

Effects of different concentrations of morphine on staurosporine-induced neurite outgrowth in PC12 cells

Zhaleh H., M.Sc., Azadbakht M*, Ph. D., Bidmeshki Pour A., Ph. D., Haramshahi S.M.A., M.Sc., Kehtari M., M.Sc.

**P.O.Box: 6714967346, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran*

Received: Nov 2011

Accepted: Jan 2012

Abstract

Purpose: The present study was conducted to evaluate the effect of different concentrations of morphine on staurosporine-induced neurite outgrowth in PC12 cells.

Materials and Methods: PC12 cells were cultured in RPMI1640 culture medium supplemented with 0.2% BSA. Cells were divided into three groups; I, II and III, culture in the presence of 50, 100 and 214 nM staurosporine respectively. In each group cells were treated with different concentrations (10⁻¹², 10⁻¹⁰, 10⁻⁸, 10⁻⁶, 10⁻⁴ and 0.0 M) of morphine; treatments 1, 2, 3, 4, 5 and 6; respectively. The percentage of cytotoxicity was performed by lactate dehydrogenase assay. The percentage of death cell was assessed by Hoechst/PI differential staining. Total neurite length was measured.

Results: In all groups, the percentage of cytotoxicity as well as the percentage of cell death in treatments 4 and 5 was higher and in treatments 1 and 2 was lower than that of treatment 6 ($p < 0.05$). In group III, total neurite length in treatments 1 and 2 was higher than that of treatment 6 and in group I, total neurite length in treatments 4 and 5 was lower than treatment 6 ($p < 0.05$). Opioid receptor antagonist (naltrexone) was caused reversed the effects of morphine ($p < 0.05$).

Conclusion: Our results suggest that morphine at low concentrations should improve staurosporine-induced neurite outgrowth in PC12 cells.

Key words: Morphine, Staurosporine, Neurite Outgrowth, PC12

اثر غلظت‌های مختلف مورفین بر فرا رشد نوریتی القا شده توسط

استوروسپورین در سلول‌های PC12

حسین ژاله *M.Sc.، مه‌ری آزادبخت Ph.D.*، علی بیدمشکی‌پور Ph.D.*، سید محمدامین حرشاهی M.Sc.*، موسی کهتری M.Sc.*

*گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: آذر ماه ۹۰ تاریخ پذیرش: بهمن ماه ۹۰

چکیده

هدف: اثر غلظت‌های مختلف مورفین بر فرا رشد نوریتی القا شده توسط استوروسپورین در سلول‌های PC12 بررسی شد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های PC12 در محیط کشت RPMI1640 همراه با ۰/۲ درصد BSA کشت داده شدند. سلول‌ها به سه گروه I, II و III کشت در حضور غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۱۴ نانومولار استوروسپورین تقسیم شدند. در هر گروه سلول‌ها در تیمارهای مختلف با غلظت‌های (تیمار ۱: 10^{-12} ، تیمار ۲: 10^{-10} ، تیمار ۳: 10^{-8} ، تیمار ۴: 10^{-6} ، تیمار ۵: 10^{-4} و تیمار ۶: ۰) مولار مورفین تیمار شدند. میزان سیتوتوکسیسیته از طریق اندازه‌گیری لاکتات دهیدروژناز، میزان مرگ سلول‌ها از طریق رنگ‌آمیزی افتراقی Hoechst/PI و متوسط طول نوریت‌ها با استفاده از اندازه‌گیری طول کل نوریت‌ها در سلول‌ها بررسی شد.

یافته‌ها: ارزیابی میزان سیتوتوکسیسیته و مرگ سلولی در هر سه گروه نشان داد که میزان سیتوتوکسیسیته و مرگ سلولی سلول‌ها در تیمارهای ۴ و ۵ در مقایسه با تیمار ۶ بیشتر و در تیمارهای ۱ و ۲ در مقایسه با تیمار ۶ کمتر بود ($p < 0.05$). نتایج اندازه‌گیری متوسط طول بلندترین نوریت‌ها نشان داد که متوسط طول بلندترین نوریت‌ها در تیمارهای ۱ و ۲ گروه III و متوسط طول کوتاهترین نوریت‌ها در تیمارهای ۴ و ۵ گروه I وجود دارد ($p < 0.05$). مطالعه مهارکننده رسپتورهای اپیویدی نشان داد که نالتروکسان منجر به برگشت آثار مورفین می‌شود ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج بررسی حاضر پیشنهاد می‌کند که مورفین در دوزهای پایین منجر به بهبود فرا رشد نوریتی القا شده برگشت پذیر و کوتاه اثر توسط استوروسپورین در سلول‌های PC12 می‌شود.

کلید واژه‌ها: مورفین، استوروسپورین، فرارشد نوریتی، PC12

مقدمه

که استوروسپورین باعث القای مرگ سلولی برنامه ریزی شده (Apoptosis) در انواع سلول‌ها از جمله سلول‌های عصبی می‌شود [۱]. علاوه بر این نشان داده شده است که تیمار

استوروسپورین یک آلكالوئید است که از محیط کشت *Streptomyces staurosporesa* جداسازی می‌شود و مهارکننده قوی پروتئین کیناز C محسوب می‌شود. نشان داده شده است

آدرس مکاتبه: کرمانشاه، خیابان باغ ابریشم، دانشگاه رازی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، کد پستی: ۶۷۱۴۹۶۷۳۴۶

Email: azadbakht_m_tmu@yahoo.com

این ماده بر تمایز عصبی القا شده توسط استوروسپورین در سلول‌های PC12 بررسی شد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های PC12

سلول‌های PC12 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط کشت RPMI1640 همراه با ۰/۲ درصد BSA (Nonessential Amino Acids) ۱ درصد درون فلاسک T-25 (NUNC) کشت داده شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت محیط کشت سلول‌ها با محیط کشت تازه تعویض شد. هنگامی که تراکم سلول‌های چسبیده به کف فلاسک به ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید، پاساژ سلول‌ها با استفاده از محلول ۰/۲۵ درصد Trypsin-EDTA انجام شد.

تمایز سلول‌های PC12

سلول‌ها با تراکم 10^4 سلول در میلی‌لیتر در محیط کشت RPMI حاوی ۰/۲ درصد BSA و در ظروف کشت ۲۴ خانه به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد نگهداری شدند. سلول‌ها به دو دسته تقسیم شدند: در دسته اول سلول‌ها با مهارکننده نالتروکسان پیش تیمار نشدند و در دسته دوم سلول با مهارکننده نالتروکسان به مدت ۳۰ دقیقه پیش تیمار شدند. در هر دسته سلول‌ها به سه گروه تقسیم شدند. در هر گروه سلول‌ها در حضور غلظت خاصی از استوروسپورین شامل گروه I: ۵۰ نانومولار، گروه II: ۱۰۰ نانومولار و گروه III: ۲۱۴ نانومولار تیمار شدند. در هر گروه نیز سلول‌ها در تیمارهای مختلف با غلظت‌های مشخص مورفین شامل تیمار: 10^{-12} ، تیمار: 10^{-10} ، تیمار: 10^{-8} ، تیمار: 10^{-6} ، تیمار: 10^{-4} امولار مورفین و تیمار: بدون مورفین تیمار شدند. سلول‌ها در بازه‌های

سلول‌های RGC-5 با آنالوگ‌های استوروسپورین سبب بروز ظاهر نورونی در این سلول‌ها می‌شود [۲]. استوروسپورین وابسته به غلظت به کار برده شده آن دارای عملکردهای چندگانه است و رفتاری وابسته به غلظت دارد. غلظت‌های ۵۰ تا ۳۵۰ نانومولار آن سبب تمایز رده‌های سلولی در حال تقسیم به نورون‌های بالغ و غلظت ۱۰۰۰ نانومولار آن سبب ایجاد آپوپتوز در نورون‌ها می‌شود [۳] استوروسپورین در مقایسه با فاکتور رشد عصب (Nerve Growth Factor; NGF) بسیار سریع‌تر سبب تمایز سلول‌های عصبی و ایجاد نوریت‌های بلند در آنها می‌شود [۴]. با توجه به آثار دوگانه استوروسپورین در ایجاد تمایز یا آپوپتوز در سلول‌ها در استفاده از این ماده باید به دوز دقیق به کار رفته توجه داشت و از طرفی برای حذف آثار آپوپتوتیک آن احتمالاً می‌توان از موادی که آثار ضد آپوپتوزی دارد استفاده کرد.

مورفین از جمله مواد مؤثر بر تمایز عصبی است. مورفین علاوه بر آثار ضد درد شناخته شده، در تکوین مغز، نوروزن، تمایز سلولی و آپوپتوز نیز اثرگذار است [۴]. مورفین وابسته به غلظت به کار رفته دارای آثار مختلفی است. غلظت‌های بسیار پایین مورفین (IpM) فرا رشد نوریت‌ها را در سلول‌های PC12 در حضور فاکتور رشد عصبی (NGF) افزایش می‌دهد [۵]. مورفین در غلظت‌های بالا (1mM) افزایش طول نوریت‌ها را در سلول‌های PC12، نورون‌های هیپوکمپ، نورون‌های گرانول مخی و نورون‌های گانگلیون موجود در طناب پشتی جنینی مهار می‌کند [۶-۹].

از آنجا که تمایز القا شده توسط استوروسپورین پدیده‌ای قابل برگشت است و نیز با علم به اینکه این ماده بر سلول‌ها اثر آپوپتوتیک دارد [۱۰]، می‌توان از خواص حفاظتی مورفین برای بهبود تمایز عصبی القا شده توسط استوروسپورین استفاده کرد. با توجه به آثار وابسته به غلظت مورفین به کار رفته در تمایز سلول‌های عصبی، در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف

محیط کشت سلول‌ها برداشته شده و با محلول PBS شستشوداده شدند. سپس سلول‌ها با محلول‌های تیماری و به صورت سه تایی به مدت ۲۴ ساعت مورد تیمار قرار گرفتند. پس از گذشت ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تیمار برای تعیین میزان تأثیر مواد بر میزان مرگ سلول‌ها، ابتدا سلول‌ها با PBS شسته شده و در مرحله اول به مدت ۳۰ دقیقه در محیط کشت حاوی بیس بنزآمید (۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) قرار گرفتند. پس از نفوذ رنگ به داخل هسته سلول‌ها و اتصال با DNA، هسته سلول‌ها به رنگ آبی در آمد. سلول‌ها در PBS شستشو داده شدند. سپس سلول‌ها در مرحله دوم به مدت پنج دقیقه در محیط کشت حاوی پروپیدیوم یدید (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) قرار گرفتند. پس از این مرحله سلول‌ها توسط پارافرمالدهید ۰/۴ درصد به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق تثبیت شدند. در این حالت سلول‌های نکروتیک به رنگ صورتی تیره و دارای ظاهر هسته‌ای غیر متراکم اما سلول‌های آپوپتوتیک دارای ظاهر صورتی روشن و هسته‌های متراکم و قطعه قطعه هستند. آزمایش سه بار تکرار شد.

ارزیابی میزان نوریت‌زایی

یکی از بهترین مشخصه‌ها برای ارزیابی مورفولوژیکی سلول‌ها و میزان نوریت‌زایی نوروها اندازه‌گیری طول تمام نوریت‌های یک نرون (TNL: Total Neurite Length) با استفاده از شمارش Intersection‌ها است [۱۱]. بر اساس این روش طول بلندترین نوریت‌ها از جسم سلولی تا مخروط رشد در یک پس زمینه تعریف شده با خطوطی با فاصله‌های مشخص و شمارش تعداد نقاطی که نوریت خطوط افقی را قطع می‌کند اندازه‌گیری شد. سپس مجموع طول نوریت‌های یک نرون تعیین شد. برای هر تیمار طول نوریت‌ها در ۱۰۰ سلول پس از عکس‌برداری از نقاط تصادفی توسط میکروسکوپ معکوس مجهز به دوربین اندازه‌گیری شد. آزمایش سه بار تکرار شد.

زمانی ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت از لحاظ میزان سیتوتوکسیسیتی، مرگ سلولی و میزان نوریت‌زایی بررسی شدند. سلول‌های تیمار ۶ در هر گروه به عنوان سلول‌های کنترل در نظر گرفته شدند.

ارزیابی میزان سیتوتوکسیسیتی سلول‌ها

سنجش سیتوتوکسیسیتی با استفاده از لاکتات دهیدروژناز (LDH) روشی سریع و ساده است که برای سنجش کمی سیتوتوکسیسیتی براساس اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز آزاد شده از سلول‌های آسیب دیده مورد استفاده قرار می‌گیرد. سلول‌ها با تراکم 10^4 سلول در میلی‌لیتر در چاهک‌های ظرف کشت ۹۶ خانه در محیط کشت RPMI حاوی ۰/۲ درصد BSA کشت داده شدند. پس از آنکه سلول‌ها به تراکم مناسب رسیدند، محیط کشت سلول‌ها برداشته شده و سلول‌ها با محلول PBS شستشو داده شدند. سپس سلول‌ها در هر گروه با محلول‌های تیماری و به صورت سه تایی به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. برای تعیین میزان سیتوتوکسیسیتی سلول‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط رویی سلول‌ها با استفاده از سمپلر به یک ظرف کشت ۹۶ خانه جدید منتقل شد. برای آماده‌سازی مخلوط واکنش به تعداد ۱۰۰ آزمون، ۲۵۰ میکرولیتر از محلول کاتالیست با ۱۱/۲۵ میلی‌لیتر محلول رنگ مخلوط شد. ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و به دور از نور انکوبه شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۹۰ تا ۵۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA reader خوانده شد. طول موج ۶۰۰ نانومتر به عنوان رفرنس انتخاب و آزمایش سه بار تکرار شد.

ارزیابی میزان مرگ سلولی

بررسی مرگ سلولی در سلول‌ها با استفاده از رنگ‌های فلئورسینس به روش افتراقی انجام شد [۹]. سلول‌ها با تراکم 2×10^5 سلول در میلی‌لیتر در چاهک‌های ظرف کشت ۲۴ خانه در محیط کشت RPMI حاوی ۰/۲ درصد BSA کشت داده شدند. پس از آنکه سلول‌ها به تراکم مناسب رسیدند،

روش‌های آماری

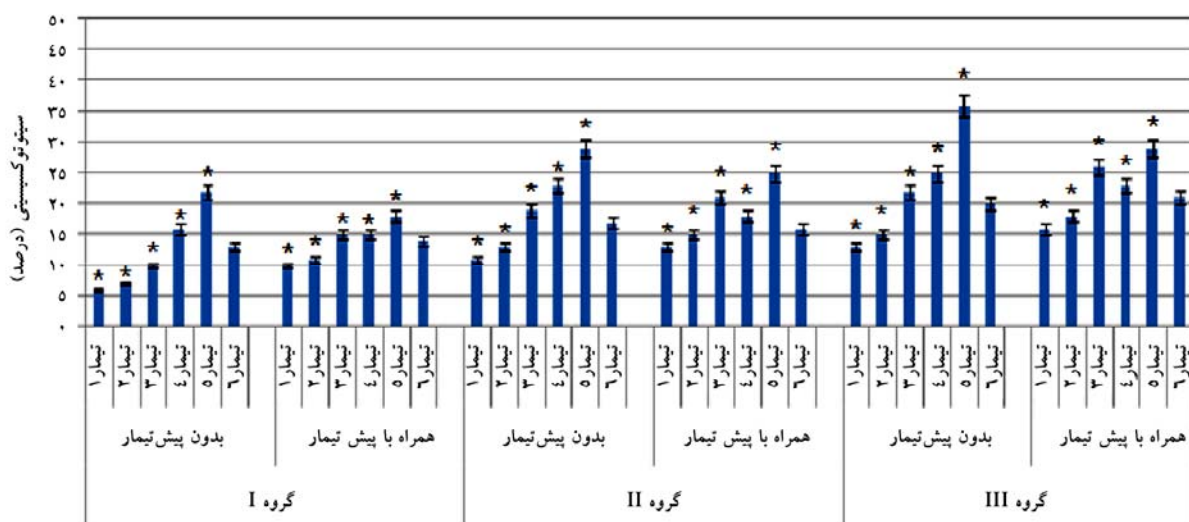
برای بررسی و آنالیز آماری داده‌های حاصل از ارزیابی میزان سیتوتوکسیسیته، میزان مرگ سلولی و نوریت‌زایی به صورت میانگین و انحراف از خطای میانگین، از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. بررسی معنی‌دار بودن اختلاف بین گروه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و آزمون Tukey انجام شد. برای رسم نمودارها از برنامه EXCEL استفاده شد و سطح معنی‌دار بودن داده‌ها نیز در سطح ۹۵ درصد مشخص شد.

یافته‌ها

سیتوتوکسیسیته سلول‌ها

نتایج به دست آمده از آزمون سیتوتوکسیسیته سلول‌های PC۱۲ در گروه I نشان داد که در دسته بدون پیش تیمار با نالتروکسان، میزان سیتوتوکسیسیته در تیمارهای ۱ و ۲ نسبت به تیمار ۶ به طور معنی‌داری کاهش یافت در حالی که در تیمارهای ۴ و ۵ نسبت به تیمار ۶ به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$). در دسته پیش تیمار با نالتروکسان میزان سیتوتوکسیسیته در تیمارهای ۱ و ۲ نسبت به تیمار ۶ کاهش

معنی‌دار و در تیمار ۵ نسبت به تیمار ۶ افزایش معنی‌دار نشان داد ($p < 0.05$). نتایج نشان داد که بین دسته‌ها در تیمارهای ۱، ۲، ۳ و ۵ به لحاظ آماری اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($p < 0.05$). از طرفی نتایج به دست آمده از میزان سیتوتوکسیسیته سلول‌ها در گروه II در دسته بدون پیش تیمار با نالتروکسان کاهش معنی‌داری در تیمارهای ۱ و ۲ و افزایش معنی‌داری در تیمارهای ۴ و ۵ در مقایسه با تیمار ۶ نشان داد و در تیمار ۱ نیز میزان سیتوتوکسیسیته نسبت به تیمار ۶ به شکل معنی‌داری کاهش یافت و در تیمارهای ۳ و ۵ افزایش معنی‌داری در مقایسه با تیمار ۶ در دسته با پیش تیمار نالتروکسان مشاهده شد ($p < 0.05$). در گروه III اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای ۱ و ۲ به شکل کاهشی و تیمارهای ۴ و ۵ به شکل افزایشی در دسته بدون پیش تیمار نالتروکسان و در تیمارهای ۱ و ۲ به شکل کاهشی و در تیمارهای ۳ و ۵ به شکل افزایشی در دسته با پیش تیمار نالتروکسان در مقایسه با تیمار ۶ مشاهده شد ($p < 0.05$). بررسی‌های آماری نشان داد که اختلاف آماری بین دسته‌ها در تیمارهای ۱، ۲، ۳ و ۵ معنی‌دار بود ($p < 0.05$) (شکل ۱).

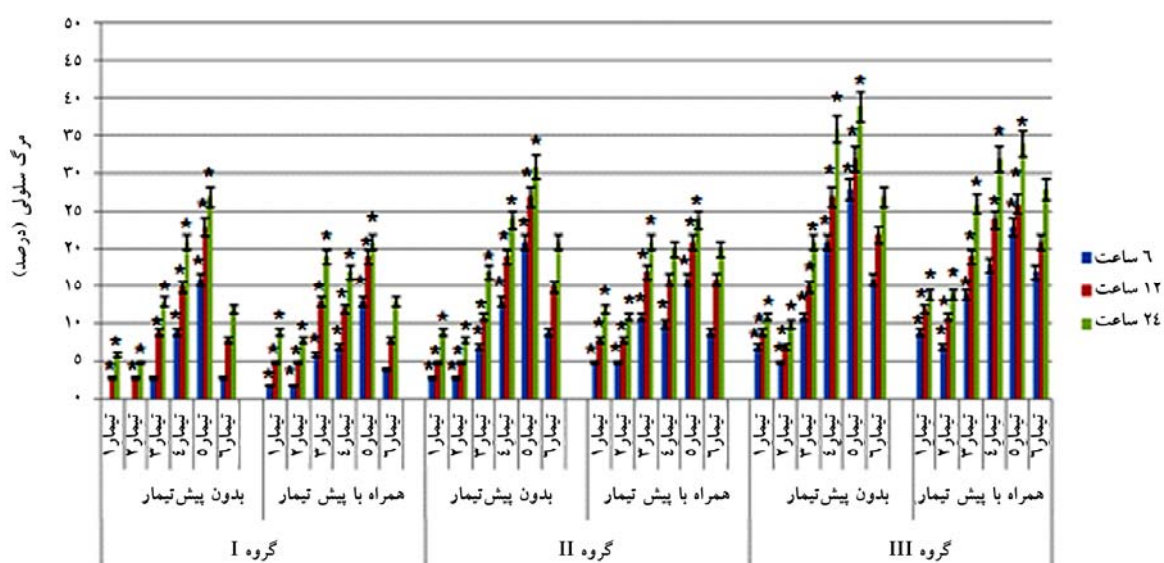


شکل ۱. سیتوتوکسیسیته سلول‌های PC ۱۲ پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف مورفین.

گروه I، II و III: کشت در حضور غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۱۴ نانومولار استوروسپورین

تیمارهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶: تیمار با غلظت‌های 10^{-12} ، 10^{-10} ، 10^{-8} ، 10^{-6} ، 10^{-4} و 10^{-2} مولار مورفین

ستون‌هایی که با نماد * مشخص شده دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار ۶ است (آزمون ANOVA و $p < 0.05$).



شکل ۲. مرگ سلولی سلول‌های PC12 پس از تیمار با غلظت‌های مختلف مورفین.

گروه I، II و III: کشت در حضور غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۱۴ نانومولار استوروسپورین

تیمارهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶: تیمار با غلظت‌های 10^{-12} ، 10^{-10} ، 10^{-8} ، 10^{-6} ، 10^{-4} و 10^{-2} مولار مورفین

ستون‌هایی که با نماد * مشخص شده دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار ۶ است (ANOVA و $p < 0.05$).

مرگ سلولی

نتایج به دست آمده از بررسی میزان مرگ سلولی در دسته بدون پیش تیمار نالتروکسان نشان داد که مورفین در حضور غلظت‌های مختلف استوروسپورین در زمان‌های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تیمار در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ باعث کاهش معنی‌دار و در تیمارهای ۴ و ۵ باعث افزایش معنی‌دار در مقایسه با تیمار ۶ می‌شود. از طرفی در دسته پیش تیمار شده با نالتروکسان تیمارهای ۱ و ۲ کاهش معنی‌دار و تیمارهای ۳، ۴ و ۵ افزایش معنی‌داری را در مقایسه با تیمار ۶ نشان دادند ($p < 0.05$). اختلافات آماری بین دو دسته برای تیمارهای ۱ تا ۵ معنی‌دار بود ($p < 0.05$) (شکل ۲).

نوریت زایی سلول‌ها

پس از گذشت ۶ ساعت از انجام آزمایش نتایج نشان داد که در گروه I افزایش TNL در تیمارهای ۱ تا ۳ و کاهش TNL در تیمارهای ۴ و ۵ از دسته بدون پیش تیمار نالتروکسان در مقایسه با تیمار ۶ معنی‌دار و از طرفی تمامی اختلافات میان تیمارها به شکل یک به یک از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$). مشاهدات نشان

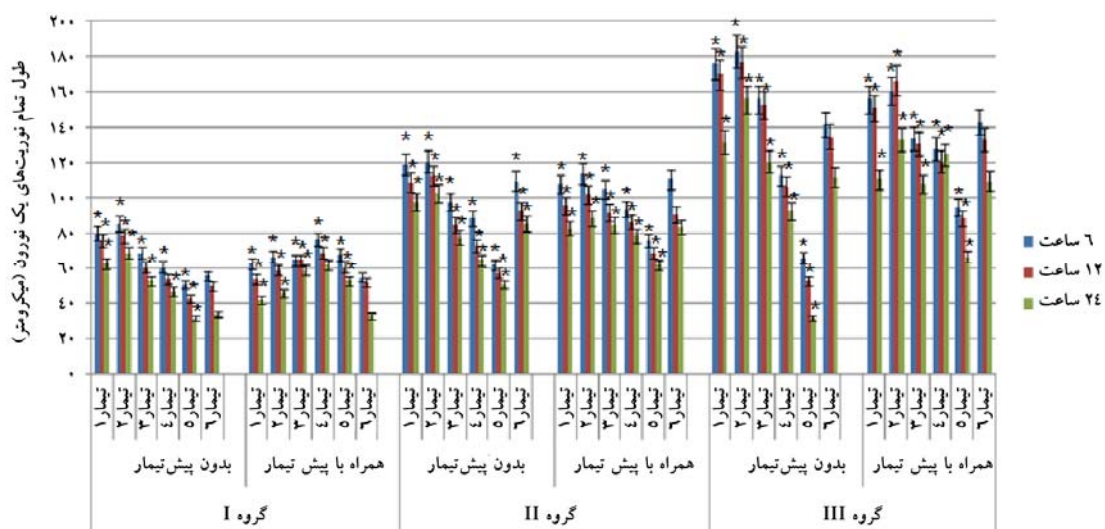
داد که از لحاظ آماری افزایش TNL در تمامی تیمارها در دسته همراه با پیش تیمار نالتروکسان و دسته بدون پیش تیمار نالتروکسان معنی‌دار بوده و نیز اختلاف میان تیمارهای ۱ تا ۵ در بین دو دسته به جز در تیمار ۳ و ۶ از لحاظ آماری معنی‌دار بوده است ($p < 0.05$). میزان TNL نوروها در گروه II نشان داد که افزایش TNL در تیمارهای ۱ و ۲ و کاهش TNL در تیمارهای ۴ و ۵ از دسته بدون پیش تیمار نالتروکسان در مقایسه با تیمار ۶ معنی‌دار و از طرفی اختلافات میان تیمارهای ۱ و ۳ و ۶ و تیمارهای ۱ و ۲ از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. نتایج نشان داد که از لحاظ آماری افزایش TNL در تیمارهای ۱ و ۲ و کاهش TNL در تیمارهای ۴ و ۵ از دسته با پیش تیمار نالتروکسان در مقایسه با تیمار ۶ معنی‌دار و از طرفی اختلافات میان تیمارهای ۱ و ۳ و ۶ و تیمارهای ۱ و ۲ از لحاظ آماری بی معنی بود. در گروه III افزایش TNL در تیمارهای ۱ تا ۳ و کاهش TNL در تیمارهای ۴ و ۵ از دسته بدون پیش تیمار نالتروکسان در مقایسه با تیمار ۶ معنی‌دار و از طرفی اختلافات میان تیمارهای ۱ و ۲ از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. از لحاظ آماری افزایش TNL در تیمارهای ۱ و ۲ و کاهش TNL در تیمارهای ۴ و ۵ از دسته با پیش تیمار نالتروکسان در مقایسه با تیمار ۶ معنی‌دار و

۱ و ۲ و کاهش TNL در تیمارهای ۴ و ۵ در دسته با پیش تیمار نالتروکسان در مقایسه با تیمار ۶ و نیز اختلاف میان تیمارهای ۱ تا ۵ در دو گروه از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$) (شکل ۳). پس از گذشت ۲۴ ساعت از انجام آزمایش اندازه‌گیری TNL نوروها در گروه I، افزایش TNL در تیمارهای ۱ تا ۴ در مقایسه با تیمار ۶ معنی‌دار و کاهش TNL و از طرفی اختلافات میان تیمارهای ۱ و ۲، ۵ و ۶ و نیز اختلاف میان تیمارهای ۴ و ۶ از دسته بدون پیش تیمار نالتروکسان معنی‌دار نبود. از لحاظ آماری افزایش TNL در تیمارهای ۱ تا ۵ در دسته با پیش تیمار نالتروکسان در مقایسه با تیمار ۶ و نیز اختلاف میان تیمارهای ۱ تا ۵ در دو دسته آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$). میزان TNL نوروها در گروه II نشان داد که افزایش TNL در تیمارهای ۱ و ۲ در مقایسه با تیمار ۶ معنی‌دار و کاهش TNL در تیمارهای ۳ تا ۵ در مقایسه با تیمار ۶ از دسته بدون پیش تیمار نالتروکسان از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$). مشاهده شد که از لحاظ آماری افزایش TNL در گروه III در تیمار ۲ و کاهش آن در تیمار ۵ در دسته با پیش تیمار نالتروکسان در مقایسه با تیمار ۶ معنی‌دار است اما این اختلاف میان تیمارهای ۱ و ۲، ۳ و ۴ بی‌معنی و نیز اختلاف میان تیمارهای ۱ تا ۵ بین دو دسته آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$) (شکل‌های ۳ و ۴).

از طرفی اختلافات میان تیمارهای ۳ و ۶ و تیمارهای ۱ و ۲ از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

پس از گذشت ۱۲ ساعت از انجام آزمایش نتایج نشان داد که در گروه I افزایش TNL در تیمارهای ۱ تا ۳ و کاهش TNL در تیمار ۵ از دسته بدون پیش تیمار نالتروکسان در مقایسه با تیمار ۶ معنی‌دار و از طرفی اختلافات میان تیمارهای ۱ و ۲ و نیز اختلاف میان تیمارهای ۴ و معنی‌دار نبود. نتایج نشان داد که از لحاظ آماری افزایش TNL در تیمارهای ۲ تا ۵ در دسته با پیش تیمار نالتروکسان در مقایسه با تیمار ۶ معنی‌دار بوده و نیز اختلاف میان تیمارهای ۱ تا ۵ به جز در تیمار ۳ از لحاظ میان دو دسته معنی‌دار بوده است ($p < 0.05$). همچنین افزایش TNL در تیمار ۲ و کاهش TNL در تیمار ۵ در دسته با پیش تیمار نالتروکسان در مقایسه با تیمار ۶ معنی‌دار بود و اختلاف میان تیمار ۱ با تیمار ۲، و اختلاف بین تیمارهای ۳ و ۴ با تیمار ۶ معنی‌دار نبود. اختلاف میان تیمارهای ۲ تا ۵ میان دو دسته از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$).

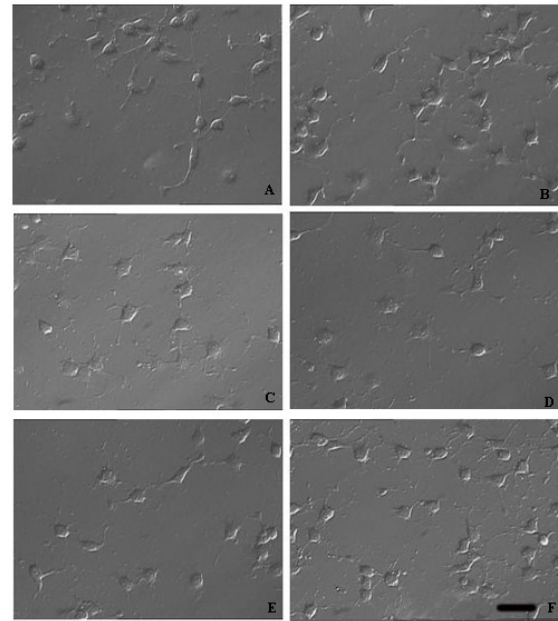
در گروه III در دسته بدون پیش تیمار میزان TNL در هر سه بازه زمانی در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ نسبت به تیمار ۶ افزایش معنی‌دار و در تیمارهای ۴ و ۵ نسبت به تیمار ۶ کاهش معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0.05$). اختلاف میان تیمارهای ۱ و ۲ از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. از لحاظ آماری افزایش TNL در تیمارهای



شکل ۳. نوریت‌زایی سلول‌های PC۱۲ پس از تیمار با غلظت‌های مختلف مورفین گروه I، II و III: کشت در حضور غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۱۴ نانومولار استوروسپورین تیمارهای ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶: تیمار با غلظت‌های 10^{-12} ، 10^{-10} ، 10^{-8} ، 10^{-6} ، 10^{-4} و 10^{-2} مولار مورفین ستون‌هایی که با نماد * مشخص شده دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار ۶ است (ANOVA و $p < 0.05$).

نوریتی گسترده در سلول‌های بنیادی جنینی تولید کند [۱۲]. علاوه بر این؛ تامپسون و لوین (Levin و Thompson) اخیراً نشان دادند که تیمار سلول‌های RGC-5 با آنالوگ‌های استوروسپورین سبب توقف تقسیم، بیان برخی کانال‌های یونی و شکل‌گیری ظاهر نورونی در این سلول‌ها می‌شود. تمایز با استوروسپورین تعجب‌برانگیز است چراکه این مهارکننده کیناز به عنوان القاگر آپوپتوز به کار می‌رود [۲]. اگرچه جزئیات مکانیسم فعالیت استوروسپورین به عنوان یک القاگر عصبی ناشناخته باقی مانده است به نظر می‌رسد که این ماده در فعال‌سازی برخی پروتئین کینازها که در فرارشد نوریتی مشارکت دارد همکاری می‌کند [۱۳]. استوروسپورین برای ایجاد زواید نوریتی بر خلاف NGF که در سطح رونویسی بیان ژن tau را افزایش می‌دهد، روی خود پروتئین tau اثر گذشته و از طریق مهار MAP-2 کیناز که باعث فسفریله کردن پروتئین tau و در نهایت مختل کردن فعالیت آن در پایداری میکروتوبولها و زواید نورونی می‌شود، فسفریلاسیون پروتئین tau را به میزان قابل توجهی کم کرده و به این ترتیب شرایط را برای اتصال مناسب پروتئین tau به میکروتوبولها و در نهایت ایجاد و پایداری زواید نوریتی فراهم می‌کند [۱۴ و ۱۵].

در این مطالعه از استوروسپورین به عنوان القاکننده تمایز عصبی و نیز از مورفین به منظور بالا بردن میزان بقا و افزایش طول نوریت‌ها در تمایز سلول‌های PC۱۲ استفاده شد. نتایج متناقض بسیاری در مورد آثار مورفین بر تکثیر سلول‌های اجداد نورونی در ناحیه زیرگرانولی (SGZ: Sub-Granular Zone) که یکی از مراکز نوروزنزیس در مغز پستانداران است، انتشار یافته که نشان دهنده پیچیدگی مکانیسم‌های دربرگیرنده آن است [۱۶]. بررسی‌های ریخت‌شناختی سلول‌های تحت تیمار با



شکل ۴. اثر مورفین در حضور غلظت ۱۲۴ نانومولار استوروسپورین بر میزان نوریت‌زایی در سلول‌های PC-12
 غلظت‌های ۱۰^{-۴}، ۱۰^{-۶}، ۱۰^{-۸}، ۱۰^{-۱۰}، ۱۰^{-۱۲}، F, E, D, C, B, A: مورفین، بار: ۵۰ میکرومتر

بحث

در این تحقیق پس از تمایز سلول‌های PC۱۲ به نورون‌های بالغ توسط استوروسپورین همراه با غلظت‌های مختلف مورفین، مورفولوژی، میزان سیتوتوکسیسیتی و مرگ سلولی در سلول‌ها ارزیابی شد.

استوروسپورین مهارکننده طیف وسیعی از پروتئین کینازهاست که در برخی اعمال فیزیولوژیکی از جمله نوروزنزیس و آپوپتوز دخالت دارد [۴]. استوروسپورین قادر به القای فرارشد نوریت‌ها در لاین‌های سلولی نوروبلاستوما‌ی موش است [۱۰]. همچنین مطالعه شاماچر (Schumacher) و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان داد که استفاده از استوروسپورین به عنوان یک ماده نوروتروفیک در غلظت‌های پایین، می‌تواند نوریت‌های آکسون مانند بلندی را با شبکه‌های

بررسی فعالیت مهار کننده رسپتورهای اپیویدی (نالتروکسان) نشان داد که با پیش تیمار سلول‌ها توسط این مهارکننده، آثار مختلف مورفین نسبت به شرایط بدون مهارکننده در غلظت‌های مختلف کاملاً مهار می‌شود که نشان می‌دهد آثار مورفین در محیط کشت وابسته به تحریک و فعالیت رسپتورهای اپیویدی است [۱۷]. بررسی‌های انجام شده درباره اثر مورفین در شرایط *in vitro* در مدل‌های سلولی کشت شده شامل نوروها و میکروگلیاها، سلول‌های ریوی و حتی سلول‌های سرطانی همگی به نقش تخریبی غلظت‌های بالا و مصرف حاد مورفین بر القای مرگ سلولی یا نکروز در این جمعیت‌ها تأکید دارند [۱۸ و ۱۹].

از طرفی نشان داده شده است که مورفین یک عامل حفاظت کننده در برابر استرس‌های اکسیداتیو داخل سلولی در لاین سلولی نوروبلاستوما ی انسانی، آپوپتوز القا شده توسط peroxynitrite در آستروسیت‌های اولیه نوزاد موش صحرایی و مرگ سلولی القا شده توسط β آمیلوئید در سلول‌های HTB-11 نوروبلاستوما است [۲۰-۲۲]. مورفین حفاظت نوروئی وابسته به رسپتورهای اپیویدی را علیه ایسکمی در موش صحرایی القا می‌کند و مرگ سلولی ایجاد شده توسط ایسکمی را در نواحی CA1 هیپوکمپ کاهش می‌دهد [۲۳]. در بررسی که در سال ۲۰۰۸ توسط چن (Chen) و همکارانش روی نوروها ی اولیه از مغز موش صحرایی تازه متولد شده صورت گرفت، مشخص شد که تیمار با مورفین در حضور استورسپورین، سطح 70 heat shock proteine (HSP70) که یک مولکول chaperone القا شده در پاسخ استرسی است را کاهش می‌دهد [۱۷].

در غلظت‌های بالا (۱۰ میکرومولار تا ۱۰ میلی‌مولار) مورفین رشد زواید نوروئی را در کشت‌های اولیه نوروها ی گرانول مخچه‌ای و هیپوکمپ، در یک مدل وابسته به

غلظت‌های مورد استفاده مورفین همراه با غلظت‌های مختلف استورسپورین به مدت ۲۴ ساعت نشان داد، علاوه بر آن‌که در تمامی غلظت‌های استورسپورین به تنهایی یا همراه با مورفین اغلب سلول‌ها تمایز یافته و ظاهر تکامل یافته نوروئی را از خود بروز می‌دهند، اما غلظت‌های 10^{-10} و 10^{-4} مولار مورفین به ترتیب در حضور غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۱۴ نانومولار استورسپورین ایجاد کمترین و بیشترین فعالیت سیتوتوکسیستی و القای مرگ سلولی را در مقایسه با غلظت‌های دیگر و نیز در مقایسه با گروه کنترل (استورسپورین به تنهایی) ایجاد کرده است. از طرف دیگر؛ مطالعات افزایش طول نوریت نشان داده است که در غلظت‌های مذکور (10^{-10} و 10^{-4} مولار مورفین) به ترتیب بیشترین و کمترین طول نوریت در هر سه گروه همراه استورسپورین مشاهده می‌شود و در مقایسه با گروه کنترل بدون مورفین (استورسپورین به تنهایی) دارای افزایش و کاهش معنی‌داری در طول نوریت هستند که البته این میزان تغییرات در افزایش طول نوریت در گروه همراه با غلظت ۲۱۴ نانومولار استورسپورین در مقایسه با سایر غلظت‌های استورسپورین دارای روند تشدید یافته و در کاهش طول نوریت نیز دارای روند تخفیف یافته‌ای در مقایسه با سایر دوزهای استورسپورین است. سلول‌ها در غلظت 10^{-4} مولار مورفین در مقایسه با سایر غلظت‌های مورفین دارای ظاهری آسیب دیده بودند که این مسئله می‌تواند دلیلی بر پروآپتوتیک بودن این غلظت که هم در مقالات به آن اشاره شده و هم بررسی‌های آپوتوتیکی تحقیق حاضر آن را تأیید کرده، باشد. گفتنی است که این غلظت در مقایسه با گروه کنترل دارای سطح پایداری سلولی پایین‌تر و از نظر فعالیت سیتوتوکسیستی و القای مرگ سلولی دارای سطح بالاتری بود که خود بیانگر نقش ناپایدارکننده این غلظت مورفین بود.

کوتاه اثر اما همراه با آثار تخریبی (سیتوتوکسیسیستی و آپوپتوزیس) کمتر است. در حالی که در غلظت ۲۱۴ نانومولار استوروسپورین القای نوریت و تشکیل شبکه‌های عصبی قویتر و پایداری نوریت‌ها بیشتر است؛ گرچه به تبع افزایش غلظت استوروسپورین میزان مرگ هم بیشتر می‌شود اما تشکیل نوریت‌های پایدار و تولید شبکه‌های عصبی گسترده در محیط نشان از غلظت تمایزی مطلوب ۲۱۴ نانومولار دارد. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که غلظت ۱۰۰ پیکومولار مورفین به علت توانایی آن در افزایش طول نوریت‌ها، افزایش پایداری نوریت‌ها و کاهش گسترده آثار سیتوتوکسیسیستی بهترین دوز تمایزی و در مقابل غلظت ۱۰۰ میکرومولار مورفین به علت کاهش طول نوریت، کاهش پایداری نوریت‌ها و افزایش سطح آپوپتوز و سیتوتوکسیسیستی دوز سیتوتوکسیک مورفین است.

این نتایج نشان می‌دهد که از مورفین می‌توان به عنوان یک عامل کمکی-حفاظتی مؤثر در پروتکل‌های القای تمایز عصبی در سلول‌های PC۱۲ استفاده کرد.

نالوکسان مهار می‌کند [۷]. در حالی که غلظت‌هایی از مورفین که در محدوده بین ۱۰ نانو مولار و ۱۰ پیکومولار قرار دارند، رشد زواید نورونی را در نورون‌های کورتکس و نخاع تا بیش از ۲۰ درصد افزایش می‌دهد، غلظت‌های پایین‌تر از ۱۰ پیکو مولار مورفین افزایش طول زواید نورونی را در لاین سلولی PC۱۲ تحریک می‌کند [۲۴].

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که افزایش غلظت استوروسپورین باعث افزایش میزان سیتوتوکسیسیستی سلول‌های PC۱۲ در دوره ۲۴ ساعته می‌شود اما مورفین در غلظت‌های کم باعث حفظ و بهبودی آثار مرگ سلولی و سیتوتوکسیسیستی و در نهایت القای پایداری بیشتر نوریت‌ها در محیط کشت می‌شود. این در حالی است که این آثار مورفین در غلظت‌های بالا معکوس می‌شود. تمامی اثرهای مورفین وابسته به القای فعالیت رسپتورهای اپیویدی است. این مطالعه نشان می‌دهد که استوروسپورین در غلظت‌های کم در مقایسه با غلظت ۲۱۴ نانومولار قادر به تولید تمایز عصبی غیر پایدار برگشت پذیر و

References

1. Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 135: 397-402.
2. Thompson AF, Levin LA. Neuronal differentiation by analogs of staurosporine. *Neurochem Int* 2010; 56: 554-60.
3. Deshmukh M, Johnson EM. Staurosporine induced neuronal death: multiple mechanisms and methodological implications. *Cell Death Differ* 2000; 7: 250-61.
4. Rasouly D, Rahamim E, Lester D, Matsuda Y, Lazarovici P. Staurosporine-induced neurite outgrowth in PC12 cells is in dependent of protein kinase C inhibition. *Mol Pharmacol* 1992; 42: 35-43.
5. Tenconi B, Lesma E, DiGiulio AM, Gorio A. High opioid doses inhibit whereas low doses enhance neuritogenesis in PC12 cells. *Dev Brain Res* 1996; 94: 175-81.
6. Liu B, Qin L, Yan SN, Wilson BC, Liu Y, Hong JS. Femtomolar concentrations of dynorphins protect rat mesencephalic dopaminergic neurons against inflammatory damage. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 1133-41.
7. Eisch AJ, Barro M, Schad CA, Self DW, Nestler EJ. Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc. Natl Acad Sci USA* 2000; 97:

- 7579-84.
8. **Opanashuk LA, Hauser KF.** Opposing actions of the EGF family and opioids: heparin binding-epidermal growth factor (HB-EGF) protects mouse cerebellar neuroblasts against the antiproliferative effect of morphine. *Brain Res* 1998; 804: 87-94.
 9. **Sakaguchi M, Fujimori T, Satoh T, Satoh M, Takeuchi M, Matsumura E.** Effects of opioids on neuronal survival in culture of embryonic chick dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 1999; 262: 17-20.
 10. **Prince JA, Orelund L.** Staurosporine differentiated human SHSY5Y neuroblastoma cultures exhibit transient apoptosis and trophic factor independence. *Brain Res Bull* 1997; 43: 515-23.
 11. **Rønn L, Ralets I, Hartz B, Bech M, Berezin A, Berezin V, et al.** A simple procedure for quantification of neurite outgrowth based on stereological principles. *J Neurosci Method* 2004; 100: 25-32.
 12. **Schumacher A, Arnhold S, Addicks K, Doerfler W.** Staurosporine is a potent activator of neuronal, glial, and "CNS stem cell- like" neurosphere differentiation in murine embryonic stem cells. *Mol Cell Neurosci* 2003; 23: 669-80.
 13. **Sanchez-Ramos JR, Sons S, Kamath SG, Zigova T, Willing A, Stedeford T, et al.** Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol* 2001; 171: 109-15.
 14. **Sadot E, Barg J, Rasouly D, Lazarovici P.** Short- and long-term mechanisms of tau regulation in PC12 cells. *J Cell Sci* 1995; 108: 2857-64.
 15. **Drubin DG., Feinstein SC., Shooter EM., Kirschner MW.** Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly promoting factors. *J Cell Biol* 1985; 101: 1799-807.
 16. **Harburg GC, Hall FS, Harrist AV, Sora I, Uhl GR, Eisch AJ.** Knockout of the mu opioid receptor enhances the survival of adult-generated hippocampal granule cell neurons. *Neuroscience* 2007; 144: 77-87.
 17. **Chen Q, Cui J, Zhang Y, Yu LC.** Prolonged morphine application modulates Bax and Hsp70 levels in primary rat neurons. *Neurosci Lett* 2008; 441: 311-4.
 18. **Mao J, Sung B, Ji RR, Lim G.** Neuronal apoptosis associated with morphine tolerance: evidence for an opioid-induced neurotoxic mechanism. *J Neurosci* 2002; 22: 7650-61.
 19. **Yoshida A, Tokuyama S, Iwamura T, Ueda H.** Opioid analgesic-induced apoptosis and caspase-independent death in human lung carcinoma A549 cells. *Int J Mol Med* 2000; 6: 329-35.
 20. **Singhal PC, Reddy K, Franki N, Sanwal V, Gibbons N.** Morphine induces splenocyte apoptosis and enhanced mRNA expression of cathepsin-B. *Inflammation* 1997; 21: 609-17.
 21. **Rambhia S, Mantione KJ, Stefano GB, Cadet P.** Morphine modulation of the ubiquitin-proteasome complex is neuroprotective effects. *Neurosci* 2005; 11: 386-96.
 22. **Kim MS, Cheong YP, So HS, Lee KM, Kim TY, Oh J, et al.** Protective effects of morphine in peroxynitrite-induced apoptosis of primary rat neonatal astrocytes: potential involvement of G protein and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 kinase). *Biochem Pharmacol* 2001; 61: 779-86.
 23. **Pak T, Cadet P, Mantione KJ, Stefano GB.** Morphine via nitric oxide modulates beta-amyloid metabolism: a novel protective mechanism for Alzheimer's disease. *Med Sci Monit* 2005; 11:

- 357-66.
24. **Brailoiu E, Hoard J, Brailoiu GC, Chi M, Godbolde R, Dun NJ.** Ultra low concentrations of

morphine increase neurite outgrowth in cultured rat spinal cord and cerebral cortical neurons. *Neurosci Lett* 2004; 365: 10-13.