine potentiates transforming growth factor-beta release from human peripheral blood mononuclear cell cultures. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 262(1): 19-24.
12. Chao C.C, Molitor T.W, Close K, Hu S and Peterson P.K. Morphine inhibits the release of tumor necrosis factor in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Int J Immunopharmacol* 1993; 15(3): 447-53.
13. Dams R, Benijts T, Lambert W.E Massart D.L., De leenheer A.P. Heroin impurity profiling: trends throughout a decade of experimenting. *Forensic Sci Int* 2001; 123(2-3): 81-8.
14. Gomez-Flores R and Weber R.J. Inhibition of interleukin-2 production and downregulation of IL-2 and transferrin receptors on rat splenic lymphocytes following PAG morphine administration: a role in natural killer and T cell suppression. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19(6): 625-30.
15. Gomez-Flores R and Weber R.J. Differential effects of buprenorphine and morphine on immune and neuroendocrine functions following acute administration in the rat mesencephalon periaqueductal gray. *Immunopharmacology* 2000; 48(2): 145-56.
16. Holan V, Zajicova A, Krulova M, Blahoutova V and Wileczek H. Augmented production of proinflammatory cytokines and accelerated allotransplantation reactions in heroin-treated mice. *Clin Exp Immunol* 2003; 132(1): 40-5.
17. Houghtling R.A and Bayer B.M. Rapid elevation of plasma interleukin-6 by morphine is dependent on autonomic stimulation of adrenal gland. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300(1): 213-9.
18. Hsiao G, Shen M.Y, Fang C.L, *et al.* Morphine-potentiated platelet aggregation in *in vitro* and platelet plug formation in *in vivo*

www.SID.ir

Archive of SID

experiments. *J Biomed Sci* 2003; 10(3): 292-301.

19. Ignatowski T.A and Bidlack J.M. Detection of kappa opioid receptors on mouse thymocyte phenotypic subpopulations as assessed by flow cytometry. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284(1): 298-306.
20. Ignatowski T.A and Bidlack J.M. Differential kappa-opioid receptor expression on mouse lymphocytes at varying stages of maturation and on mouse macrophages after selective elicitation. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;290(2): 863-70.
21. Kitani A, Chua K, Nakamura K and Strober W. Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/T regulatory cell 1 T cells. *J Immunol* 2000; 165(2): 691-702.
22. Limiroli E, Gaspani L, Panerai A.E and Sacerdote P. Differential morphine tolerance development in the modulation of macrophage cytokine production in mice. *J Leukoc Biol* 2002; 72(1): 43-8.
23. Lissoni P, Mandala M and Brivio F. Abrogation of the negative influence of opioids on IL-2 immunotherapy of renal cell cancer by melatonin. *Eur Urol* 2000; 38(1): 115-8.
24. Malik A.A, Radhakrishnan N, Reddy K, Smith A.D and Singhal P.C. Morphine-induced macrophage apoptosis modulates migration of macrophages: use of *in vitro* model of urinary tract infection. *J Endourol* 2002; 16(8): 605-10.
25. Maurel A, Apovo M, Beuzard Y, Boynard M and Lagrue G. [Effect of smoking on blood rheology]. *J Mal Vasc* 1997; 22(4): 239-43.
26. Neumeyer J.L, Mello N.K, Negus S.S and Bidlack J.M. Kappa opioid agonists as targets for pharmacotherapies in cocaine abuse. *Pharm Acta Helv* 2000; 74(2-3): 337-44.
27. Pacifici R, di Carlo S, Bacosi A, Pichini S and Zuccaro P. Pharmacokinetics and cytokine production in heroin and morphine-treated mice. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22(8): 603-14.
28. Peng X, Cebra J.J, Adler M.W. Morphine inhibits mucosal antibody responses and TGF-beta mRNA in gut-associated lymphoid tissue following oral cholera toxin in mice. *J Immunol* 2001; 167(7): 3677-81.
29. Peng X, Mosser D.M, Adler M.W, Rogers T.J, *et al.* Morphine enhances interleukin-12 and the production of other pro-inflammatory cytokines in mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 2000; 68(5): 723-8.
30. Perez-Stable E.J, Benowitz N.L and Marin G. Is serum cotinine a better measure of cigarette smoking than self-report? *Prev Med* 1995; 24(2): 171-9.
31. Peterson P.K, Gekker G, Hu S. *et al.* Morphine amplifies HIV-1 expression in chronically infected promonocytes cocultured with human brain cells. *J Neuroimmunol* 1994; 50(2): 167-75.
32. Peterson P.K, Gekker G, Lokensgard J.R. *et al.* Kappa-opioid receptor agonist suppression of HIV-1 expression in CD4+ lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 2001; 61(9): 1145-51.
33. Reddy M.M, Suresh V, Jayashanker G, Rao B.S and Savin P.K. Application of capillary zone electrophoresis in the separation and determination of the principal gum opium alkaloids. *Electrophoresis* 2003; 24(9): 1437-41.
34. Roy S, Chapin R.B, Cain K.J, Charboneau R.G. Ramakrishnan S and Barke RA. Morphine inhibits transcriptional activation of IL-2 in mouse thymocytes. *Cell Immunol* 1997; 179(1): 1-9.
35. Roy S, Charboneau R.G and Barke R.A. Morphine synergizes with lipopolysaccharide in a chronic endotoxemia model. *J Neuroimmunol* 1999; 95(1-2): 107-14.
36. Roy S, Wang J, Gupta S, Charboneau R Loh H.H and Brake R.A. Chronic morphine treatment differentiates T helper cells to Th2 effector cells by modulating transcription factors GATA 3 and T-bet. *J Neuroimmunol* 2004; 147(1-2): 78-81.
37. Sheu J.R, Yeh G.C, Fang C.L, Lin C.H and Hsiao G. Morphine-potentiated agonist-

www.SID.ir

Archive of SID

induced platelet aggregation through alpha2-adrenoceptors in human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 40(5): 743-50.

38. Stefano G.B, Kushnerik V, Rodriquez M and Bilfinger T.V. Inhibitory effect of morphine on granulocyte stimulation by tumor necrosis factor and substance P. *Int J Immunopharmacol* 1994; 16(4): 329-34.
39. Stefano G.B, Leung M.K, Bilfinger T.V and Scharrer B. Effect of prolonged exposure to morphine on responsiveness of human and invertebrate immunocytes to stimulatory molecules. *J Neuroimmunol* 1995; 63(2): 175-81.
40. Wang J, Charboneau R, Balasubramanian S, Barke R.A Loh H.H and Roy S. The immunosuppressive effects of chronic morphine treatment are partially dependent on corticosterone and mediated by the mu-opioid receptor. *J Leukoc Biol* 2002; 71(5): 782-90.
41. Weid M, Ziegler J, Kutchan T.M. The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, Papaver somniferum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(38): 13957-62.
42. Weiner H.L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 207-14.
43. Weiner H.L. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect* 2001; 3(11): 947-54.
44. Zheng S.G, Gray J.D, Ohtsuka K, Yamagiwa S and Horwitz DA. Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J Immunol* 2002; 169(8): 4183-9.

www.SID.ir

Archive of SID

کل مقاله تصحیح و ÷رینت شد. ایرانیار 83/11/11
کل مقاله تصحیح و پرینت شد 83/12/10

نمودارهای در برنامه اکسل تنظیم و پرینت شد. تاریخ نگذاشتم داخل مقاله 83/12/16 ایرانیار
کل مقاله تصحیح و پرینت شد 83/12/24 نمودارها مجددا در فتوشاپ کار شد.
کل مقاله تصحیح مجدد و یکی از نمودارها دوباره در برنامه فتوشاپ تصحیح شد. 84/1/15 ایرانیار
مقاله تصحیح جزئی و ستاره روی نمودارها درست و برای چاپ پرینت شد. 84/1/23
ص 46 تصحیح و برای چاپ پرینت شد. 84/1/27 ایرانیار

www.SID.ir