فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۷ (۱)، ۳۹ – ۵۰
بهار ۱۳۹۲

فیزیولوژی و فارماکولوژی

اثر مورفین بر تغییرات فاکتورهای آپوپتوزی caspase-3, PARP و نسبت Bax/Bcl-2 در هسته اکومبنس در مدل ترجیح مکان شرطی در موش بزرگ آزمایشگاهی

سیده نجمه کاتبی[۱،۲]، یاسمن رضوی[۱،۲]، شبنم ضیغمی علمداری[۲]، شیوا ایرانی[۱]، فریبا خداقلی[۲]، عباس حق پرست[۲*]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست شناسی، تهران

۲. مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

دریافت: ۱ آذر ۹۱ پذیرش: ۲۴ دی ۹۱

چکیده

مقدمه: هسته‌ی اکومبنس (NAc) نقش مهمی در رفتارهای انگیزشی و هدفمند در مدار پاداش ایفا می‌کند. برخی یافته‌ها نشان می‌دهد که مورفین در نورون ها آپوپتوز را القا می‌کند. در حالیکه سایر شواهد نشان می‌دهد که مورفین می‌تواند نقش حفاظتی در برابر آپوپتوز نورون ها داشته باشد. در این مطالعه به منظور بررسی اثر مورفین بر آپوپتوز در هسته اکومبنس موش آزمایشگاهی، تغییرات فاکتورهای آپوپتوزی ارزیابی شد.

روش ها: به منظور بررسی القای فاکتورهای آپوپتوزی در NAc بعد از تزریق میان مدت مورفین به موش‌ها در سه دوز مختلف (۰/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر هر کیلوگرم) در روش ترجیح مکان شرطی، میزان تغییرات فاکتورهای آپوپتوزی caspase-3, PARP و نسبت Bax/Bcl-2 در هسته اکومبنس با روش مولکولی وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج ما نشان داد مقدار فاکتورهای آپوپتوزی در همه‌ی گروه های تحت تیمار مورفین افزایش می‌یابد. در هسته اکومبنس بیشترین میزان افزایش ($P<0.01$) caspase-3 ($P<0.01$), PARP و نسبت Bax/Bcl-2 ($P<0.01$) در مقایسه با گروه کنترل سالین در کمترین دوز مورفین (۰/۵ میلی گرم در هر کیلوگرم) می‌باشد، در حالی که در دوزهای دیگر چنین افزایشی دیده نمی‌شود.

نتیجه گیری: افزایش میزان فاکتورهای آپوپتوزی در گروه های تحت تیمار مورفین در مقایسه با گروه کنترل نشان دهنده‌ی تأثیر مورفین از طریق گیرنده ای با بیشترین میل اتصالی به گیرنده های اپیوئیدی بر مکانیسم‌های مولکولی موثر بر آپوپتوز می‌باشد. به نظر می‌رسد با افزایش دوزهای مورفین، گیرنده های اپیوئیدی دیگری فعال شده‌اند که اثرات حفاظتی در برابر اثرات آپوپتوزی در نورون های هسته اکومبنس اعمال کرده‌اند.

واژه‌های کلیدی: مورفین، آپوپتوز، هسته اکومبنس، ترجیح مکان شرطی، وسترن بلات، موش بزرگ آزمایشگاهی

مقدمه

اعتیاد عبارت است از حالت وابستگی اکتسابی که در نتیجه استعمال مداوم دارو در بدن حاصل می‌شود همچنین استعمال مکرر دارو موجب کاسته شدن اثرات تدریجی می‌گردد و پس از مدتی شخص می‌تواند مقادیر سمی دارو را در بدن بدون ناراحتی تحمل کند.[1]

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: Haghparast@yahoo.com

وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

1. www.dchq.irhtmlindex.php

Archive of SID
www.SID.ir

در صورت دریافت داروهایی که سوء مصرف ایجاد می‌کنند از جمله مورفین، نیکوتین، کوکائین، الکل و... مدار نورونی در مغز به نام مدار پاداش فعال می‌شود که نتیجه‌ی آن ایجاد احساس آرامش و بی‌دردی در فرد می‌باشد. پدیده‌ی پاداش به عنوان پایه پدیده اعتیاد مطرح است [۱۷]. ساختمان‌های عصبی درگیر در فرایند پاداش شامل مجموعه‌ای از ساختمان‌های مغز قدامی هستند. این سیستم شامل هسته‌ی اکومبنس[1]، آمیگدال و بخشی از کورتکس میانی- قدامی فرونتال و هیپوکامپ می باشد [۴، ۱۴، ۲۰]. ساختمان های فوق تعداد بسیار زیادی نورون‌های دوپامینرژیک را که از ناحیه تگمنتوم شکمی[2] در مغز میانی گسیل می‌شوند، دریافت می‌کنند. داروهای اعتیادآور، آزادسازی دوپامین را در این سیستم افزایش داده و یا سبب افزایش اثرات دوپامینی در هسته‌ی اکومبنس و ساختمان های مربوطه می‌شوند [۵]. هسته‌ی اکومبنس، مجموعه‌ای از نورون‌هاست که در محل تلاقی سر هسته دم دار و قسمت قدامی پوتامن واقع است [۲۲]. از سال ۱۹۷۰ که یافته‌هایی احتمال دخالت رسپتورهای اپیوئیدی اندوژن را افزایش داد، تحقیقات بسیاری درباره‌ی مسیرهای مولکولی داخل سلولی تحت تأثیر سیستم-های میانجی عصبی-گیرنده انجام شد [۱۶]. علیرغم مشخص بودن نقش اپیوئیدها بر مدار پاداش، مکانیسم سلولی و مولکولی اثر این مواد در مدار پاداش به خوبی مشخص نمی‌باشد. تحقیقات نشان داده، تزریق مکرر اپیوئیدهایی مثل مورفین بیان ژن‌ها را در نواحی مختلف مغز تغییر می‌دهد و شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد فاکتورهای رونویسی در حالت حساسیت به مورفین و مقاومت به مورفین القا می‌شوند [۲]. از طرفی مورفین از طریق فعال کردن رسپتورهای اپیوئیدی می‌تواند مرگ برنامه ریزی شده‌ی سلولی را راه اندازی کند [۶]. علاوه بر آن دیده شده است که مورفین می‌تواند بیان رسپتورهای مرگ را در سطح سلول افزایش دهد [۱۱]. سیگنال‌های اختصاصی آپپتوز با راه اندازی فرآیندهایی سلول را به سمت آپپتوز پیش می‌برند. در این فرآیندها پروتئین‌های اختصاصی به عنوان فاکتورهای آپپتوزی نقش دارند. کاسپازها گروهی از این پروتئین‌ها هستند که در مراحل اولیه‌ی آپپتوز فعال می‌شوند. PARP[3] پروتئینی است که به DNAی تک رشته وصل می‌شود و در ترمیم آن نقش دارد، PARP سوبسترای کاسپازهای خاصی است از جمله کاسپاز ۳ و کاسپاز ۷. کاسپازها به طور پیوسته در تمام سلول‌ها به صورت پروآنزیم ساخته می‌شوند و در پاسخ به محرک‌های پروآپوپتوتیک فعال می‌شوند. این پروتئین‌ها ترکیبات کلیدی سلول را شامل پروتئین‌های ساختاری در اسکلت سلولی و پروتئین‌های هسته‌ای مثل آنزیم‌های ترمیم DNA را تخریب می‌کنند. پروتئین‌های خانواده Bcl-2[4] گروهی از آنها هستند که شامل فاکتورهای آنتی آپپتوزی (Bcl-2 ,B-xl ,...) و پروآپپتوزی (Bax[5], Bad یا Bid) می‌باشند. حساسیت سلول به آپپتوز به تعادل فاکتورهای پروآپپتوزی و آنتی آپپتوزی خانواده Bcl-2 بستگی دارد [۸]. بعضی یافته‌ها نشان می‌دهد مورفین برای نورون‌ها سمی است و آپپتوز را القا می‌کند درحالی‌که شواهد دیگر به اثرات مفید مورفین اشاره می‌کند [۲۴]. مطالعات نشان داده‌اند که تیمار طولانی مدت موش آزمایشگاهی با مورفین (در حالت وابسته یا مقاوم) با تغییرات قابل توجه فاکتورهای آپپتوزی در ارتباط است. این تغییرات شامل افزایش گیرنده‌ی FAS[6] (فاکتور پروآپپتوزی) و کاهش Bcl-2 (فاکتور آنتی آپپتوزی) در مغز می‌باشد [۶]. همچنین تزریق مورفین منجر به افزایش پروتئین‌های caspase-3[7] و Bax (پروآپپتوتیک) و کاهش پروتئین Bcl-2 (آنتی آپپتوزی) در طناب نخاعی موش می‌شود [۱۵]. بنابراین بر آن شدیم تا در این مطالعه اثر مورفین بر آپپتوز را با ارزیابی میزان فاکتورهای آپپتوزی Bcl-2, Bax, caspase-3 و PARP در هسته‌ی اکومبنس بررسی کنیم.

مواد و روش ها

در این مطالعه تعداد ۳۲ موش صحرایی نژاد ویستار به

1. Nucleus Accumbens
2. Ventral Tegmental Area

3. Poly (ADP-ribose) polymerase
4. B-cell lymphoma2
5. Bcl-2 associated protein
6. Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
7. Cysteine aspartate protease-3

Archive of SID
www.SID.ir

وزن تقریبی ۲۸۰-۲۳۰ گرم که به صورت ۳ عدد در هر قفس با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری می‌شدند مورد بررسی قرار گرفتند. سیکل روشنایی و تاریکی به صورت ۱۲ ساعت به ۱۲ ساعت تنظیم شده و دمای اطاق در ۱±۲۳ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شدند. همه آزمایشات طی مجوز شماره ۲۳-۸۰ کمیته اخلاق و پژوهش دانشکده پزشکی دانشگاه شهید بهشتی انجام شد. اثرات تقویت‌کنندگی داروها را می‌توان از طریق آزمایش‌هایی که در آنها دریافت دارو مشروط به یک پاسخ رفتاری خاص است، تعیین کرد. به منظور مطالعه سیستم پاداش مغز از الگوهای تجربی مثل ترجیح مکان شرطی (CPP) استفاده می‌شود.

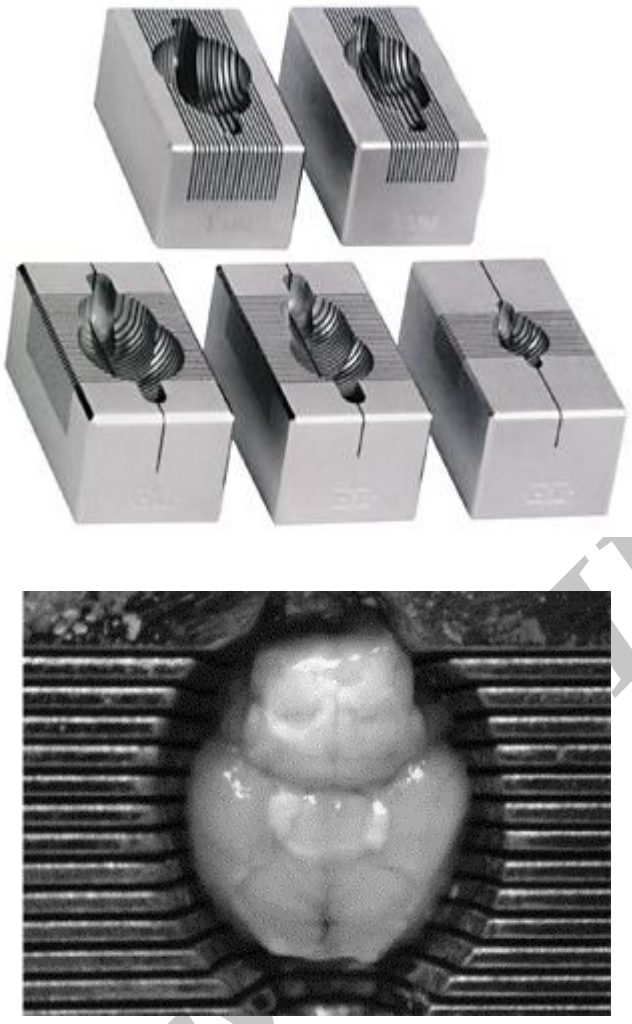
بخش رفتاری شامل روش ترجیح مکان شرطی می باشد، در این روش از چهار گروه موش آزمایشگاهی نر نژاد ویستار استفاده شد که هر گروه شامل ۸ موش بود سه گروه با دوزهای متفاوت (۰/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) تحت تیمار مورفین (تهیه شده از شرکت تماد) بودند و یک گروه به عنوان کنترل سالین دریافت کردند.

دستگاه ترجیح مکان شرطی که در روش ترجیح مکان شرطی استفاده می‌شود از سه محفظه مستطیلی شکل تشکیل شده، دو محفظه بزرگتر با ابعاد۳۰×۳۰×۴۰ است، دستگاه از چوب ساخته شده و در بخش جلویی ناحیه‌ی ورود به دو محفظه بزرگتر همسان، یک بخش مستطیل شکل کوچکتر وجود دارد که از این منطقه امکان دسترسی به دو محفظه دیگر وجود دارد. کف هر کدام از این دو محفظه بزرگتر توسط محرک‌های حسی متفاوتی از هم مجزا شده‌اند به طوری که دیوارها و کف هر محفظه دارای خصوصیات منحصر به فردی می باشد. یک محفظه دارای کف زبر می‌باشد و با دیواره‌هایی که به صورت عمودی سایه خورده‌اند، از محفظه دیگر که کف نرم دارد و دیواره‌هایش به صورت افقی رنگ شده‌اند، متمایز است. در این دستگاه موش‌های آزمایشگاهی هیچ گونه تمایلی به هیچ یک از محفظه‌ها نشان ندادند که غیر طرفدار بودن آزمایش‌ها را تایید می‌کند. این مدل در ۵ روز متوالی انجام می‌شود که شامل سه فاز مختلف است: پیش شرطی سازی، شرطی سازی و پس شرطی سازی. مرحله پیش شرطی سازی یک روز به طول می‌انجامد، حیوان در بخش میانی دستگاه ترجیح مکان شرطی قرار داده شده و با برداشتن دریچه گیوتینی به او اجازه داده می‌شود تا به مدت ۱۰ دقیقه آزادانه به جستجو در بخش های مختلف دستگاه بپردازد. مرحله شرطی سازی که شامل یک برنامه زمان بندی ۳ روزه است، در هر روز طی ۲ نوبت صورت می‌گیرد به این نحو که در روز اول حیوان در نوبت صبح یک دوز مشخص دارو را دریافت کرده و فوراً به مدت ۳۰ دقیقه در یکی از محفظه های دستگاه ترجیح مکان شرطی قرار داده می‌شود، به طوری که این محفظه از سایر محفظه های دیگر مجزا شده است. در نوبت بعدازظهر حیوان یک دوز مشخص سالین را دریافت کرده و در محفظه دیگری از دستگاه مکان شرطی به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده می‌شود. در روز دوم حیوان سالین را در نوبت صبح و دارو را در نوبت بعد از ظهر دریافت می‌کند و در روز سوم هم مانند روز اول عمل می‌شود. در پنجمین روز از برنامه زمان بندی (مرحله پس شرطی سازی) با برداشتن دریچه گیوتینی به حیوان اجازه داده می‌شود تا آزادانه مدت ۱۰ دقیقه به جستجو و ارزیابی در این سه محفظه بپردازد. در این مرحله، زمان سپری شده در هر قسمت توسط دوربین فیلمبرداری ضبط شده و توسط نرم افزار اتوویژن مورد آنالیز قرار گرفته می‌شود. به منظور محاسبهٔ نمره شرطی‌سازی به عنوان فاکتور ترجیح (تغییر ترجیح) مدت زمان سپری شده در محفظه دریافت دارو (مورفین) را از مدت زمان سپری شده در محفظه دریافت سالین کم می‌کنیم [۱۲، ۱۳، ۱۴]. جهت بررسی اثر دوزهای مختلف مورفین و یا سالین بر فعالیت حرکتی حیوان، مسافت کلی طی شده توسط حیوانات در ۱۰ دقیقه در روزه پیش شرطی سازی و روز تست بوسیله دوربین ضبط شده و توسط نرم افزار اتوویژن مورد آنالیز قرار گرفت.

در بخش مولکولی برای جداسازی نمونه‌های بافتی پس از شرطی سازی و تست نهایی در انتهای مرحله‌ی CPP بعد از یک بیهوشی عمیق (تزریق کتامین و زایلزین) بلافاصله سر حیوان را با استفاده از گیوتین جدا کرده و مغز را خارج می‌کنیم سپس با استفاده از Brain matrix ناحیه‌ی مورد نظر (هسته اکومبنس) را جدا کرده داخل یخ خشک گذاشته شده و در تانک نیتروژن مایع ۱۹۰- نگه داشته (به مدت ۲۴ ساعت) سپس به دمای ۸۰- انتقال می‌دهیم.

با توجه به اینکه هدف اصلی این تحقیق بررسی مولکولی

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱- دستگاه Brain matrix. مغز موش‌ها که به طور کامل از جمجمه خارج شده را به صورت قدامی- خلفی (به طوریکه سطح شکمی مغز به سمت بالا قرار گیرد) درون دستگاه Brain matrix قرار داده و با استفاده از تیغ، بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون در نواحی مشخص برش های دقیق در بخش‌های مورد نظر ایجاد کرده هسته اکومبنس را خارج می‌کنیم.

فاکتورهای آپپتوزی می باشد پس از تیمار موش‌ها با مورفین در پروتوکل CPP که در بالا اشاره شد مطابق زیر در روش وسترن بلاتینگ نمونه های بافتی بررسی خواهند شد. برای آماده سازی نمونه‌ها در روش وسترن بلاتینگ نمونه‌ی بافتی تهیه شده با استفاده از دستگاه هوموژنایزر همگن‌سازی شده و با استفاده از تست برادفورد از لحاظ غلظت همسان‌سازی می‌گردد.

هموژنایزر (Homogeniser): بافت جدا شده از حیوان (که در تانک ازت نگهداری شده است) را وزن کرده، سه تا چهار برابر وزن آن به آن بافر لیز کننده (Tris-HCL 50 mM ,NaCl 150mM, Triton x-100 0.1% , sodium deoxycholate 0.25% , SDS 0.1% , EDTA 1 mM , protease inhibitor cocktail 1%, phosphatase inhibitor) اضافه می‌شود سپس میکروتیوبول ها را در دستگاه هموژنایزر به مدت ۲ تا ۳ دقیقه با شیک ۳۰۰۰ هوموژن می‌شود. در درجه حرارت ۴ درجه به مدت ۴ تا ۵ دقیقه با دور ۳۵۰۰ تا۴۰۰۰ سانتریفوژ شده سپس سوپرناتانت را جدا کرده تا در مراحل بعدی از آن استفاده شود.

تست بردفورد (Bradford Test): آزمون برادفورد (تعیین غلظت پروتئین) یک آزمون رنگ سنجی بر مبنای تغییر جذب نوری رنگ Coomassie Brilliant Blue G-250 می باشد که تحت شرایط اسیدی است و در آن رنگ با چسبیدن به پروتئین از شکل قرمزتر به شکل آبی‌تر در می‌آید. برای سنجش مقدار غلظت پروتئین کل، با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) یک منحنی استاندارد با غلظت‌های 0, 15.626, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/ml

www.SID.ir

با رقیق کردن در آب مقطر رسم می‌گردد. پس از خواندن طول موج در دستگاه الیزاریدر جذب را با نرم افزار Gen5 اندازه گیری می‌کنیم.

الکتروفورز روی ژل (Electrophosis): با استفاده از پلی اکریل آمید به اضافه‌ی بیس اکریل آمید و TEMED ژل ساخته می‌شود.

آماده سازی نمونه‌ها: نمونه‌ها بعد از مخلوط شدن با سمپل بافر (۲-مرکاپتواتانول و گلیسرول و بروموفنل بلو) به مدت ۷-۵ دقیقه در دستگاه هات بلاد قرار داده می‌شوند. ۶۰ میکروگرم نمونه بافتی با سرنگ هامیلتون درون چاهک‌های ژل لود می‌شود. در این مرحله و با اعمال ولتاژ پروتئین‌ها بر اساس وزن مولکولی خود از هم جدا می‌شوند و در طول ژل پخش می‌شوند.

انتقال پروتئین به روی کاغذ (Blotting): پس از جداسازی پروتئین‌ها، با استفاده از روش الکتروبلاتینگ پروتئین‌ها از ژل به روی کاغذ PVDF منتقل می‌شوند و سپس با استفاده از یک محلول رقیق پروتئینی کار بلاکینگ صورت می‌گیرد.

آشکارسازی (Visualization): ابتدا آنتی بادی اولیه را به نسبت ۱:۱۰۰۰ و آنتی بادی ثانویه به نسبت ۱:۳۰۰۰ در محلول blocking تهیه شده و به خوبی ورتکس شد تا یکنواخت شود.

پس از انتقال پروتئین‌ها از ژل به کاغذ PVDF، کاغذ را به مدت ۷۵ دقیقه بر روی شیکر در محلول Blocking قرار داده و سپس آنتی بادی اولیه ضد پروتئین‌های (Bax، Bcl-2) poly (ADP-ribose polymerase-1) (PARP-1)، caspase-3 و β -actin (تهیه شده از شرکت Cell Signaling Technology) را به آن می‌افزاییم و overnight بر روی شیکر ۴ °C می‌گذاریم. سپس با استفاده از TBST کاغذ را شستشو داده و در مجاورت آنتی بادی ثانویه در شیکر قرار می‌دهیم. پس از ۷۵ دقیقه، کاغذ را با TBST شستشو می‌دهیم.

مرحله ظهور فیلم: برای شناسایی پروتئین ها از کیت ECL (EnhancedChemiLuminescence محصول شرکت GE Healthcare) استفاده می‌شود. از محلول A و B کیت به میزان مساوی برداشته و با هم مخلوط می‌کنیم و بر روی کاغذ PVDF که در سلفون قرار داده‌ایم می‌ریزیم. کاغذها را در کاست گذاشته و در تاریک خانه فیلم را بر روی کاغذ قرار می‌دهیم. پس از گذشتن زمان لازم (بسته به نوع آنتی بادی)، فیلم را با استفاده از محلول ظهور و ثبوت ظاهر کرده و باندها را روی آن شناسایی می‌کنیم. به منظور آنالیز و densitometry اسکن عکس‌های وسترن بلات از برنامه‌ی کامپیوتری Image J استفاده شد [۱۴].

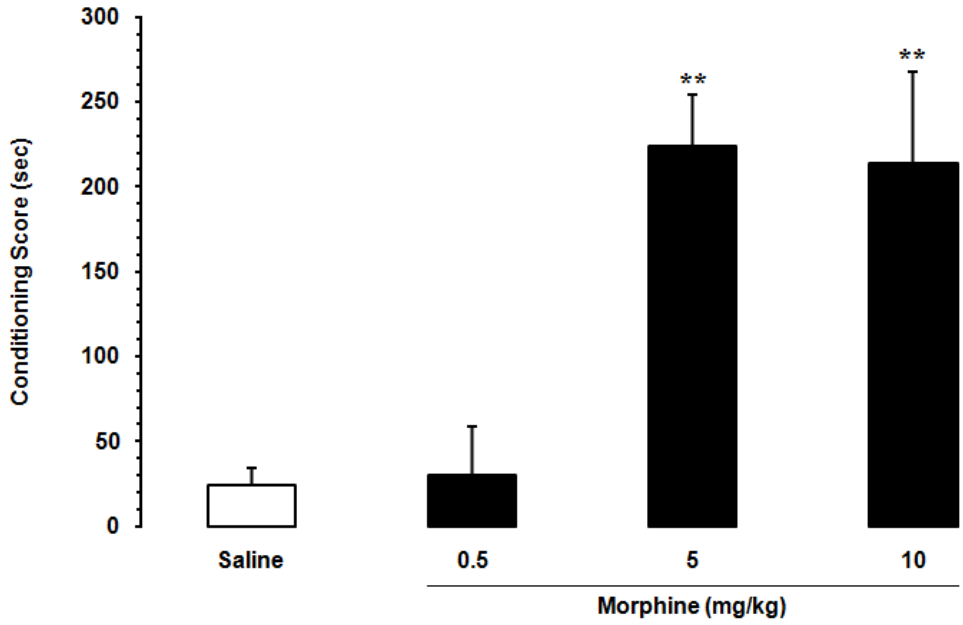
در بخش رفتاری جهت مقایسه نمره شرطی شدن (Conditioning Score) در گروه‌های مختلف از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و متعاقب آن تست آماری Dunnett برای مقایسه با گروه کنترل استفاده شد. علاوه بر آن در بخش مولکولی جهت اندازه گیری دانسیته باندهای پروتئینی در گروه‌های مختلف از نرم افزار Image J و برای مقایسه داده های آن از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) یکطرفه و متعاقب آن پس آزمون Kruskal-Wallis استفاده شد.

یافته ها

در بخش رفتاری حیوانات دست نخورده در طی سه روز شرطی سازی با دوز های متفاوت مورفین (۰/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت درون صفاقی تحت تیمار قرار گرفتند. نتایج حاصل از آنالیز واریانس یکطرفه نشان داد که مورفین می‌تواند در دوزهای ۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم سبب ترجیح مکان شرطی در حیوانات گردد. پس آزمون Dunnett ($P<0.01$) در دوزهای ۵ و۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل نشان داد (شکل ۲). آزمون آنالیز واریانس یکطرفه تفاوت معنی داری را در فعالیت حرکتی حیوانات نشان نداد.

در بخش مولکولی، جهت بررسی تغییر میزان نسبت Bax/Bcl-2 در هسته‌ی اکومبنس در مدل ترجیح مکان شرطی القا شده توسط مورفین، میزان فاکتور پرو آپوپتوزی Bax و فاکتور آنتی‌آپوپتوزی Bcl-2 را با روش وسترن بلات در دوزهای مختلف مورفین (۰/۵، ۵، ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) اندازه گیری کردیم. چنانچه در شکل ۳ نشان داده شده است، در هسته‌ی اکومبنس موش‌هایی که مورفین با دوز

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲- اثر دوزهای متفاوت مورفین در ترجیح مکان شرطی. نمره شرطی سازی مورفین در سه دوز ۰/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر هر کیلوگرم نشان داده شده است. همانطور که دیده می‌شود، دوز ۵ میلی گرم بر هرکیلوگرم بهترین دوز مورفین در مدل ترجیح مکان شرطی است. ** P<0.01 نشان دهنده اختلاف نسبت به گروه سالین

۰/۵ دریافت کردند نسبت Bax/Bcl-2 در مقایسه با گروه کنترل که سالین دریافت کردند، ۴/۰۱ برابر افزایش پیدا کرده است. آزمون Newman-Keuls پس از آنالیز واریانس یکطرفه داده‌ها نشان داد نسبت Bax/Bcl-2 در هسته‌ی اکومبنس موش‌هایی که مورفین با دوز ۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کردند (P<0.01) و در گروه‌هایی که مورفین با دوز ۵ و۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کردند (P<0.05) نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری پیدا کرده است. لذا بیشترین افزایش نسبت Bax/Bcl-2 در دوز ۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم دیده شد.

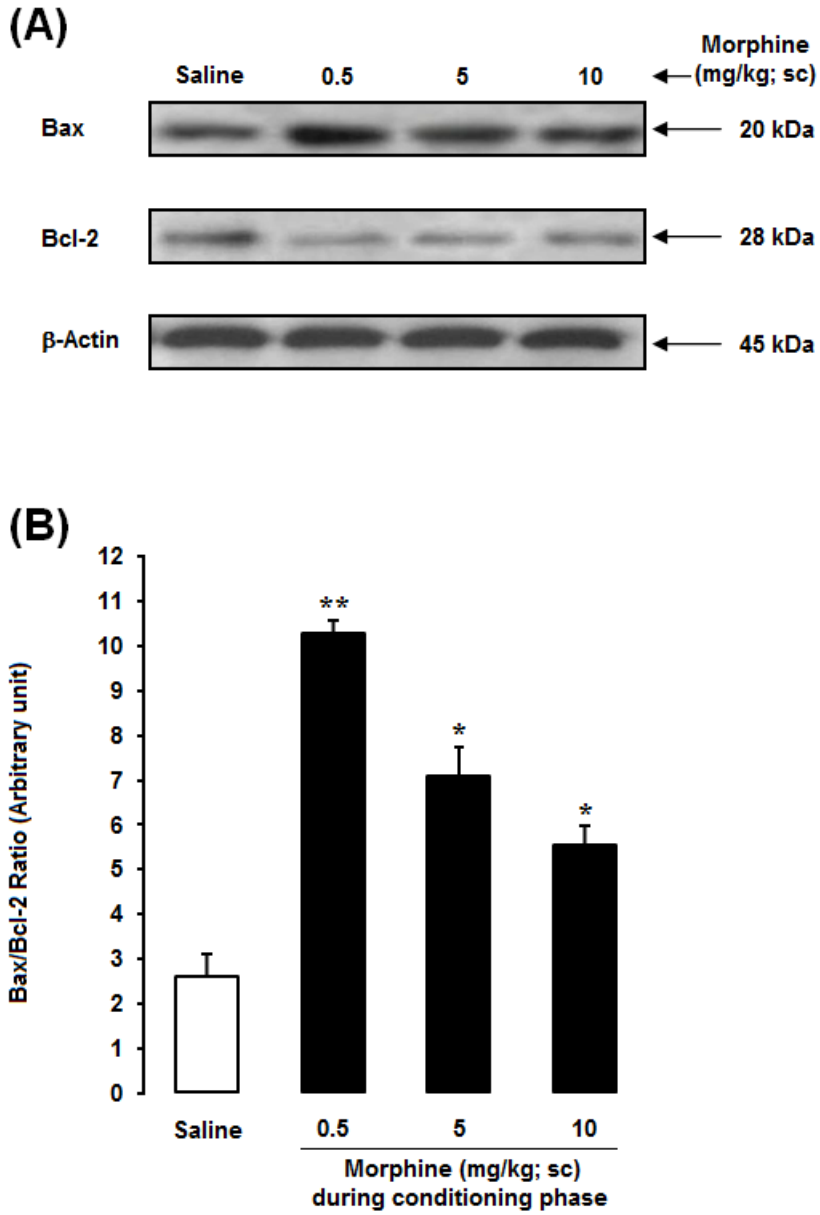
جهت بررسی میزان فعال سازی caspase-3 در هسته‌ی اکومبنس در مدل ترجیح مکان شرطی القا شده توسط مورفین (۰/۵، ۵ و۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، در روش وسترن بلات مقدار کاسپاز فعال اندازه گیری شد. آنالیز واریانس یکطرفه همراه با پس آزمون Newman-Keuls در این بخش از مطالعه نشان داد که بیشترین افزایش در فعال شدن کاسپاز ۳ (۱۶/۴ برابر) نسبت به گروه کنترل در دوز ۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم دیده می‌شود، این افزایش در دوزهای ۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم به طور وابسته به دوز کاهش می‌یابد (شکل ۴).

همانطور که در شکل ۵ دیده می‌شود افزایش میزان قطعات ۲۴ و ۸۹ کیلو دالتونی در موش‌های تحت تیمار مورفین ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه های ۵ و۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر افزایش فعال سازی کاسپاز ۳ به عنوان پروتئاز اصلی دلالت دارد. آزمون Kruskal-Wallis پس از آنالیز واریانس یکطرفه داده‌ها نشان داد میزان فاکتور PARP در هسته‌ی اکومبنس موش‌هایی که مورفین با دوز ۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کردند (P<0.01) و در گروه‌هایی که مورفین با دوز ۵ و۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کردند (P<0.05) نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری پیدا کرده است.

بحث

یافته های حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که مورفین می‌تواند مقدار فاکتورهای آپوپتوزی را افزایش دهد و چنانچه در نتایج دیده شد، بیشترین افزایش فاکتورهای آپوپتوزی (Bax/Bcl-2, caspase-3 و PARP) در هسته‌ی اکومبنس در دوز ۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم می باشد در حالی که خواص پاداشی مورفین در مدل رفتاری در این دوز دیده نشد. در کار تحقیقی Boronat و همکاران در سال ۲۰۰۱ نیز نشان داده شده است که تزریق طولانی مدت مورفین به

Archive of SID
www.SID.ir

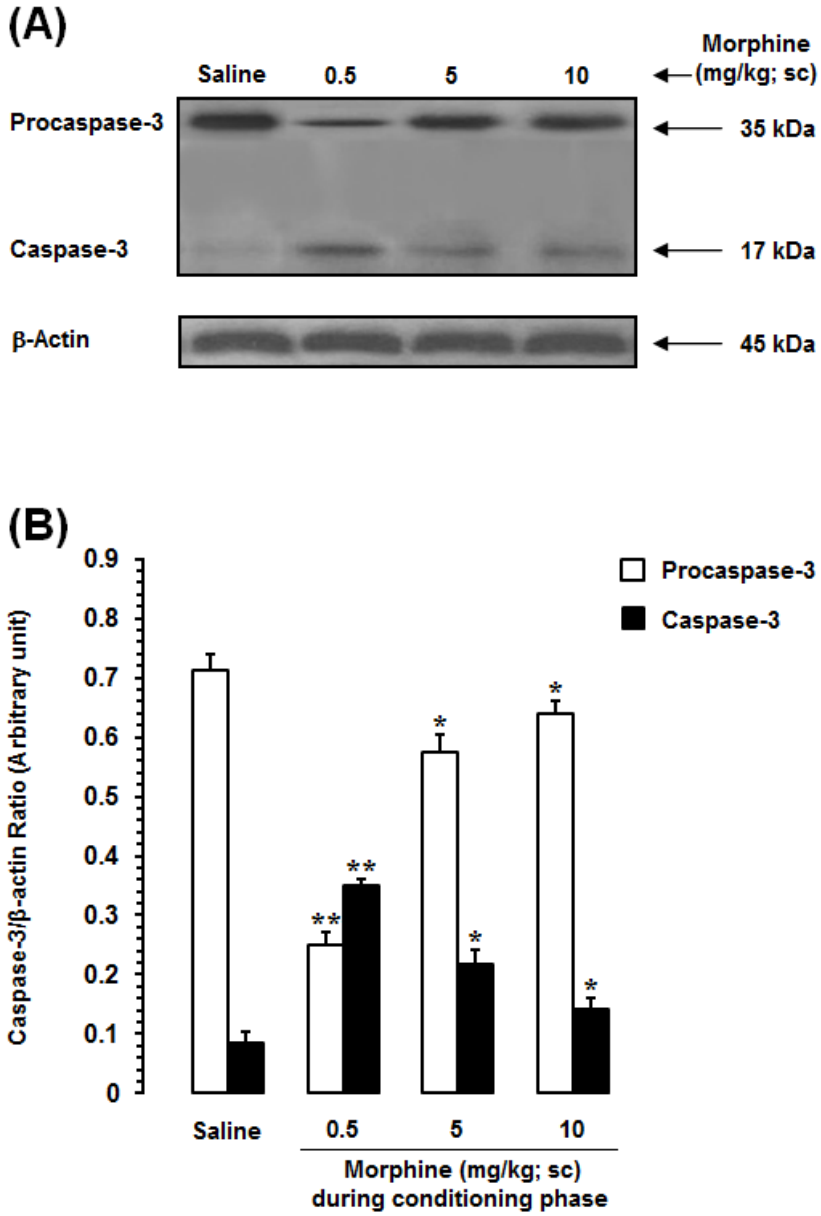


شکل ۳- اثر مورفین بر تغییر نسبت Bax/Bcl-2 در سلول‌های هسته اکومبنس. (A) ۶۰ µg از پروتئین هسته‌های اکومبنس مغز موش‌های تحت تیمار مورفین با دوزهای ۰/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روش وسترن بلات بر روی SDS-PAGE جدا شده و در معرض آنتی بادی‌های ضد Bax، ضد Bcl-2 و ضد β-actin قرار گرفته‌اند (۳ بار تکرار مستقل از هم، هر بار ۳ بار آزمایش). همانطور که دیده می‌شود، میزان نسبت فاکتور پروآپوپتوزی Bax به فاکتور آنتی آپوپتوزی Bcl-2 در همه گروه های تحت تیمار مورفین نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است و بیشترین افزایش در گروهی است که مورفین با دوز ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کرده‌اند. (B) دانسیته باندها اندازه گیری شده و نسبت به باند β-actin (به عنوان کنترل داخلی) مربوطه محاسبه گردیده است. * $P<0.05$ و ** $P<0.01$ تفاوت نسبت به گروه کنترل سالین

موش‌های آزمایشگاهی می‌تواند مقدار پروتئین آنتی‌آپوپتوزی Bcl-2 و گیرنده‌ی Fas به عنوان پروتئین پروآپوپتوزی را به طور معنی‌داری افزایش دهد در حالی که این افزایش در گروه-های تزریق کوتاه مدت مورفین دیده نمی‌شود [۷]. در کار تحقیقی Boronat و همکاران مقدار گیرنده‌ی پروآپوپتوزی Fas و پروتئین آنتی‌آپوپتوزی Bcl-2 برای بررسی آپوپتوز تحت تأثیر تزریق طولانی مدت و کوتاه مدت مورفین ارزیابی شد. ولی در مطالعه‌ی حاضر مقدار نسبت Bax/Bcl-2 بررسی شد که این نسبت به عنوان ایندکس فرآیند آپوپتوز مطرح شده و تعیین کننده مسیر مرگ سلول به سمت آپوپتوز بعد از مواجهه با عوامل سیتوتوکسیک است [۱].

پروتئین Bax در وضعیت نرمال سلول به فرم مونومر در سیتوزول یا متصل به غشاها می‌باشد. اما Bcl-2 اساساً در داخل غشاء میتوکندری قرار داشته و با پروتئین Bax

www.SID.ir

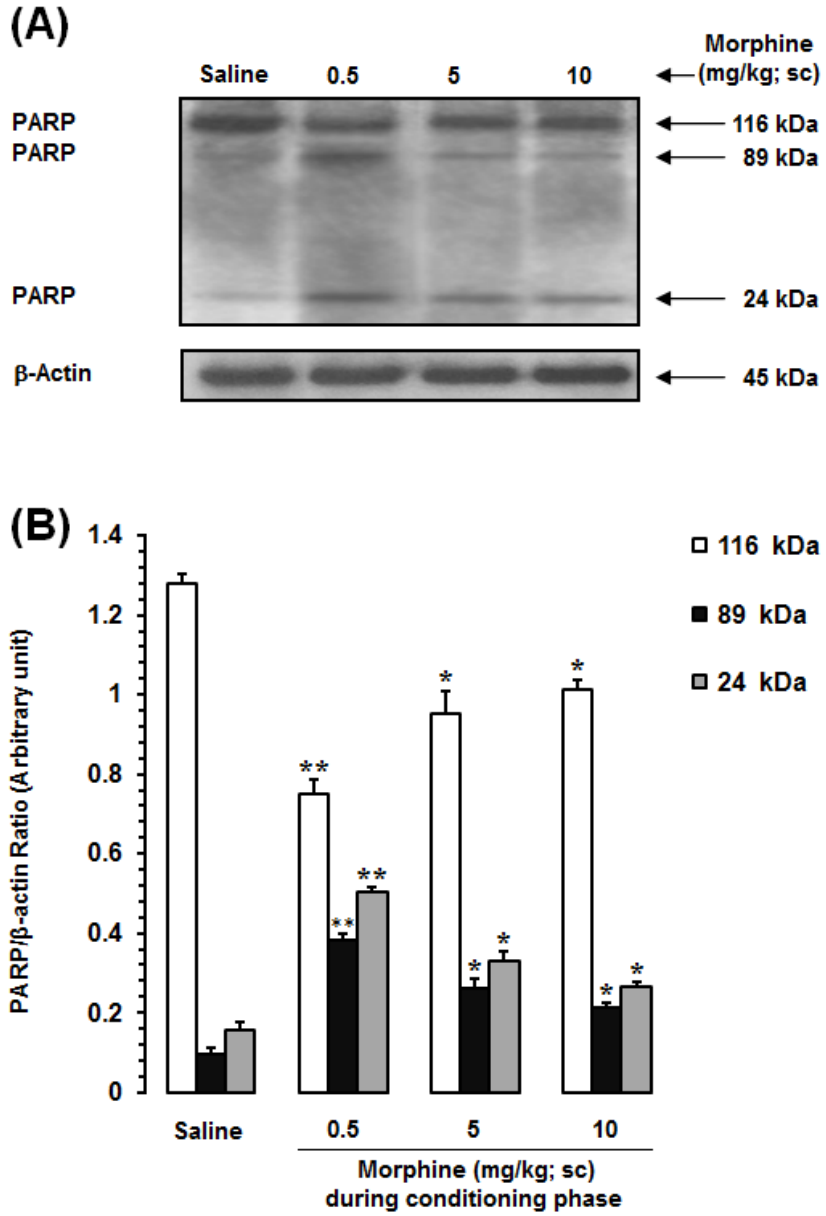


شکل ٤- اثر مورفین بر تغییرات میزان caspase-3 فعال در سلول‌های هسته اکومبنس. (A) ۶۰ µg از پروتئین هسته‌های اکومبنس مغز موش‌های تحت تیمار مورفین با دوزهای ۰/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم در روش وسترن بلات بر روی SDS-PAGE جدا شده و در معرض آنتی بادی‌های ضد caspase-3 و ضد β-actin قرار گرفته‌اند (۳ بار تکرار مستقل از هم، هر بار ۳ بار آزمایش). همانطور که دیده می‌شود، میزان نسبت فاکتور caspase-3 فعال به caspase-3 غیر فعال (procaspase-3) در همه گروه های تحت تیمار مورفین نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است و بیشترین افزایش در گروهی است که مورفین با دوز ۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کرده‌اند. (B) دانسیته باندها اندازه گیری شده و نسبت به باند β-actin مربوطه محاسبه گردیده است. *P<0.05 و ** P<0.01 تفاوت نسبت به گروه کنترل سالین.

هترودایمر تشکیل می‌دهد [۸]. این هترودایمر منجر به خنثی شدن متقابل اثرات پروآپوپتوتیک و آنتی‌آپوپتوتیک این دو پروتئین می‌شود. تعادل بین میزان بیان Bax و Bcl-2 از طریق تنظیم یکپارچگی غشاء خارجی میتوکندری، در فعال کردن مسیر میتوکندریایی آپوپتوز دخیل است [۳، ۲۱]. بنابراین افزایش نسبت Bax/Bcl-2 که در این مطالعه مشاهده شده، می‌تواند تا اندازه‌ای بیانگر فعال شدن مسیر میتوکندریای آپوپتوز در سلول‌های هسته‌ی اکومبنس موش‌های تحت تیمار مورفین باشد.

در گذشته مطالعاتی، توانایی مورفین و DAMGO (آگونیست اختصاصی گیرنده‌ی µ) را در القا آپوپتوز در لنفوسیت های T از طریق کاهش در بیان پروتئین آنتی-آپوپتوزی Bcl-2 و افزایش در بیان پروتئین پروآپوپتوزی Bax نشان داده‌اند [۲۱]. همچنین ارائه‌ی آگونیست گیرنده‌های µ و

www.SID.ir



شکل ۵- اثر مورفین بر تغییر میزان بخش‌های ۸۹ و۲۴ کیلو دالتونی فاکتور PARP-1 در هسته اکومبنس. (A) ۶۰µg از پروتئین هسته‌های اکومبنس مغز موش‌های تحت تیمار مورفین با دوزهای ۰/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم در روش وسترن بلات بر روی SDS-PAGE جدا شده و در معرض آنتی بادی‌های ضد PARP-1 و ضد β-actin قرار گرفته‌اند (۳ بار تکرار مستقل از هم، هر بار ۳ بار آزمایش). همانطور که دیده می‌شود، میزان فاکتور PARP-1 شکسته شده به قطعات ۸۹ و ۲۴ کیلودالتونی در همه گروه های تحت تیمار مورفین نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است و بیشترین افزایش در گروهی است که مورفین با دوز ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کرده‌اند. (B) دانسیته باندها اندازه گیری شده و نسبت به باند β-actin مربوطه محاسبه گردیده است. * $P<0.05$ و ** $P<0.01$ تفاوت نسبت به گروه کنترل سالین

K به محیط کشت سلول‌های جنین جوجه [۱۰] و سل لاین‌های اختصاصی [۱۰، ۱۹، ۲۳]. آسیب‌پذیری آنها را به مکانیسم‌های آپوپتوز افزایش می‌دهد. مقاومت به مورفین و فرایند آپوپتوز از طریق یک مکانیسم سلولی مشترک ایجاد می‌شوند که گیرنده‌ی NMDA در آن نقش دارد و مقدار فاکتورهای آپوپتوزی Bax و caspase-3 و آنتی آپوپتوزی Bcl-2 در پاسخ به فعال شدن گیرنده‌ی NMDA تغییر می‌کند [۱۵]. درحالی‌که تحقیقات دیگر نشان داده‌اند داروهای اپیوئیدی از طریق گیرنده‌ی δ با فعال کردن مسیر سیگنالینگ ERK1/2 باعث مهار FADD و راه اندازی سیگنال‌های حیاتی در سلول می‌شوند. این در حالی است که در موش‌هایی که فاقد گیرنده‌ی δ هستند چنین مهاری دیده نمی‌شود [۹]. از آنجایی که گیرنده‌های اپیوئیدی دارای تمایل متفاوتی نسبت به لیگاندهای اپیوئیدی خود هستند و با توجه به نتایج این

www.SID.ir

تحقیق که بیشترین افزایش فاکتورهای آپوپتوزی در کمترین دوز مورفین بوده است می‌توان چنین استنباط کرد، در دوز ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ابتدا گیرنده‌ی μ که بیشترین تمایل به مورفین را دارد از طریق دخالت در مسیرهای مولکولی آپوپتوزی مقدار فاکتورهای آپوپتوزی را افزایش می‌دهد در حالی که در دوزهای بالاتر ۵ و۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گیرنده‌های دیگری مثل δ و κ وارد عمل شده و مسیرهای مولکولی حیاتی را در سلول راه‌اندازی می‌کنند و در نتیجه مقدار فاکتورهای آپوپتوزی کاهش می‌یابد. به عنوان پیشنهاد در ارتباط با یافته های این تحقیق، بررسی نوع گیرنده و تعداد گیرنده های اپیوئیدی در نواحی درگیر در مدار پاداش جهت دستیابی به اطلاعات دقیق‌تر درباره تغییر در فاکتورهای آپوپتوزی در این نواحی در مطالعات بعدی لازم به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از اعتبارات مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (۸۲۱/ع/الف) به انجام رسید که بدینوسیله از حمایت های مادی و معنوی آن مرکز سپاسگزاری می‌شود.

References

[1] Adams JM, Cory S, Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. ***Curr Opin Immunol*** 19 (2007) 488-96.

[2] Ammon-Treiber S, Hollt V, Morphine-induced changes of gene expression in the brain. ***Addict Biol*** 10 (2005) 81-9.

[3] Armstrong JS, The role of the mitochondrial permeability transition in cell\death. ***Mitochondrion*** 6 (2006) 225-34.

[4] Azizi P, Haghparast A, Hassanpour-Ezatti M, Effects of CB1 receptor antagonist within the nucleus accumbens on the acquisition and expression of morphine-induced conditioned place preference in morphine-sensitized rats. ***Behav Brain Res*** 197 (2009) 119-24.

[5] Bardo MT, Neuropharmacological mechanisms of drug reward: beyond dopamine in the nucleus accumbens. ***Crit Rev Neurobiol*** 12 (1998) 37-67.

[6] Boronat MA, Garcia-Fuster MJ, Garcia-Selvia JA, Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in rat brain. ***Br J Pharmacol*** 134 (2001) 1263-70.

[7] Boronat MA, Garcia-Fuster MJ, Garcia-Sevilla JA, Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in rat brain. ***Br J Pharmacol*** 134 (2001) 1263-70.

[8] Elmore S, Apoptosis: a review of programmed cell death. ***Toxicol Pathol*** 35 (2007) 495-516.

[9] Garcia-Fuster MJ, Miralles A, Garcia-Sevilla JA, Effects of opiate drugs on Fas-associated protein with death domain (FADD) and effector caspases in the rat brain: regulation by the ERK1/2 MAP kinase pathway. ***Neuropsychopharmacology*** 32 (2007) 399-411.

[10] Goswami R, Dawson SA, Dawson G, Cyclic AMP protects against staurosporine and wortmannin-induced apoptosis and opioid-enhanced apoptosis in both embryonic and immortalized (F-11kappa7) neurons. ***J Neurochem*** 70 (1998) 1376-82.

[11] Greeneltch KM, Kelly-Welch AE, Shi Y, Keegan AD, Chronic morphine treatment promotes specific Th2 cytokine production by murine T cells in vitro via a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. ***J Immunol*** 175 (2005) 4999-5005.

[12] Haghparast A, Azizi P, Hassanpour-Ezatti M, Khorrami H, Naderi N, Sub-chronic administration of AM251, CB1 receptor antagonist, within the nucleus accumbens induced sensitization to morphine in the rat. ***Neurosci Lett*** 467 (2009) 43-7.

[13] Haghparast A, Ghalandari-Shamami M, Hassanpour-Ezatti M, Blockade of D1/D2 dopamine receptors within the nucleus accumbens attenuated theantinociceptive effect of cannabinoid receptor agonist in the basolateral amygdala. ***Brain Res*** 1471 (2012) 23-32.

[14] Haghparast A, Taslimi Z, Ramin M, Azizi P,

Archive of SID
www.SID.ir

Khodagholi F, Hassanpour-Ezatti M, Changes in phosphorylation of CREB, ERK, and c-fos induction in rat ventral tegmental area, hippocampus and prefrontal cortex after conditioned place preference induced by chemical stimulation of lateral hypothalamus. ***Behav Brain Res*** 220 (2011) 112-8.

[15] Mao J, Sung B, Ji RR, Lim G, Neuronal apoptosis associated with morphine tolerance: evidence for an opioid-induced neurotoxic mechanism. ***J Neurosci*** 22 (2002) 7650-61.

[16] Nestler EJ, Molecular mechanisms of drug addiction. ***Neuropharmacology*** 47 (2004) 24-32.

[17] Salamone JD, Correa M, Mingote SM, Weber SM, Beyond the reward hypothesis: alternative functions of nucleus accumbens dopamine. ***Curr Opin Pharmacol*** 5 (2005) 34-41.

[18] Singhal PC, Kapasi AA, Reddy K, Franki N, Gibbons N, Ding. Morphine promotes apoptosis in Jurkat cells. ***J Leukoc Biol*** 66 (1999) 650-8.

[19] Singhal PC, Sharma P, Kapasi AA, Reddy K, Franki N, Gibbons N. Morphine enhances macrophage apoptosis. ***J Immunol*** 160 (1998) 1886-93.

[20] Taslimi Z, Arezoomandan R, Omranifard A, Ghalandari-Shamami M, Riahi E, Vafaei A A, Rashidy-Pour A, Haghparast A, Orexin A in the ventral tegmental area induces conditioned place preference in a dose-dependent manner: Involvement of D1/D2 receptors in the nucleus accumbens. ***Peptides*** 37 (2012) 225-32.

[21] Tsujimoto Y, Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. ***J Cell Physiol*** 195 (2003) 158-67.

[22] Williams JT, Christie MJ, Manzoni O, Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. ***Physiol Rev*** 81 (2001) 299-343.

[23] Yin DL, Ren XH, Zheng ZL, PU L, Jiang LZ, MA, PEI G. Etorphine inhibits cell growth and induces apoptosis in SK-N-SH cells: involvement of pertussis toxin-sensitive G proteins. ***Neurosci Res*** 29 (1997) 121-7.

[24] Zhang Y, QCaL-CY, ***Morphine: A Protective or Destructive Role in Neurons?*** Sage, 2008, chapter 1, 10-15.

Archive of SID

www.SID.ir