جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره پانزدهم، شمارهٔ ۵، شهریور ۱۳۹۲، صفحه ۱۶-۷

نقش حفاظتی غلظت های پایین مورفین بر اثرات مرگ سلولی القا شده دگزامتازون در سلول های تمایز یافتهPC12

سعید نجمی نژاد(MSc)[۱]، حسین ژاله(MSc)[۱]، مهری آزادبخت(PhD)[۱*]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه رازی کرمانشاه

دریافت: ۹۱/۱۲/۸، اصلاح: ۹۲/۲/۱۱، پذیرش: ۹۲/۴/۱۹

خلاصه

سابقه و هدف: گلوکوکورتیکوئیدها رشد، تمایز و مرگ سلولی را در سلول‌های عصبی تحت تاثیر قرار می‌دهند. از طرفی در کشت‌های اولیه نورون‌ها در غلظت‌های پایین طول زواید نورونی را افزایش می‌دهند. در این تحقیق اثر غلظت‌های پایین مورفین بر مهار مرگ سلولی القا شده توسط دگزامتازون بر سلول‌های تمایز یافته PC12 بررسی شد.

مواد و روشها: در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف دگزامتازون (۰nM، ۱ nM، ۱۰nM، ۱۰۰nM، ۱μM، ۱۰μM) بدون مورفین و همراه با مورفین (10^{-10} M) بر سلول‌های PC12 مورد بررسی قرار گرفت و میزان زنده ماندن سلول‌ها و طول کل نوریت‌ها ارزیابی شد. سلول‌های PC12 در محیط کشت RPMI1640، ۱٪ FBS، ۱٪ پنی سیلین/استروپتومایسین، ۲ میلی مولار L-Glutanin و۱٪ NEAA در حضور غلظت ۲۱۴ nM استئورسپورین بعنوان عامل تمایز دهنده عصبی کشت داده شدند. سلول‌های تمایز یافته در دو گروه مطالعه شدند. سلول‌ها در گروه I با غلظت‌های مختلف دگزامتازون بدون مورفین و در گروه II با غلظت‌های مختلف دگزامتازون همراه با غلظت 10^{-10} مولار مورفین تیمار شدند. در هر گروه شش تیمار وجود داشت. تیمار ۱ بدون دگزامتازون و به تیمارهای ۲ تا ۶ غلظت‌های مختلف دگزامتازون (۱nM،۱۰nM، ۱۰۰nM،۱Mμ،۱۰Mμ) به ترتیب اضافه شده و میزان زنده ماندن سلولها مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

یافته ها: میزان زنده ماندن سلول‌ها در گروه I در تیمارهای ۲، ۳ و ۴ در مقایسه با تیمارهای ۱، ۵ و ۶ افزایش پیدا کرد ($p<0/05$)، در گروه II در تیمارهای ۱، ۲، ۳ و ۴ افزایش و در تیمارهای ۵ و ۶ کاهش میزان زنده ماندن سلول‌ها مشاهده شد ($p<0/05$). طول نوریت‌ها در گروه I در تیمارهای ۱ تا ۶ به ترتیب ۱۴۸/۷۰±۲/۳۷، ۸۵/۰۶±۱/۶۱، ۸۸/۳۸±۱/۵۸، ۹۱/۰۵±۱/۶۶، ۷۲/۸۲±۱/۳۲ و ۶۹/۱۸±۱/۱۸ میکرو متر بود. بیشترین طول نوریت‌ها در تیمار ۱ و کوتاه‌ترین طول نوریت‌ها در تیمار ۶ مشاهده شد ($p<0/05$). طول نوریت‌ها در گروه II در تیمارهای ۱ تا ۶ به ترتیب ۱۶۴/۲۲±۴/۴۵، ۱۰۵/۱۹±۲/۸۴، ۱۰۸/۳۳±۳/۰۹، ۱۴۹/۴۶±۴/۰۴، ۱۱۷/۶۰±۳/۰۸ و ۱۱۵/۲۴±۲/۷۳ میکرومتر بود. بیشترین طول نوریت‌ها در تیمار ۱ و کمترین طول نوریت‌ها در تیمارهای ۲ و ۳ مشاهده شد ($p<0/05$).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که غلظت‌های پایین مورفین سبب بهبود زنده ماندن سلول‌ها و افزایش طویل شدن نوریت‌ها می‌شود.

واژه های کلیدی: دگزامتازون، مورفین، طویل شدن نوریت‌ها، رده سلولی PC12.

مقدمه

گلوکوکورتیکوئیدها اثرات عمیقی بر رشد، تمایز و مرگ سلول ارگان‌ها و بافت‌ها از جمله مغز و سیستم عصبی دارند. فعالیت‌های عملکردی گلوکوکورتیکوئیدها به وسیله محیط بافت و سلول اعمال می‌شود (۱). در شرایط in vivo قرار گیری پیش از تولد در معرض مقادیر افزایش یافته گلوکوکورتیکوئیدها سبب تغییرات رفتاری، فیزیولوژی و مورفولوژی در آینده می شود (۲). Gaillarde و همکاران نشان دادند در نوزادانی که با دگزامتازون تیمار شدند ۱۵ درصد ناتوانی تکوین عصبی و عصب‌زایی در نواحی ویژه مغز رخ می‌دهند (۳). آزمایش‌های دیگر نشان داد که قرارگیری زیاد در معرض کورتیکواسترون سبب کاهش ۲۰ درصدی در نورون‌های هیپوکامپ می‌شود (۴). در مطالعه Flagel و همکاران تیمار نوزادان با دگزامتازون سبب کاهش۳۰ درصدی حجم بافت مغزی شد (۵). اما مقادیر فیزیولوژیک یا کمی افزایش یافته گلوکوکورتیکوئیدها بر بقای سلول عصبی اثر زیان آور ندارد (۶). حذف استروئیدها به وسیله آدرنالکتومی تکثیر سلولی و عصب‌زایی را در خرگوش‌های جوان و بالغ افزایش داده اما بر عکس، کورتیکواسترون خارجی این فرآیند را در هر دو مرحله سرکوب می‌کند (۷). مطالعات نشان داده که سطحهای مزمن گلوکوکورتیکوئیدها سبب تخریب عصبی یا سرکوب عصب‌زایی در هیپوکامپ و سلول‌های پیشگام

▣ این مقاله حاصل پایان نامه سعید نجمی نژاد دانشجو رشته علوم جانوری دانشگاه علوم پز شکی کرمانشاه باشد.

* مسئول مقاله:
آدرس: کرمانشاه، خیابان باغ ابریشم، دانشگاه رازی، دانشکده علوم پایه ، گروه زیست شناسی، کد پستی: ۶۷۱۴۹۶۷۳۴۶ ، تلفن: ۰۸۳۱-۴۲۷۴۵۴۵
email: azadbakhtm_tmu@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

ژیروس دندانه دار و هم کاهش تحریک‌پذیری در مکانیسم میانجی شده توسط کلسیم می‌شود (میزان آتروفی به مقدار گلوکوکورتیکوئیدها بستگی دارد) (۸). سطح های زیاد گلوکوکورتیکوئیدها سبب اثرات مضر روی هیپوکامپ شامل جمع شدن زوائد دندریتی، مهار عصب‌زایی، کاهش حجم هیپوکامپ و اثرات نوروتوکسیک می‌شود (۹). در سیستم عصبی مرکزی(CNS) در حال تکوین، گلوکوکورتیکوئیدها اثرات زیان‌آوری روی سلول‌های گلیال و نورون دارند. تحقیقات نشان داد که گلوکوکورتیکوئیدها تمایز و بلوغ نورون‌های هرمی، الیگودندروسیت و آستروسیت را کند می‌کنند و تزریق کوتاه مدت گلوکوکورتیکوئیدها سبب آتروفی نورون‌ها و تزریق بلند مدت سبب مرگ سلول‌ها می‌شود (۱۰). در حالیکه در سیستم عصبی گلوکوکورتیکوئیدها مرگ سلول عصبی را افزایش می‌دهند (۱۱).

اپیوئید اصطلاحی است که به هرنوع ماده درون زا و یا صناعی مولد اثرات شبه مورفینی اطلاق می گردد (۱۳و۱۲). عملکردهای اپیوئیدها وابسته به تشکیل کمپلکس رسپتور–آگونیست در سطح غشاهای سلولی به وجود می آید. اتصال آگونیست های اپیوئیدی به رسپتورها و فعال شدن رسپتورها باعث شروع آبشاری از وقایع بیولوژیکی در درون سلول ها می گردد(۱۴). مطالعات نشان می دهد مورفین بعنوان داروئی اپیوئیدی منجر به تنظیم فرآیند های اندوکرینی (۱۷–۱۵) و سیستم ایمنی (۱۹و۱۸) می گردد. مورفین علاوه بر اثرات ضد دردی شناخته شده، در تکوین مغز، عصب‌زایی، تمایز سلولی و آپوپتوز و نیز در شرایط in vivo وابسته به دوز مصرفی، مرگ سلولی یا بقا سلولها را در نورون‌های سیستم عصبی مرکزی تعدیل می‌کند (۲۱و۲۰). سال های متمادی است که محققین از سلولهای رده PC۱۲ به عنوان یک مدل مناسب جهت مطالعات نوروبیولوژیک و بررسی اثرات فاکتورهای رشد بر سلول های عصبی استفاده می کنند. رده سلولی PC12 از تومور قابل پیوند فئوکروموسیتوما واقع در مدولای غده فوق کلیوی رت (قسمتی از غده فوق کلیه که ماهیت عصبی دارد) به دست آمده است. سلول‌های رده PC12 به عنوان یک مدل بسیار مناسب برای مطالعات نوروبیولوژیک و نوروشیمیایی توسط محققان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۲). از طرفی جهت بهبود رشد و پایداری سلو ل های عصبی و جلوگیری از مرگ سلولی و تخریب این سلول در حضور گلوکوکورتیکوئیدها احتمالاً می توان از موادی مانند اپیوئیدها که اثرات ضد آپوپتوزی دارند استفاده کرد. از این رو در این مطالعه با توجه به اثر حفاظتی غلظتهای پائین مورفین بر آن شدیم تا اثرات جبرانی شبه فاکتور رشدی این ماده را بر مرگ سلولی القا شده توسط دگزامتازون در کشت سلول‌های تمایز یافته PC۱۲ مورد مطالعه قرار بدهیم.

مواد و روشها

کشت سلول‌های PC۱۲: مورفین سولفات از شرکت TEMAD تهیه گردید و محلول ذخیره ۱۰ میلی مولار PBS تهیه و در ویال‌های ۱ میلی لیتری تقسیم‌بندی و در دمای ۸–۲ درجه سانتیگراد نگهداری شد. این محلول با غلظت ۱۰۰X بعنوان محلول ذخیره تهیه شد. آمپول ۲ میلی لیتری دگزامتازون از شرکت داروسازی دارو پخش تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. محلول ۱ میلی مولار آن تهیه و در ویال‌های ۱ میلی لیتری تقسیم بندی و در دمای ۸–۲ درجه سانتیگراد نگهداری شد. این محلول با غلظت ۱۰۰ X بعنوان محلول ذخیره تهیه شد. سلول های PC۱۲ از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند و در محیط کشت RPMI1640 (Gipco) همراه با (w/v)٪۲/٪ (Bovine Serum Albumin; BSA)، BSA L-Glutamin ۱٪(v/v) و NEAA (Nonessential Amino Acids; NEAA) ۱٪(v/v)، درون فلاسک کشت سلول T-25 (NUNC) کشت داده شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت محیط کشت سلولی با محیط کشت تازه تعویض شد. هنگامی که تراکم سلول‌های چسبیده به کف فلاسک کشت سلول به ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید، پاساژ سلول‌ها با استفاده از محلول Trypsin-EDTA ۰/۲۵ درصد انجام شد.

سلول ها به دو گروه تقسیم شدند: گروه I تمایز سلول‌های PC12 با ۲۱۴ نانومولار استئورسپورین همزمان تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف دگزامتازون و بدون مورفین دارای ۶ تیمار که تیمار ۱ همراه با غلظت صفر دگزامتازون، تیمار ۲ همراه با غلظت ۱nM دگزامتازون، تیمار ۳ همراه با غلظت ۱۰ nMدگزامتازون، تیمار ۴ همراه با غلظت ۱۰۰nM دگزامتازون، تیمار ۵ همراه با غلظت ۱μM دگزامتازون و تیمار ۶ همراه با غلظت ۱۰μM دگزامتازون بودند. در دسته اول سلول ها با مهارکننده نالتروکسان پیش تیمار نشدند و در دسته دوم سلول با مهارکننده نالتروکسان پیش تیمار شدند. در هر گروه II تمایز سلول‌های PC12 با ۲۱۴ نانومولار استئورسپورین همزمان تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف دگزامتازون و با غلظت 10^{-10}مولار (۱۰۰ پیکومولار) مورفین دارای ۶ تیمار که تیمار ۱ همراه با غلظت صفر دگزامتازون، تیمار ۲ همراه با غلظت ۱ nM دگزامتازون، تیمار ۳ همراه با غلظت ۱۰ nM دگزامتازون، تیمار ۴ همراه با غلظت ۱۰۰nM دگزامتازون، تیمار ۵ همراه با غلظت ۱μM دگزامتازون و تیمار ۶ همراه با غلظت ۱۰μM دگزامتازون بودند.

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 37^oC و دی اکسید کربن ۵ درصد نگهداری شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت (هنگامی که ۵۰ تا ۶۰ درصد کف ظرف کشت با سلولها پوشیده شده بود) محیط روی سلول‌ها برداشته شد. سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند و سلول‌ها در محیط کشت محتوی ۲۱۴ نانومولار استئورسپورین (Alexis) (دوز مناسب برای تمایز سلولی) با غلظت‌های مختلف دگزامتازون بدون مورفین و یا همراه با غلظت 10^{-10} مولار (۱۰۰ پیکومولار) مورفین در زمان‌های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت کشت داده شدند.

میزان زنده ماندن سلول‌ها: میزان زنده ماندن سلول‌های PC12 پس از انجام آزمایش با استفاده از محلول تریپان بلو ۴٪ استفاده شد. رنگ به داخل سلول‌های آسیب دیده و یا مرده که غشاء آنها دچار پارگی شده است نفوذ می‌یابد و در نتیجه سلول‌های مرده بر روی لام نئوبار به رنگ آبی دیده می‌شوند. این روش برای تعیین اثر غلظت‌های مختلف دگزامتازون به تنهایی و همراه با مورفین بر میزان زنده ماندن سلول‌های PC12 انجام گرفت. ارزیابی میزان زنده ماندن نورون‌ها در دو گروه در چهار زمان ۰، ۶، ۱۲ و۲۴ ساعت پس از تیمار به ترتیب زیر انجام گرفت:

سلول‌های PC12 با تراکم 5×10^5 cell/ml در ظروف کشت ۲۴ خانه کشت شدند. سپس ظروف کشت به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار گرفتند

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تا سلول‌ها به کف ظرف چسبیده و پخش شوند. سپس سلول‌ها در گروه‌های مورد مطالعه تیمار شدند. سلول‌ها در مقاطع زمانی ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت به کمک تریپسین از کف ظروف کشت جدا شدند و پس از تریپسینه کردن سلول‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی را با ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۴ درصد تریپان بلو ترکیب و پس از ۲ دقیقه توسط لام نئوبار شمارش شدند و درصد زنده ماندن سلول‌ها محاسبه شد. آزمایش برای چهار بار و در هر تکرار چهار خانه از خانه‌های ظرف کشت به هرتیمار اختصاص یافت. برای ارزیابی میزان زنده ماندن سلول‌ها، تعداد سلول‌های رنگ گرفته و رنگ نگرفته شمارش شدند و میزان زنده ماندن سلول‌ها از تقسیم تعداد سلول‌های رنگ نگرفته بر کل سلول‌ها ضربدر ۱۰۰ محاسبه شد.

۱۰۰× تعداد کل سلول‌ها / تعداد سلول‌های رنگ نشده = درصد بقاء سلولها

ارزیابی میزان نوریت‌زایی: یکی از بهترین مشخصه‌ها برای ارزیابی مورفولوژیکی سلول‌ها و میزان نوریت‌زایی نورون ها اندازه گیری طول تمام نوریت‌های یک نورون (TNL) با استفاده از شمارش Intersection ها است (۱۳). 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 نورون تعیین گردید. برای هر تیمار طول نوریت ها در ۱۰۰سلول پس از عکس‌برداری از نقاط تصادفی توسط میکروسکوپ معکوس مجهز به دوربین اندازه‌گیری شد. آزمایش سه بار تکرار گردید.

بررسی آماری داده های حاصل از ارزیابی میزان زنده ماندن سلول ها و میزان طویل شدن زائده های نوریتی با استفاده از نرم افزار آماری SPSS; version 16 محاسبه شد و از آزمون واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و تست Tukey برای بررسی معنی دار بودن اختلاف بین گروه ها استفاده شد و p<۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف دگزامتازون (۰nM، ۱ nM، nM ۱۰، ۱۰۰nM، ۱μM، ۱۰μM) بدون مورفین و همراه با مورفین (10^{-10} M) بر سلول‌های PC12 مورد بررسی قرار گرفت و میزان زنده ماندن سلول‌ها و طول کل نوریت‌ها ارزیابی شد.

اثر دگزامتازون بر میزان زنده ماندن سلول‌های PC12: میزان زنده ماندن سلول‌های PC12 در هر یک از دو گروه مورد مطالعه در زمان‌های ۰، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت بررسی شد. نتایج نشان داد که بلافاصله پس از تیمار در گروه I در بین تیمارهای ۱ تا ۶ و گروه II در بین تیمارهای ۱ تا ۶ اختلاف معنی داری از نظر میزان زنده ماندن سلول‌ها وجود نداشت. ۶ ساعت پس از تیمار میزان زنده ماندن سلول‌های PC12 در گروه I در تیمارهای ۱ تا ۶ به ترتیب۸۶٪، ۹۰/۹۲٪، ۹۱/۷۵٪، ۹۲/۱۷٪، ۸۸/۶۷٪ و ۸۷٪ بود. میزان زنده ماندن سلول‌ها در تیمار۲ تا ۶ نسبت به تیمار۱ افزایش نشان داد که از نظر آماری اختلاف معنی دار بود (p<۰/۰۵)، اما میزان زنده ماندن سلول‌ها در تیمار ۶ نسبت به تیمار۱ افزایش زیادی دیده نشد که از نظر آماری اختلاف معنی دار نبود. مقایسه بین تیمارهای ۲ تا ۶ نشان داد که تیمارهای ۲، ۳ و ۴ با هم دارای اختلاف معنی دار نیستند اما با تیمارهای ۵ و ۶ از نظر آماری اختلاف معنی دار بود (p<۰/۰۵). که نشان‌دهنده اینست غلظت‌های پایین دگزامتازون (۱nM، ۱۰nM، ۱۰۰nM) دارای اثر یکسانی بر میزان زنده ماندن سلول‌ها دارند. میزان زنده ماندن سلول‌های PC12 در گروه II در تیمارهای ۱ تا ۶ به ترتیب ۹۵/۳۳٪، ۹۶/۹۲٪، ۹۷/۳۳٪، ۹۷/۵۸٪، ۹۳٪ و ۹۱/۳۳٪ بود. افزایش میزان زنده ماندن سلول‌ها در تیمار ۱ می‌تواند ناشی از اثر مورفین باشد اما در تیمارهای ۲ تا ۴ دگزامتازون این افزایش زنده ماندن را تشدید کرده است و تیمارهای ۲ تا ۴ در این گروه میزان زنده ماندن سلول‌ها نسبت به تیمار ۱ افزایش نشان داد (p<۰/۰۵). اما در تیمار۵ و ۶ در این گروه میزان زنده ماندن سلول‌ها نسبت به تیمار ۱ کاهش نشان داد (p<۰/۰۵). این کاهش می‌تواند ناشی از اثر تخریبی غلظت‌های بالای دگزامتازون (۱μM، ۱۰μM) در محیط کشت باشد. مقایسه بین تیمارهای ۲ تا ۶ نشان داد که تیمارهای ۲ ، ۳ و ۴ با هم دارای اختلاف معنی دار نیستند اما با تیمارهای ۵ و ۶ از نظر آماری اختلاف معنی دار بود (p<۰/۰۵).

مقایسه بین گروه‌های I وII نشان داد میزان زنده ماندن سلول‌ها در تیمار ۱ گروه I و II به ترتیب ۸۶٪ و ۹۵/۳۳٪ شد. بنابراین افزایش در تیمار ۱ گروه II دیده شد و این افزایش می تواند ناشی از اثر حفاظتی مورفین باشد. از نظر آماری میزان زنده ماندن سلول‌های تیمار ۱ در دو گروه دارای اختلاف معنی دار بود (p<۰/۰۵). مقایسه تیمارهای ۲ تا ۶ گروه II با تیمارهای ۲ تا ۶ گروه I نشان داد که میزان زنده ماندن سلول‌ها در تیمارهای ۲ تا ۶ گروه II نسبت به تیمارهای ۲ تا ۶ گروه I بیشتر است که این افزایش میزان زنده ماندن سلول‌ها در گروه II ناشی از اثر تشدیدکنندگی دگزامتازون همراه با مورفین بر میزان زنده ماندن سلول‌ها است (p<۰/۰۵). مقایسه تیمارهای ۲ تا ۶ گروه II با تیمار۱ گروه I نشان داد میزان زنده ماندن سلول‌های تیمارهای ۲ تا ۶ گروهII از سلول‌های تیمار۱ گروه I بیشتر است (p<۰/۰۵). مقایسه تیمارهای ۲ تا ۶ گروه I با تیمار ۱ گروه II نشان داد میزان زنده ماندن سلول‌های تیمار ۲ تا ۶ گروه I از سلولهای تیمار ۱ گروه II کمتر است که از نظر آماری اختلاف معنی دار بود (p<۰/۰۵). این نشان می‌دهد که دگزامتازون همراه با مورفین نقش حفاظتی دارد.

۱۲ ساعت پس از تیمار سلول‌ها میزان زنده ماندن سلول‌ها در گروه I در تیمارهای ۱ تا ۶ به ترتیب ۷۹/۱۷٪، ۸۵/۳۳٪، ۸۵/۹۲٪، ۸۶/۷۵٪، ۷۹/۵۸٪ و ۷۷/۹۲٪ بود که تیمارهای ۲، ۳ و ۴ دارای اختلاف معنی دار نبودند اما با تیمارهای ۱، ۵ و ۶ اختلاف معنی دار داشتند و همچنین تیمارهای ۵ و ۶ نسبت به تیمار ۱ افزایش زیادی نشان ندادند و از نظر آماری اختلاف بینشان معنی دار نبود. میزان زنده ماندن سلول‌ها در گروه II برای تیمارهای ۱ تا ۶ به ترتیب ۹۰/۹۲٪، ۹۲/۳۳٪، ۹۲/۶٪، ۹۳/۱۶٪، ۸۳/۲۵٪ و ۸۰/۵٪ بود که در تیمار ۵ و ۶ کاهش شدید دیده شد (p<۰/۰۵). به نظر می‌رسد با گذشت زمان غلظت بالای دگزامتازون سبب این کاهش می‌شود. اما افزایش در تیمار ۲، ۳ و ۴ نسبت به تیمار ۱ می‌تواند ناشی از اثر غلظت پایین دگزامتازون همراه با مورفین باشد. اختلاف میان تیمار ۱ گروه‌هایI و II معنی دار بود (p<۰/۰۵). مقایسه بین گروه‌های I و II نشان داد که تیمار ۱ گروه I با تیمار ۶ گروه II از نظر آماری دارای اختلاف معنی دار نبود اما با بقیه تیمارها اختلاف معنی دار بود (p<۰/۰۵). ۲۴ ساعت پس از تیمار سلول‌ها اختلاف بیشتری در میزان زنده ماندن سلول‌ها در هر دو گروه بین تیمارها دیده شد. میزان زنده ماندن سلول‌ها در گروه I در

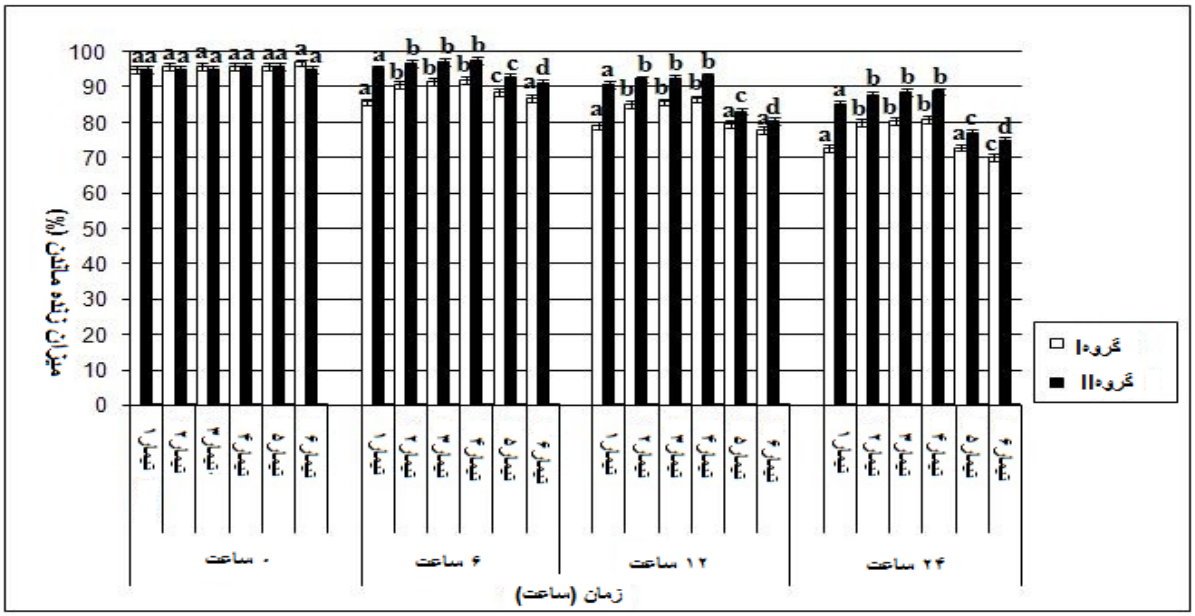
تیمارهای ۱ تا ۶ به ترتیب ۷۲/۸۳٪، ۸۰٪، ۸۰/۴۲٪، ۸۱٪، ۷۳٪ و ۷۰/۲۵٪ بود. کاهش شدید میزان زنده ماندن سلول‌ها در تیمارهای ۵ و ۶ می‌تواند ناشی از اثر تخریبی غلظت‌های بالای دگزامتازون در محیط کشت باشد. اما تیمارهای ۲ تا ۴ که غلظت پایین دگزامتازون دریافت کرده بود میزان زنده ماندن سلول‌ها نسبت به تیمار ۱، ۵ و ۶ افزایش نشان داد که از نظر آماری اختلاف معنادار بود، اما میزان زنده ماندن سلول‌ها در تیمار ۵ نسبت به تیمار ۱ از نظر آماری اختلاف معنی دار نبود (p<۰/۰۵). میزان زنده ماندن سلول‌ها در گروه II در تیمارهای ۱ تا ۶ به ترتیب ۸۵/۰۸٪، ۸۷/۸۳٪، ۸۸/۵٪، ۸۸/۹۲٪، ۷۷/۲٪ و ۷۵٪ بود. تیمارهای ۲ تا ۴ میزان زنده ماندن سلول‌ها نسبت به تیمار ۱ افزایش نشان داد (p<۰/۰۵). این افزایش می‌تواند ناشی از حضور غلظت پایین دگزامتازون همراه با مورفین در محیط کشت باشد. تیمارهای۵ و ۶ در این گروه میزان زنده ماندن سلول‌ها نسبت به تیمار ۱ کاهش نشان داد که از نظرآماری اختلاف معنی دار بود (p<۰/۰۵). این کاهش می‌تواند ناشی از اثر غلظت بالای دگزامتازون در محیط کشت باشد. مقایسه بین گروه‌های I و II نشان داد که تیمار ۱ گروه I با تیمار ۶ گروه II از نظر آماری دارای اختلاف معنی دار نبود اما با بقیه تیمارها اختلاف معنی دار بود (p<۰/۰۵). تیمار ۵ و ۶ از هر دو گروه کاهش شدیدی نشان دادند که می تواند به علت افزایش غلظت دگزامتازون باشد اما این کاهش در گروه II که در معرض مورفین هم بودند کمتر بود (نمودار ۱).

اثر دگزامتازون بر نوریت زایی سلول ها: میزان طول کل نوریت‌های سلول‌های PC12 در هر یک از دو گروه مورد مطالعه در زمان‌های ۶ ، ۱۲ و ۲۴ ساعت بررسی شد. ۶ ساعت پس از تیمار سلول‌ها میزان TNL سلول‌ها در گروه I در تیمار ۱ تا ۶ به ترتیب ۱۴۸/۷۰±۲/۳۷، ۸۵/۰۶±۱/۶۱، ۸۸/۳۸±۱/۵۸، ۹۱/۰۵±۱/۶۶، ۷۲/۸۲±۱/۳۲ و ۶۹/۱۸±۱/۱۸ میکرومتر (μM) بود. تیمارهای ۲ تا ۶ که دگزامتازون دریافت کرده بود، TNL سلول‌ها نسبت به تیمار۱ کاهش شدیدی نشان دادند که از نظر آماری اختلاف معنی دار بود (p<۰/۰۵). این کاهش می‌تواند ناشی از افزودن دگزامتازون به محیط کشت باشد. مقایسه بین تیمارهای ۲ تا ۶ نشان داد که تیمارهای ۲ ، ۳ و ۴ با هم دارای اختلاف معنی دار نیستند اما با تیمارهای ۵ و ۶ از نظر آماری اختلاف معنی دار بود (p<۰/۰۵) (شکل۱).

میزان TNL سلول‌ها در گروه II در تیمار ۱ تا ۶ به ترتیب ۱۶۴/۲۲±۴/۴۵، ۱۰۵/۱۹±۲/۸۴، ۱۰۸/۳۳±۳/۰۹، ۱۴۹/۴۶±۴/۰۴، ۱۱۷/۶۰±۳/۰۸ و ۱۱۵/۲۴±۲/۷۳ میکرومتر (μM) بود. به نظر می‌رسد افزایش میزان TNL در تیمار ۱ ناشی از اثر مورفین باشد. میزان TNL سلول‌ها در تیمارهای ۲ تا ۶ این گروه نسبت به تیمار ۱ کاهش نشان داد که از نظر آماری اختلاف معنی دار بود (p<۰/۰۵). مقایسه بین تیمارهای ۲ تا ۶ نشان داد که تیمارهای ۲ ، ۳، ۵ و ۶ با هم دارای اختلاف معنی دار نیستند اما با تیمار۴ از نظر آماری اختلاف معنی دار بود (p<۰/۰۵) (شکل۲). مقایسه بین گروه‌های I وII نشان داد افزایش میزان TNL سلول‌ها در تیمار۱ گروه II نسبت به تیمار۱ گروه I می‌تواند ناشی از اثر مورفین باشد. از نظر آماری میزان TNL سلول‌های تیمار ۱ در دو گروه دارای اختلاف معنی دار بود (p<۰/۰۵). میزان TNL سلول‌های تیمار۱ در گروه II در مقایسه با تیمارهای ۲ تا ۶ گروه I بیشتر بود (p<۰/۰۵). با توجه به اینکه تیمار۱ گروه II در شرایط کمبود دگزامتازون بوده‌اند به نظر می‌رسد این افزایش میزان TNL سلول‌ها ناشی از اثر مورفین و کمبود دگزامتازون است. اما، میزان TNL سلول‌های تیمار ۱ در گروه I در مقایسه با تیمارهای ۲، ۳، ۵ ، ۶ گروه II بیشتر است و دارای اختلاف معنی دار است ولی با تیمار ۴ اختلاف معنی دار وجود ندارد. باتوجه به اینکه تیمار ۱ گروه I در شرایط کمبود دگزامتازون بوده‌اند به نظر می‌رسد این افزایش میزان TNL سلول‌ها ناشی از کمبود دگزامتازون است و در تیمار ۴ دگزامتازون اثر چندانی روی این افزایش میزان TNL سلول‌ها نگذاشته است و سبب کاهش آن نشده است. در تیمارهای ۲ تا ۶ گروه II میزان TNL سلول‌ها نسبت به تیمارهای ۲ تا ۶ گروه I افزایش نشان داد که ناشی از اثر دگزامتازون همراه با مورفین بر سلول‌ها است و از نظر آماری دارای اختلاف معنی دار بود (p<۰/۰۵).

۱۲ ساعت پس از تیمار سلول‌ها اندازه TNL سلول‌ها در گروه I برای تیمارهای ۱ تا ۶ به ترتیب ۱۲۳/۶۰±۲/۷۰، ۷۹/۰۲±۱/۵، ۸۲/۸۹±۱/۶۰، ۸۷/۳۰±۱/۵۶، ۶۸/۶۶±۱/۳۹ و ۶۳/۹۶±۰/۹۷ میکرومتر (μM) بود. کاهش بیشتر TNL در تیمارهای ۲ تا ۶ نسبت به تیمار ۱ دیده شد و همچنان اختلاف معنی دار بود (p<۰/۰۵) که نشان‌دهنده اثر تخریبی بیشتر دگزامتازون با گذشت زمان است. میزان TNL سلول‌ها در گروه II برای تیمارهای ۱ تا ۶ به ترتیب ۱۴۰/۳۶±۴/۲۱، ۹۲/۹۵±۲/۱۴، ۹۴/۵۱±۲/۵۰، ۱۲۶/۸۶±۴/۰۵، ۹۶/۰۸±۱/۹۷ و ۹۴/۸۳±۲/۹۹ میکرومتر (μM) بود که اختلاف مشاهده شده از نظر آماری معنی دار بود (p<۰/۰۵). مقایسه بین تیمارهای ۲ تا ۶ نشان داد که تیمارهای ۲، ۳، ۵ و ۶ با هم دارای اختلاف معنی دار نبودند اما با تیمار ۴ از نظر آماری دارای اختلاف معنی دار بودند (p<۰/۰۵). مقایسه بین گروه‌های I وII نشان داد میزان TNL سلول‌های تیمار ۱ در گروه II در مقایسه با تیمار ۱ گروه I بیشتر بود. با توجه به اینکه هر دو تیمار۱ گروه‌های I و II در شرایط کمبود دگزامتازون بوده‌اند به نظر می‌رسد این افزایش میزان TNL سلول‌ها ناشی از اثر مورفین است. از نظر آماری میزان TNL سلول‌های تیمار۱ در دو گروه دارای اختلاف معنی دار بود (p<۰/۰۵). در تیمارهای ۲ تا ۶ گروه II میزان TNL سلول‌ها نسبت به تیمارهای ۲ تا ۶ گروه I افزایش نشان داد که ناشی از اثر دگزامتازون همراه با مورفین بر سلول‌ها است و از نظر آماری دارای اختلاف معنی دار بود (p<۰/۰۵). مقایسه بین تیمارهای ۲ تا ۶ گروه I با تیمار ۱ گروه II نشان داد میزان TNL سلول‌های تیمارهای ۲ تا ۶ گروه I در مقایسه با تیمار ۱ گروه II کمتر بود که از نظر آماری دارای اختلاف معنی دار بود (p<۰/۰۵). مقایسه بین تیمارهای ۲ تا ۶ گروه II با تیمار ۱ گروه I نشان داد میزان TNL سلول‌های تیمارهای ۲، ۳، ۵ و ۶ گروه I در مقایسه با تیمار ۱ گروه II کمتر بود و از نظر آماری دارای اختلاف معنی دار بود (p<۰/۰۵). اما تیمار۴ نسبت به تیمار ۱ گروه I افزایش اندکی نشان داد که از نظر آماری دارای اختلاف معنی دار نبود. میزان TNL سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت در گروه I در تیمارهای ۱ تا ۶ به ترتیب ۹۲/۰۰۲±۲/۰۸، ۷۲/۸۶±۱/۰۲، ۷۴/۰۳±۱/۰۸، ۸۱/۵۶±۱/۶۸، ۶۳/۵±۱/۱۱ و ۵۹/۴±۰/۹۱ میکرومتر (μM) بود. مقایسه بین تیمارهای ۲ تا ۶ نشان داد که تیمار ۲ و ۳ دارای اختلاف معنی دار نبودند و تیمارهای ۵ و ۶ از نظر آماری با هم دارای اختلاف معنی دار نبودند اما با تیمار ۲ و ۳ دارای اختلاف معنی دار بودند و تیمار ۴ با همه دارای اختلاف معنی دار بود (p<۰/۰۵). میزان TNL سلول‌ها در گروه II در تیمارهای ۱ تا ۶ به ترتیب ۱۲۱/۰۵±۳/۶۱، ۸۵/۰۱±۲/۲۱،

۸۷/۱۳±۲/۳۲، ۱۱۱/۱۶±۳/۹۸، ۸۸/۷۰±۲/۱۳ و ۸۷/۴۵±۱/۹۰ میکرومتر(μM) بود. که تیمار ۱ با تیمار ۴ و همچنین تیمارهای ۲، ۳، ۵ و ۶ دارای اختلاف معنی دار نیستند. اما تیمارهای ۱ و ۴ با بقیه تیمارها دارای اختلاف معنی دار هستند (p<۰/۰۵). مقایسه بین گروه I و II نشان داد تیمار ۱ گروه II نسبت به تیمار ۱ گروه I کاهش کمتری در طول نوریت‌ها نشان داد. تیمارهای ۲ تا ۶ گروه II نسبت به تیمارهای ۲ تا ۶ گروه I افزایش طول نوریت‌ها دیده شد که از نظر آماری اختلاف معنی دار بود (p<۰/۰۵). مقایسه بین تیمارهای ۲ تا ۶ گروه II با تیمار ۱ گروه I نشان داد که تیمار ۴ گروه II نسبت به تیمار ۱ گروه I میزان TNL افزایش داشته و از نظر آماری اختلاف معنی دار بود (p<۰/۰۵). اما با تیمارهای دیگر از نظر آماری اختلاف معنی دار نبود (نمودار۲).

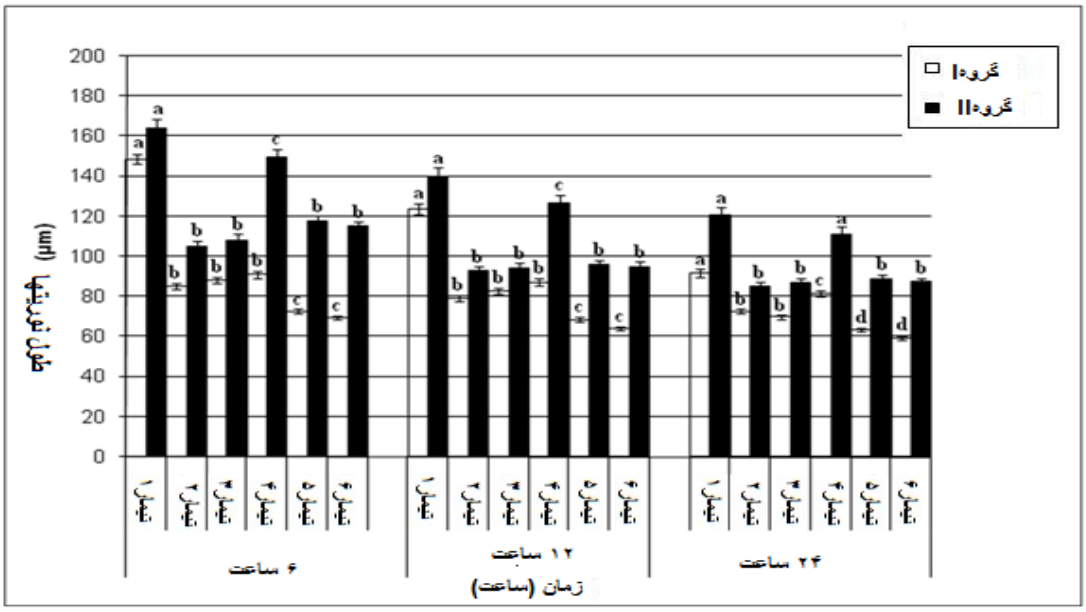


نمودار ۱. اثر دگزامتازون بدون مورفین و همراه با مورفین بر میزان زنده ماندن سلول‌های PC12 در زمان‌های مختلف.

گروه I غلظت‌های مختلف دگزامتازون بدون مورفین، گروه II غلظت‌های مختلف دگزامتازون با مورفین

تیمار۱ : غلظت ۰ نانو مولار دگزامتازون، تیمار۲ : ۱ nM دگزامتازون، تیمار۳ : ۱۰ nM دگزامتازون، تیمار۴ : ۱۰۰ nM دگزامتازون، تیمار۵ : ۱μM دگزامتازون و تیمار۶ : ۱۰ μM دگزامتازون.

a, b ,c ,d : مقایسه تیمارها بشکل درون گروهی و ستون‌هایی با نمادهای مختلف دارای اختلاف معنادار هستند(ANOVA , P<0.05).

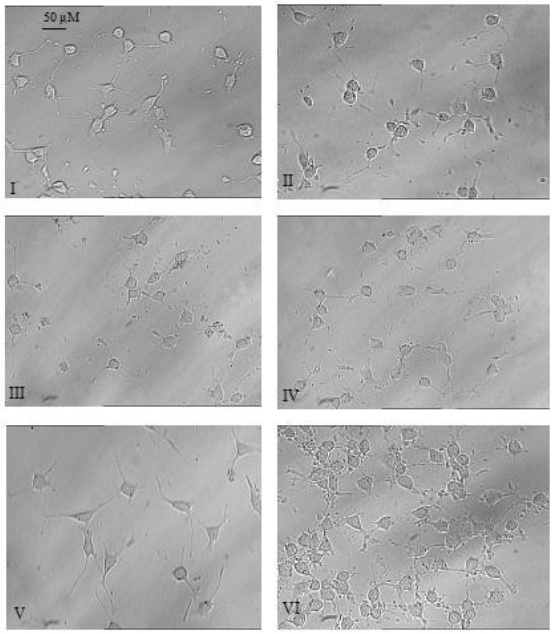


نمودار ۲. اثر دگزامتازون بدون مورفین و همراه با مورفین بر مورفولوژی (طول نوریتها برحسب میکرومتر) سلول‌های PC12 در زمان‌های مختلف.

گروهI غلظت‌های مختلف دگزامتازون بدون مورفین، گروهII غلظت‌های مختلف دگزامتازون با مورفین

تیمار۱ : غلظت ۰ نانو مولار دگزامتازون، تیمار۲ : ۱ nM دگزامتازون، تیمار۳ : ۱۰ nM دگزامتازون، تیمار۴ : ۱۰۰ nM دگزامتازون، تیمار۵ : ۱μM دگزامتازون و تیمار۶

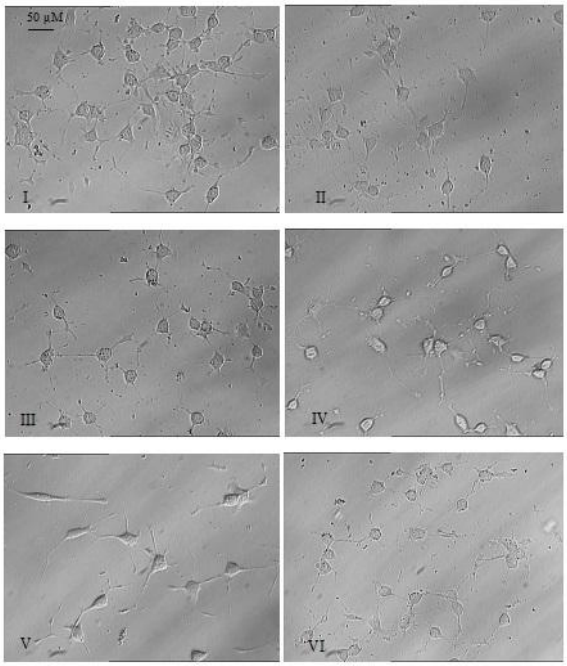
a, b ,c ,d : مقایسه تیمارها بشکل درون گروهی و ستون‌هایی با نمادهای مختلف دارای اختلاف معنی دار هستند (ANOVA , P<0.05).



شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف دگزامتازون بدون مورفین بر ایجاد زواید نرونی (نوریت) در سلول های PC12

(Scale Bar =50µm)

I: 0 nMدگزامتازون، II: ۱ nM دگزامتازون، III: ۱۰ nM دگزامتازون، IV: ۱۰۰ nM دگزامتازون، V: ۱µM دگزامتازون و VI: ۱۰ µM دگزامتازون.



شکل ۲. اثر غلظت‌های مختلف دگزامتازون در حضور غلظت ۱۰ پیکومولار مورفین بر ایجاد زواید نرونی (نوریت) در سلول های PC12

(Scale Bar =50µm)

I: 0 nM دگزامتازون، II: با ۱ nM دگزامتازون، III: با ۱۰ nM دگزامتازون، IV: با ۱۰۰ nM دگزامتازون، V: با ۱µM دگزامتازون و VI: با ۱۰ µM دگزامتازون.

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق مشخص شد که غلظت های پایین مورفین منجر به مهار مرگ سلولی و کوتاه شدن طول نوریت ها توسط دگزامتازون در سلول های PC12 می شود. سلول‌های PC12 بسته به محرک محیطی می‌توانند به نورون‌های سمپاتیک تمایز یابند و یا ویژگی‌های سلول‌های کرومافینی را بیان کنند (۲۳). Sadri و همکاران دوز تمایزی اپتیمم استئوروسپورین که بدون ایجاد آپوپتوز، صرفاً تمایز را در سلول‌های PC12 سبب شود ۲۱۴ نانومولار تعیین کردند (۲۴). اپیوئیدها رشد نوریت را in vivo و in vitro تحت تاثیر قرار می‌دهند. مورفین (به واسطه رسپتورش) اثرات متفاوت تحریکی یا مهاری (بسته به دوز) روی نورون‌زایی PC12 دارند. تزریق پیش از تولدمورفین کاهش رشد دندریت در کورتکس مغزی رت را القا می‌کند، همچنین منشعب شدن نوریت‌ها در مغز کشت شده جنین جوجه و طول دندریت‌های سلول پورکینژ را کاهش می‌دهد (۲۵). اپیوئیدها بر تکوین، تمایز، نوریت‌زایی و آپوپتوز تاثیر دارند. اپیوئیدها اثر دو گانه وابسته به غلظت روی نوریت‌زایی دارند. بطوریکه غلظت بالا (۱ mM) طویل شدن نوریت در PC12، نورون‌های گرانولی مغزی و نورون‌های هیپوکامپ را مهار می‌کند. اما غلظت‌های پایین مورفین (۱ pM) در PC12 رشد نوریت را در حضور NGF افزایش می‌دهد (۲۶). نتایج نشان داده اند که غلظت‌های $۱۰^{-۱۴}$ و $۱۰^{-۹}$ مولار رشد نوریت‌ها را در سلول‌های طناب نخاعی کشت شده افزایش میدهد، ولی غلظت‌های پیکومولار در سلول‌های PC12 رشد نوریت‌ها را افزایش می‌دهد (۲۵). همچنین مشخص شده است که مورفین قادر به تحریک کانال‌های کلسیمی و افزایش روند ورود کلسیم به داخل سلول و نیز القای مرگ سلولی به واسطه افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی است. باید توجه داشت که یون کلسیم عامل اصلی در توسعه و تمایز سیستم‌های بیولوژیکی از جمله بهبود عملکرد نورون‌ها است و انتقالات داخل سلولی یون کلسیم می‌تواند باعث ایجاد تمایز در شرایط کشت شود. این خود می‌تواند باعث تسریع یا کاهش سرعت طویل شدن آکسون‌ها گردد (۲۷).

برخی یافته‌ها پیشنهاد می‌کنند که مورفین برای نورون‌ها توکسیک است و آپوپتوز را القا می‌نماید در حالی‌که برخی شواهد دیگر نشان می‌دهند که مورفین می‌تواند تأثیرات سودمندی بر علیه مرگ سلولی داشته باشد (۲۸). در غلظت‌های بالا (۱۰mM-۱۰Mµ) مورفین رشد زواید نورونی را در کشت‌های اولیه نورونهای گرانول مخچه‌ای و هیپوکامپ، در یک مدل وابسته به نالوکسون مهار می‌کند. در حالی که غلظت‌های مورفین بین ۱۰ nM و ۱۰ pM، رشد زواید نورونی را در نورون‌های کورتکس و نخاع تا بیش از ۲۰٪ افزایش می‌دهد و غلظت‌های پایین‌تر از ۱۰ پیکومولار مورفین افزایش طول زواید نورونی را در رده سلولی PC12 تحریک می‌کند. از آنجاییکه این اثرات به وسیله نالوکسون برگشت پذیر نیستند، پیشنهاد می‌کنند که به وسیله رسپتورهای خاصی با تمایل بالا میانجی می‌شوند (۲۵).

در تحقیق حاضر برای دست‌یابی به روشی که تاثیر دگزامتازون برسلولهای دستگاه عصبی را نشان دهد سلول‌های PC12 در حضور استئورسپورین با غلظت‌های مختلف دگزامتازون بدون مورفین و یا درحضور غلظت $۱۰^{-۱۰}$ مولار (۱۰۰پیکو مولار) مورفین تیمار و اثرات آن بر میزان بقاء سلولی و طول کل نوریت‌های یک سلول اندازه‌گیری شد.

نتایج قبلی نشان دادند که دگزامتازون (در غلظت‌های خیلی پائین) به طور مستقیم تکوین عصبی را در مراحل نسخه برداری و رشد سلول، تمایز اولیه، تشکیل نوریت‌ها و تخصصی شدن فنوتیپ تحت تاثیر قرار می‌دهد (۲۹). BDNF از خانواده فاکتورهای نروتروفیک (شامل فاکتور رشد عصبی، نروتروفین ۳ ، ۴ و ۵) هستند که سبب تمایز و تکوین نورون‌ها در سیستم عصبی می‌شوند (۳۰). Yu و همکاران نشان دادند که غلظت ۲ میکرومولار کورتیکواسترون بیان BDNF و نروتروفین ۳ را در هیپوکامپ کاهش داده، همچنین کورتیکواسترون در یک حالت وابسته به دوز فعالیت‌های ERK و CREB را کاهش داده که این مسیرهای مهمی در تمایز و رشد نوریت‌ها می‌باشند (۳۱). قرارگیری سلولهای در حال تمایز PC12 با NGF در معرض غلظت۰/۱ میکرومولار دگزامتازون نسبت پروتئین غشای کل را کاهش داده و اثرات مهاری روی رشد نوریت‌ها را سبب می‌شود، اما بقای سلول را افزایش می‌دهد (۲۹).

در این مطالعه با بررسی طول نوریت‌ها در سلول‌هایی که در معرض دگزامتازون بدون مورفین بودند، نشان داد که در مقایسه با زمانی که مورفین به کار برده شد سلول‌ها زواید سلولی کوتاه‌تر ایجاد کردند. مقایسه میان سلول‌هایی که در معرض دگزامتازون همراه با مورفین بودند نیز نشان داد که مورفین طول نوریت‌ها را افزایش داده و سبب طویل شدن آن‌ها می‌گردد، اما حضور دگزامتازون سبب کاهش طول نوریت‌ها شده و سبب جمع شدن آن‌ها می‌گردد. مقایسه گروه‌های مورد مطالعه نشان داد مورفین توانسته اثر ناشی از دگزامتازون که سبب تخریب سلول‌ها شده است، را تا حدودی جبران کند. شواهد نشان داده است که دگزامتازون عصب‌زایی را در in vivo وin vitro مهار می‌کند (۳۲). گرچه تنها ۲۰-۱۰ درصد سلول‌های پیش‌ساز در ژیروس دندانه‌دار (GD) رسپتور گلوکوکورتیکوئید و مینرالوکورتیکوئید را بیان می‌کنند، و این احتمال وجود دارد که اثر استرس روی عصب‌زایی به طور مستقیم روی این سلول‌های پیشگام رخ می‌دهد (۳۳). مشاهدات نشان داده است که $۱۰^{-۲}$-$۱۰^{-۶}$ مولار دگزامتازون تکثیر سلولی در سلول‌های HT-108 و فیبروبلاست‌ها را مهار می‌کند (۳۴).

در این تحقیق پس از تیمار سلول های PC12 توسط غلظت‌های مختلف دگزامتازون به تنهایی و یا در حضور غلظت $۱۰^{-۱۰}$ مولار (۱۰۰ پیکو مولار) مورفین بررسی اثر غلظت‌های مختلف دگزامتازون روی این سلول ها با یک دید مورفولوژیکی- عملکردی انجام شد. به طوری‌که پس از بررسی درصد بقای سلولها و مقایسه آنها در گروه‌های مورد بررسی، اثرات غلظت‌های مختلف دگزامتازون بر میزان زنده ماندن سلول‌ها و مورفولوژی سلول‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. این تحقیق نشان داد که استفاده از غلظت‌های پایین دگزامتازون (۱nM، ۱۰nM، ۱۰۰ nM) برای سلول‌هایی که در معرض مورفین قرارگرفته بودند میزان زنده ماندن سلول‌ها را تا حد زیادی نسبت به گروه در معرض دگزامتازون و بدون مورفین افزایش داده است. به نظر می‌رسد با بازسازی اسکلت سلولی و شکل‌دهی دوباره ماتریکس خارج سلولی توان بقاء سلول‌ها را تشدید کرده است.

در آزمایش درصد زنده ماندن سلول‌ها که اساس آن بر نفوذ پذیری سلولهای مرده به رنگ‌های حیاتی تریپان بلو، در اثر پارگی یا آسیب غشا سلول است، و پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف دگزامتازون بدون مورفین و همراه با مورفین درصد زنده ماندن سلول‌ها در بازه‌های زمانی ۰، ۶، ۱۲ و۲۴ ساعت انجام شد. درصد زنده ماندن سلول‌ها در سلول‌های تحت تیمار با غلظتهای پایین دگزامتازون و مورفین بیشتر از ۹۵ درصد بود اما در غلظت‌های بالای دگزامتازون (۱μM، ۱۰μM) درصد زنده ماندن سلول‌ها کمتر از ۹۵ درصد بود. این مساله مبین اینست که غلظت‌های پایین دگزامتازون همراه با مورفین درصد زنده ماندن سلول‌ها را افزایش داده اما غلظت‌های بالای دگزامتازون سبب کاهش درصد زنده ماندن سلول‌ها شده است. اما کاهش درصد زنده ماندن سلول‌ها در غلظت‌های بالای دگزامتازون نقش تخریب عصبی این ماده را نشان می‌دهد. مقایسه میان سلول‌ها نشان دادکه غلظت‌های مختلف دگزامتازون در گروه I به شدت طول نوریت‌ها را در تمام فواصل زمانی آزمایش در طی ۲۴ ساعت کاهش داده و سبب جمع شدن آن‌ها می‌گردد که این امر اثرات غلظت‌های مختلف دگزامتازون در جمع شدن نوریت‌ها را تائید کرد. اما در گروه II طول نوریت‌ها نسبت به گروه I افزایش نشان داد که مبین اینست که استفاده از مورفین این اثر تخریبی را تا حدی جبران می‌کند.

این نتایج نشان می دهد که از مورفین می توان به عنوان یک عامل کمکی- حفاظتی موثر در بهبود و مهار اثرات تخریبی دگزامتازون در سلول های عصبی استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت مالی و مشارکت گروه زیست شناسی دانشگاه رازی کرمانشاه تشکر و قدردانی بعمل می آید.

Protective Effects of Morphine Low Concentration on Dexamethasone-Induced Cell Death in Differentiated PC12 Cells

S. Najmi-Nejad (MSc) [1], H. Zhaleh (MSc) [1], M. Azadbakht (PhD) [1]*

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran

J Babol Univ Med Sci; 15(5); Sep 2013; pp: 7-16

Received: Feb 26th 2013, Revised: May 1st 2013, Accepted: Jul 10th 2013.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Glucocorticoids as powerful agents that effect on cell growth, differentiation and cell death are in throughout life. Morphine at low concentration stimulates process elongation in neurons. In this study we examined the effects of low concentrations of morphine on dexamethasone induced-cell death in differentiated PC12 cells.

METHODS: PC12 cells were cultured in RPMI 1640 culture medium containing 1% FBS, 2 mμ L-glutamin, 1% NEAA and 1% antibiotic penicillin/stereptomycine. Cells were treated with different concentrations of dexamethasone in the presence of 214 nM staurosporine as neuronal differentiated agent. PC12 cells were divided into two groups; group I, treatment with different concentrations of dexamethasone without morphine and group II, treatment with different concentrations of dexamethasone together with morphine (10^{-10} M). There were six treatments in each group: treatment 1 without (0 nM) dexamethasone and treatments 2 to 6 with adding 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1μM and 10 μM dexamethasone in culture medium, respectively.

FINDINGS: Our results showed that the cell viability was increased in group I, treatments 2, 3 and 4 and was decreased in treatments 1 and 5 and 6 ($p<0.05$). Cell viability was increased in group II, treatments 1, 2, 3 and 4, and was decreased in treatments 5 and 6 ($p<0.05$). Total neurite length in group I treatments 1-6 was decreased (148.70±2.37, 85.06±1.61, 88.38±1.58, 91.05±1.66, 72.82±1.32 and 69.18±1.18 μm) respectively ($p<0.05$). In group I treatments 1 and 6 had highest and lowest total neurite length, respectively ($p<0.05$). Total neurite length in group II treatments 1-6 were 164.22±4.45, 105.19±2.84, 108.33±3.09, 149.46±4.04, 117.60±3.08 and 115.24±2.73 μm, respectively. In group II treatment 1 had highest and treatments 2 and 3 had lowest total neurite length ($p<0.05$).

CONCLUSION: It is concluded that low concentrations morphine enhances neurite elongation and viability in PC12 cells.

KEY WORDS: *Dexamethasone, Morphine, Neurite elongation, PC12 cells.*

***Corresponding Author;**
Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, Razi University, Bagh-e-Abrisham St., Kermanshah, Iran
Tel: +98 831 4274545
E-mail: azadbakhtm_tmu@yahoo.com

References

1.Feldman BJ. Glucocorticoids influence on mesenchymal stem cells and implications for metabolic disease. Pediatr Res 2009;65(2):249-51.

2.Edwards HE, Burnhaw WM. The impact of corticosteroids on the developing animal. Pediatr Res 2001;50(4):433-440.

3.Gaillarde EA, Cooke RWI, Shaw NJ. Improved survival and neurodevelopmental outcome after prolonged ventilation inpreterm neonates who have received antenatal steroids and surfactant. Arch Dis Child Fetal neonatal Ed 2001;84(3):194-6.

4.Clark A, Mitre M, Brinck-Johnsen T. Anabolic-androgenic steroid and adrenal steroid effects on hippocampal plasticity. Brain Res 1995;679(1):64-71.

5.Flagel SB, Vazques DM, Watson SJ, Neal CR. Effect of tapering neonatal dexamethasone on rat growth neurodevelopmental and stress response. Am J Physiol Requl Integr Comp Physiol 2002;282(1):R55-63.

6.Abraham IM, Harkany T, Horvath KM, Luiten PGM. Action of glucocorticoids on survival of nerve cells: promoting neurodegeneration or neuroprotection? J Neuroendocrinol 2001;13(9):749-60.

7.McEwen BS. Stress and hippocampal plasticity. Annu Rev Neurosci 1999;22:105-22.

8.Lambroso PJ, Sapolsky R. Development of the cerebral cortex: XII. Stress and brain development: I. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 1998;37(12):1337-9.

9.Lee AL, Ogle W, Sapolsky RM. Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. Bipolar Disord 2002;4(2):117-28.

10.Huang WL, Harper CG, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA. Repeated prenatal corticosteroids administration delays astrocyte and capillary tight junction maturation in fetal sheep. Int J Dev Neurosc 2001;19(5):487-93.

11.Behl C, Lezoualc'h F, Trapp T, Widmann M, Skutella T, Holsboer F. Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons in vitro. Endocrinology 1997;138(1):101-6.

12.Trescot A, Datta S, Lee M, Hansen H. Opioid pharmacology. Pain Physician 2008;11(Suppl 2):133-53.

13.McCleane G, Smith HS. Opioids for persistent noncancer pain. Med Clin North Am 2007;91(2):177-97.

14.Schafer M, Martin R. Opioid peptides in the pituitary: a hormone, a panacrine modulator and a peptide in search of function. Biol Chem Hoppe Seyler 1994;375(11):737-40.

15.Brown SM, Stimmel B, Taub R, Kochwa S, Rosenfield R. Immunologic dysfunction in heroin addicts. Arch Intern Med 1974;134(6):1001-6.

16.Roy S, Loh H. Effects of opioids on the immune system. Neurochem Res 1996;21(11):1375-86.

17.Minneman KP, Lee D, Zhong H, Berts A, Abbott KL, Murphy TJ. Transcriptional responses to growth factor and G protein-coupled receptors in PC12 cells: Comparison of 1- adrenergic receptor subtypes. J Neurochem 2000; 74(6):2392-400.

18.King AJ, Sun H, Diaz B, et al. The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1activity through phosphorylation of serine 338. Nature 1998;396(6707):180-3.

19.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(3):1133-41.

20.Cadet P, Rasmussen M, Zhu W, Tonnesen E, Mantione KJ, Stefano GB. Endogenous morphinergic signaling and tumor growth. Front Biosci 2004;9:3176-86.

21.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(17):7650-61.

22.Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 1976;73(7):2424-8.

23.Smith J, Fauquet M. Glucocorticoids stimulate adrenergic differentiation in culture of migration and premigratory neural crest. J Neurosci 1984;4(8):2160-72.

24.Sadri S, Davary-Zanjani M, Azadbakht M, Amini A, Hil M. Investigation of apoptosis induction in differentiated PC12 cells after exposure to hydrostatic pressure. Yakhteh, Cell J 2008;10(2):129-36.

25.Tenconi B, Lesma E, DiGiulio AM, Gorio A. High opioid doses inhibit whereas low doses enhance neuritogenesis in PC12 cells. Brain Res Dev Brain Res 1996;94(2):175-81.

26.Liu H, McPherson BC, Yao Z. Preconditioning attenuates apoptosis and necrosis: role of protein kinase C epsilon and -delta isoforms. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001;281(1):404-10.

27.Schneggenburger R, Neher E. Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse. Nature 2000;406(6798): 889-93.

28.Chen Q, Cui J, Zhang Y, Yu LC. Prolonged morphine application modulates Bax and Hsp70 levels in primary rat neurons. Neurosci Lett 2008; 441:311-14.

29.Jameson RR, Seidler FJ, Qiao D, Slotkin TA. Adverse neurodevelopmental effects of dexamethasone modeled in pc12 cells: identifying the critical stages and concentration thresholds for the targeting of cell acquisition, differentiation and viability. Neuropsychopharmacology 2006;31(8):1647-58.

30.Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. Science 1995;270(5236):593-8.

31.Yu IT, Lee SH, Lee YS, Son H. Differential effects of corticosterone and dexamethasone on hippocampal neurogenesis in vitro. Biochem Biophys Res Commun 2004;317(2):484-90.

32.Kim JB, Ju JY, Kim JH, et al. Dexamethasone inhibits proliferation of adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro. Brain Res 2004;1027(1-2):1-10.

33.Garcia A, Steiner B, Kronenberg G, Bick-Sander A, Kempermann G. Age-dependent expression of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors on neural precursor cell populations in the adult murine hippocampus. Aging Cell 2004;3(6):363-71.

34.Walker MJ, Lim C, Das Gupta TK, Beattie CW. Effects of glucocorticoids on the growth of human fibrosarcoma cell line HT-10801. Cancer Res 1986;46(10):4927-4.