

## نقش حفاظتی غلظت های پایین مورفین بر اثرات مرگ سلولی القا شده دگرامتازون در سلول های تمایز یافته PC12

سعید نجمی نژاد<sup>۱</sup> (MSc)، حسین ژاله<sup>۱</sup> (MSc)، مهری آزادبخت<sup>۱\*</sup> (PhD)

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 سلول های عصبی تحت تاثیر قرار می دهند. از طرفی در کشت های اولیه نورون ها در غلظت های پایین طول زواید نورونی را افزایش می دهند. در این تحقیق اثر غلظت های پایین مورفین بر مهار مرگ سلولی القا شده توسط دگرامتازون بر سلول های تمایز یافته PC12 بررسی شد.

**مواد و روش ها:** در این تحقیق اثر غلظت های مختلف دگرامتازون ( $10^{-10}$  M،  $10^{-9}$  M،  $10^{-8}$  M،  $10^{-7}$  M،  $10^{-6}$  M،  $10^{-5}$  M،  $10^{-4}$  M،  $10^{-3}$  M،  $10^{-2}$  M،  $10^{-1}$  M) بدون مورفین و همراه با مورفین ( $10^{-10}$  M) بر سلول های PC12 مورد بررسی قرار گرفت و میزان زنده ماندن سلول ها و طول کل نوریت ها ارزیابی شد. سلول های PC12 در محیط کشت RPMI1640، ۱٪ FBS، ۱٪ پنی سیلین/استروپتومایسین، ۲ میلی مولار L-Glutamin و ۱٪ NEAA در حضور غلظت ۲۱۴ nM استورسپورین بعنوان عامل تمایز دهنده عصبی کشت داده شدند. سلول های تمایز یافته در دو گروه مطالعه شدند. سلول ها در گروه I با غلظت های مختلف دگرامتازون بدون مورفین و در گروه II با غلظت های مختلف دگرامتازون همراه با غلظت  $10^{-10}$  M مورفین تیمار شدند. در هر گروه شش تیمار وجود داشت. تیمار ۱ بدون دگرامتازون و به تیمارهای ۲ تا ۶ غلظت های مختلف دگرامتازون ( $10^{-10}$  M،  $10^{-9}$  M،  $10^{-8}$  M،  $10^{-7}$  M،  $10^{-6}$  M،  $10^{-5}$  M،  $10^{-4}$  M،  $10^{-3}$  M،  $10^{-2}$  M،  $10^{-1}$  M) به ترتیب اضافه شده و میزان زنده ماندن سلول ها مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

**یافته ها:** میزان زنده ماندن سلول ها در گروه I در تیمارهای ۲، ۳ و ۴ به 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 سلول ها مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). طول نوریت ها در گروه I در تیمارهای ۱ تا ۶ به ترتیب  $148/7 \pm 2/37$ ،  $148/7 \pm 2/37$ ،  $148/7 \pm 2/37$ ،  $148/7 \pm 2/37$ ،  $148/7 \pm 2/37$ ،  $148/7 \pm 2/37$ ،  $148/7 \pm 2/37$ ،  $148/7 \pm 2/37$ ،  $148/7 \pm 2/37$ ،  $148/7 \pm 2/37$  مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). طول نوریت ها در گروه II در تیمارهای ۱ تا ۶ به ترتیب  $148/7 \pm 2/37$ ،  $148/7 \pm 2/37$ ،  $148/7 \pm 2/37$ ،  $148/7 \pm 2/37$ ،  $148/7 \pm 2/37$ ،  $148/7 \pm 2/37$ ،  $148/7 \pm 2/37$ ،  $148/7 \pm 2/37$ ،  $148/7 \pm 2/37$ ،  $148/7 \pm 2/37$  مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). بیشترین طول نوریت ها در تیمار ۱ و کمترین طول نوریت ها در تیمارهای ۲ و ۳ مشاهده شد ( $p < 0.05$ ).

**نتیجه گیری:** نتایج مطالعه نشان داد که غلظت های پایین مورفین سبب بهبود زنده ماندن سلول ها و افزایش طول نوریت ها می شود.

**واژه های کلیدی:** دگرامتازون، مورفین، طول نوریت ها، رده سلولی PC12.

### مقدمه

گلوکوکورتیکوئیدها اثرات عمیقی بر رشد، تمایز و مرگ سلول ارگان ها و بافت ها از جمله مغز و سیستم عصبی دارند. فعالیت های عملکردی گلوکوکورتیکوئیدها به وسیله محیط بافت و سلول اعمال می شود (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 دگرامتازون تیمار شدند ۱۵ درصد ناتوانی تکوین عصبی و عصب زایی در نواحی ویژه مغز رخ می دهند (۳). آزمایش های دیگر نشان داد که قرارگیری زیاد در معرض

گلوکوکورتیکوئیدها اثرات عمیقی بر رشد، تمایز و مرگ سلول ارگان ها و بافت ها از جمله مغز و سیستم عصبی دارند. فعالیت های عملکردی گلوکوکورتیکوئیدها به وسیله محیط بافت و سلول اعمال می شود (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 دگرامتازون تیمار شدند ۱۵ درصد ناتوانی تکوین عصبی و عصب زایی در نواحی ویژه مغز رخ می دهند (۳). آزمایش های دیگر نشان داد که قرارگیری زیاد در معرض

این مقاله حاصل پایان نامه سعید نجمی نژاد دانشجوی رشته علوم جانوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه باشد.

\* مسئول مقاله:

آدرس: کرمانشاه، خیابان باغ ابریشم، دانشگاه رازی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، کد پستی: ۶۷۱۴۹۶۷۳۴۶، تلفن: ۰۸۳۱-۴۲۷۴۵۴۵

email: azadbakhtmu@yahoo.com

سانتیگراد نگهداری شد. این محلول با غلظت  $100 \times$  بعنوان محلول ذخیره تهیه شد. سلول های PC۱۲ از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند و در محیط کشت RPMI1640 (Gipco) همراه با  $2\% (v/v)$  (Bovine Serum Albumin; BSA) و  $1\% (v/v)$  (Nonessential Amino Acids; NEAA) 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 سلول های چسبیده به کف فلاسک کشت سلول به  $70 \times 10^3$  تا  $80 \times 10^3$  درصد رسید، پاساژ سلول ها با استفاده از محلول Trypsin-EDTA  $0.25\%$  درصد انجام شد.

سلول ها به دو گروه تقسیم شدند: گروه I تمایز سلول های PC12 با  $214 \times 10^3$  نانومولار استئورسپورین همزمان تیمار سلول ها با غلظت های مختلف دگزامتازون و بدون مورفین دارای ۶ تیمار که تیمار ۱ همراه با غلظت صفر دگزامتازون، تیمار ۲ همراه با غلظت  $1 \text{ nM}$  دگزامتازون، تیمار ۳ همراه با غلظت  $10 \text{ nM}$  دگزامتازون، تیمار ۴ همراه با غلظت  $100 \text{ nM}$  دگزامتازون، تیمار ۵ همراه با غلظت  $1 \mu\text{M}$  دگزامتازون و تیمار ۶ همراه با غلظت  $10 \mu\text{M}$  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 سلول های PC12 با  $214 \times 10^3$  نانومولار استئورسپورین همزمان تیمار سلول ها با غلظت های مختلف دگزامتازون و با غلظت  $10^{-10}$  مولار (پیکومولار) مورفین دارای ۶ تیمار که تیمار ۱ همراه با غلظت صفر دگزامتازون، تیمار ۲ همراه با غلظت  $1 \text{ nM}$  دگزامتازون، تیمار ۳ همراه با غلظت  $10 \text{ nM}$  دگزامتازون، تیمار ۴ همراه با غلظت  $100 \text{ nM}$  دگزامتازون، تیمار ۵ همراه با غلظت  $1 \mu\text{M}$  دگزامتازون و تیمار ۶ همراه با غلظت  $10 \mu\text{M}$  دگزامتازون بودند.

**تمایز سلول های PC12:** سلول ها با تراکم  $1 \times 10^4$  سلول در میلی لیتر در محیط کشت RPMI حاوی  $2\%$  درصد BSA و در ظروف کشت ۲۴ خانه به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور با دمای  $37^\circ\text{C}$  و دی اکسید کربن ۵ درصد نگهداری شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت (هنگامی که  $50 \times 10^3$  تا  $60 \times 10^3$  درصد کف ظرف کشت با سلول ها پوشیده شده بود) محیط روی سلول ها برداشته شد. سلول ها با PBS شستشو داده شدند و سلول ها در محیط کشت محتوی  $214 \times 10^3$  نانومولار استئورسپورین (Alexis) (دوز مناسب برای تمایز سلولی) با غلظت های مختلف دگزامتازون بدون مورفین و یا همراه با غلظت  $10^{-10}$  مولار (پیکومولار) مورفین در زمان های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت کشت داده شدند.

**میزان زنده ماندن سلول ها:** میزان زنده ماندن سلول های PC12 پس از انجام آزمایش با استفاده از محلول تریپان بلو  $0.4\%$  استفاده شد. رنگ به داخل سلول های آسیب دیده و یا مرده که غشاء آنها دچار پارگی شده است نفوذ می یابد و در نتیجه سلول های مرده بر روی لام نتوبار به رنگ آبی دیده می شوند. این روش برای تعیین اثر غلظت های مختلف دگزامتازون به تنهایی و همراه با مورفین بر میزان زنده ماندن سلول های PC12 انجام گرفت. ارزیابی میزان زنده ماندن نوروها در دو گروه در چهار زمان ۰، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تیمار به ترتیب زیر انجام گرفت:

سلول های PC12 با تراکم  $5 \times 10^5 \text{ cell/ml}$  در ظروف کشت ۲۴ خانه کشت شدند. سپس ظروف کشت به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار گرفتند

ژیروس دنداندار و هم کاهش تحریک پذیری در مکانیسم میانجی شده توسط کلسمیم می شود (میزان آتروفی به مقدار گلوکوکورتیکوئیدها بستگی دارد) (۸). سطح های زیاد گلوکوکورتیکوئیدها سبب اثرات مضر روی هیپوکامپ شامل جمع شدن زوائد دندردی، مهار عصب زایی، کاهش حجم هیپوکامپ و اثرات نوروتوکسیک می شود (۹). در سیستم عصبی مرکزی (CNS) در حال تکوین، گلوکوکورتیکوئیدها اثرات زیان آوری روی سلول های گلیال و نوروها دارند. تحقیقات نشان داد که گلوکوکورتیکوئیدها تمایز و بلوغ نوروها را، همی، الیگودندروسیت و آستروسیت را کند می کنند و تزریق بلند مدت سبب مرگ سلول ها می شود (۱۰). در حالیکه در سیستم عصبی گلوکوکورتیکوئیدها مرگ سلول عصبی را افزایش می دهند (۱۱).

اپوئید اصطلاحی است که به هرنوع ماده درون زا و یا صناعی مولد اثرات شبه مورفینی اطلاق می گردد (۱۳ و ۱۲). عملکردهای اپوئیدها وابسته به تشکیل کمپلکس رسپتور-آگونیست در سطح غشاهای سلولی به وجود می آید. اتصال آگونیست های اپوئیدی 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 اپوئیدی منجر به تنظیم فرآیند های اندوکرینی (۱۷-۱۵) و سیستم ایمنی (۱۹ و ۱۸) می گردد. مورفین علاوه بر اثرات ضد دردی شناخته شده، در تکوین مغز، عصب زایی، تمایز سلولی و آپوپتوز و نیز در شرایط *in vivo* وابسته به دوز مصرفی، مرگ سلولی یا بقا سلول ها را در نوروهای سیستم عصبی مرکزی تعدیل می کند (۲۱ و ۲۰). سال های متمادی است که محققین از سلول های 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. سلول های رده PC12 به عنوان یک مدل بسیار مناسب برای مطالعات نوروبیولوژیک و نوروشیمیایی توسط محققان مورد استفاده قرار می گیرد (۲۲). از طرفی جهت بهبود رشد و پایداری سلول های عصبی و جلوگیری از مرگ سلولی و تخریب این سلول در حضور گلوکوکورتیکوئیدها احتمالاً می توان از موادی مانند اپوئیدها که اثرات ضد آپوپتوزی دارند استفاده کرد. از این رو در این مطالعه با توجه به اثر حفاظتی غلظت های پائین مورفین بر آن شدیم تا اثرات جبرانی شبه فاکتور رشدی این ماده را بر مرگ سلولی القا شده توسط دگزامتازون در کشت سلول های تمایز یافته PC۱۲ مورد مطالعه قرار بدهیم.

## مواد و روشها

**کشت سلول های PC۱۲:** مورفین سولفات از شرکت TEMAD تهیه گردید و محلول ذخیره  $10 \times$  میلی مولار PBS تهیه و در ویال های  $1 \times$  میلی لیتری تقسیم بندی و در دمای  $4-8^\circ\text{C}$  درجه سانتیگراد نگهداری شد. این محلول با غلظت  $100 \times$  بعنوان محلول ذخیره تهیه شد. آمپول  $2 \times$  میلی لیتری دگزامتازون از شرکت داروسازی دارو پخش تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. محلول  $1 \times$  میلی مولار آن تهیه و در ویال های  $1 \times$  میلی لیتری تقسیم بندی و در دمای  $4-8^\circ\text{C}$  درجه

اختلاف معنی دار نیستند اما با تیمارهای ۵ و ۶ از نظر آماری اختلاف معنی دار بود ( $p < 0.05$ ). که نشان‌دهنده اینست غلظت‌های پایین دگزامتازون ( $10\text{ nM}$ )،  $10\text{ nM}$ ،  $100\text{ nM}$  دارای اثر یکسانی بر میزان زنده ماندن سلول‌ها دارند. میزان زنده ماندن سلول‌های PC12 در گروه II در تیمارهای ۱ تا ۶ به ترتیب  $95/33\%$ ،  $96/92\%$ ،  $97/33\%$ ،  $97/58\%$ ،  $93\%$  و  $91/33\%$  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 ( $p < 0.05$ ). اما در تیمار ۵ و ۶ در این گروه میزان زنده ماندن سلول‌ها نسبت به تیمار ۱ کاهش نشان داد ( $p < 0.05$ ). این کاهش می‌تواند ناشی از اثر تخریبی غلظت‌های بالای دگزامتازون ( $1\text{ }\mu\text{M}$ ،  $10\text{ }\mu\text{M}$ ) 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 ( $p < 0.05$ ).

مقایسه بین گروه‌های I و II نشان داد میزان زنده ماندن سلول‌ها در تیمار ۱ گروه I و II به ترتیب  $86\%$  و  $95/33\%$  شد. بنابراین افزایش در تیمار ۱ گروه II دیده شد و این افزایش می‌تواند ناشی از اثر حفاظتی مورفین باشد. از نظر آماری میزان زنده ماندن سلول‌های تیمار ۱ در دو گروه دارای اختلاف معنی دار بود ( $p < 0.05$ ). 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 ( $p < 0.05$ ). مقایسه تیمارهای ۲ تا ۶ گروه II با تیمار ۱ گروه I نشان داد میزان زنده ماندن سلول‌های تیمارهای ۲ تا ۶ گروه II از سلول‌های تیمار ۱ گروه I بیشتر است ( $p < 0.05$ ). 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 ( $p < 0.05$ ). 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  $79/17\%$ ،  $83/33\%$ ،  $85/92\%$ ،  $86/75\%$ ،  $79/58\%$  و  $77/92\%$  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  $90/92\%$ ،  $92/33\%$ ،  $92/6\%$ ،  $93/16\%$ ،  $83/25\%$  و  $80/5\%$  بود که در تیمار ۵ و ۶ کاهش شدید دیده شد ( $p < 0.05$ ). 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 گروه‌های I و II معنی دار بود ( $p < 0.05$ ). 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 ( $p < 0.05$ ). 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

تا سلول‌ها به کف ظرف چسبیده و پخش شوند. سپس سلول‌ها در گروه‌های مورد مطالعه تیمار شدند. سلول‌ها در مقاطع زمانی ۱۲ و ۲۴ ساعت به کمک تریپسین از کف ظروف کشت جدا شدند و پس از تریپسین 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 نتوبار شمارش شدند و درصد زنده ماندن سلول‌ها محاسبه شد. آزمایش برای چهار بار و در هر تکرار چهار خانه از خانه‌های ظرف کشت به هر تیمار 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.

$100 \times \text{تعداد کل سلول‌ها} / \text{تعداد سلول‌های رنگ نشده} = \text{درصد بقا سلول‌ها}$   
**ارزیابی میزان نوریت‌زایی:** یکی از بهترین مشخصه‌ها برای ارزیابی مورفولوژیکی سلول‌ها و میزان نوریت‌زایی نورون‌ها اندازه‌گیری 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 نوریت‌ها در ۱۰۰ سلول پس از عکس‌برداری از نقاط تصادفی توسط میکروسکوپ معکوس مجهز به دوربین اندازه‌گیری شد. آزمایش سه بار تکرار گردید.

بررسی آماری داده‌های حاصل از ارزیابی میزان زنده ماندن سلول‌ها و میزان تولید شدن زائده‌های 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 گروه‌ها استفاده شد و  $p < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف دگزامتازون ( $1\text{ nM}$ ،  $10\text{ nM}$ ،  $100\text{ nM}$ ،  $1\text{ }\mu\text{M}$ ،  $10\text{ }\mu\text{M}$ ،  $100\text{ }\mu\text{M}$ ) بدون مورفین و همراه با مورفین ( $10^{-11}\text{ M}$ ) 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، 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 ترتیب  $86\%$ ،  $90/92\%$ ،  $91/75\%$ ،  $92/17\%$ ،  $88/67\%$  و  $87\%$  بود. میزان زنده ماندن سلول‌ها در تیمار ۲ تا ۶ نسبت به تیمار ۱ افزایش نشان داد که از نظر آماری اختلاف معنی دار بود ( $p < 0.05$ ). اما میزان زنده ماندن سلول‌ها در تیمار ۶ نسبت به تیمار ۱ 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

تیمارهای ۱ تا ۶ به ترتیب ۷۲/۸۳٪، 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 معنی‌دار نبود ( $p < 0.05$ ). 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 ( $p < 0.05$ ). این افزایش می‌تواند ناشی از حضور غلظت پایین دگزامتازون همراه با مورفین در محیط کشت باشد. تیمارهای ۵ و ۶ در این گروه میزان زنده ماندن سلول‌ها نسبت به تیمار ۱ کاهش نشان داد که از نظر آماری اختلاف معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). 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 معنی‌دار نبود اما با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). تیمار ۵ و ۶ از هر دو گروه کاهش شدیدی نشان دادند که می‌تواند 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 زای سلول‌ها:** 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 ۷۲/۳۷±۱۴۸/۷۰، ۸۵/۰۶±۱/۶۱، ۸۸/۳۸±۱/۵۸، ۹۱/۰۵±۱/۶۶ و ۷۲/۸۲±۱/۳۲ بود. تیمارهای ۲ تا ۶ که دگزامتازون دریافت کرده بود، TNL سلول‌ها نسبت به تیمار ۱ کاهش شدیدی نشان دادند که از نظر آماری اختلاف معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). 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 معنی‌دار نیستند اما با تیمارهای ۵ و ۶ از نظر آماری اختلاف معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ) (شکل ۱).

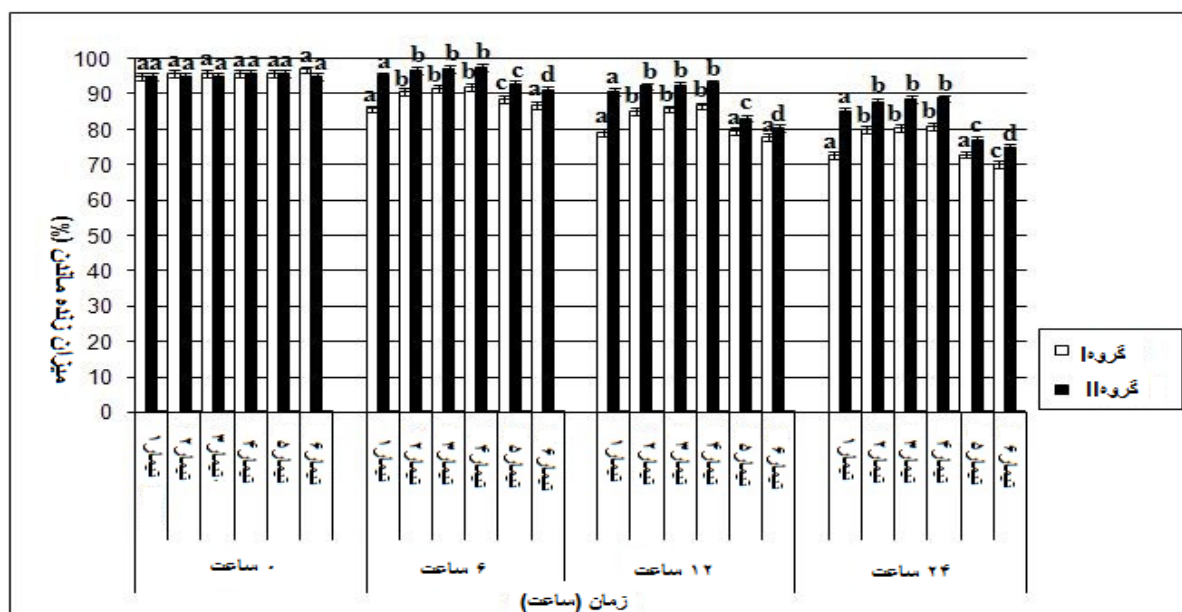
میزان TNL سلول‌ها در گروه II در تیمار ۱ تا ۶ به ترتیب ۱۶۴/۲۲±۴/۴۵، ۱۰۵/۱۹±۲/۸۴، ۱۰۸/۳۳±۳/۰۹، ۱۴۹/۴۶±۴/۰۴ و ۱۱۷/۶۰±۳/۰۸ و ۱۱۵/۲۴±۲/۷۳ میکرومتر ( $\mu\text{M}$ ) بود. به نظر می‌رسد افزایش میزان TNL در تیمار ۱ ناشی از اثر مورفین باشد. میزان TNL سلول‌ها در تیمارهای ۲ تا ۶ این گروه نسبت به تیمار ۱ کاهش نشان داد که از نظر آماری اختلاف معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). مقایسه بین تیمارهای ۲ تا ۶ نشان داد که تیمارهای ۲، ۳، ۵ و ۶ با هم دارای اختلاف معنی‌دار نیستند اما با تیمار ۴ از نظر آماری اختلاف معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ) (شکل ۲). مقایسه بین گروه‌های I و II نشان داد افزایش میزان TNL سلول‌ها در تیمار ۱ گروه II نسبت به تیمار ۱ گروه I می‌تواند ناشی از اثر مورفین باشد. از نظر آماری میزان TNL سلول‌های تیمار ۱ در دو گروه دارای اختلاف معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). میزان TNL سلول‌های تیمار ۱ در گروه II در مقایسه با تیمارهای ۲ تا ۶ گروه I بیشتر بود ( $p < 0.05$ ). با توجه به اینکه تیمار ۱ 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 معنی‌دار است ولی با تیمار ۴ اختلاف معنی‌دار 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 معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ).

۱۲ ساعت پس از تیمار سلول‌ها اندازه TNL سلول‌ها در گروه I برای تیمارهای ۱ تا ۶ به ترتیب ۸۲/۸۹±۱/۶۰، ۷۹/۰۲±۱/۵، ۱۲۳/۶۰±۲/۷۰، ۸۷/۳۰±۱/۵۶ و ۶۸/۶۶±۱/۳۹ میکرومتر ( $\mu\text{M}$ ) بود. کاهش بیشتر TNL در تیمارهای ۲ تا ۶ نسبت به تیمار ۱ دیده شد و همچنان اختلاف معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ) که نشان‌دهنده اثر تخریبی بیشتر دگزامتازون با گذشت زمان است. میزان TNL سلول‌ها در گروه II برای تیمارهای ۱ تا ۶ به ترتیب ۹۶/۰۸±۱/۹۷، ۱۲۶/۸۶±۳/۰۵، ۹۴/۵۱±۲/۵۰، ۹۲/۹۵±۲/۱۴، ۱۴۰/۳۶±۴/۲۱ و ۹۴/۸۳±۲/۹۹ میکرومتر ( $\mu\text{M}$ ) بود که اختلاف مشاهده شده از نظر آماری معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). مقایسه بین تیمارهای ۲ تا ۶ نشان داد که تیمارهای ۲، ۳، ۵ و ۶ با هم دارای اختلاف معنی‌دار نبودند اما با تیمار ۴ از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌دار بودند ( $p < 0.05$ ). مقایسه بین گروه‌های I و II 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 تیمار ۱ 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 تیمار ۱ در دو گروه دارای اختلاف معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). 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 معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). 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 معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). مقایسه بین تیمارهای ۲ تا ۶ گروه II با تیمار ۱ گروه I نشان داد تیمارهای ۲، ۳، ۵ و ۶ گروه I در مقایسه با تیمار ۱ گروه II کمتر بود و از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). اما تیمار ۴ نسبت به تیمار ۱ گروه I افزایش اندکی نشان داد که از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌دار نبود. میزان TNL سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت در گروه I در تیمارهای ۱ تا ۶ به ترتیب ۹۲/۰۰±۲/۰۸، ۷۲/۸۶±۱/۰۲، ۷۴/۰۳±۱/۰۸، ۸۱/۵۶±۱/۶۸ و ۶۳/۵۱±۱/۱۱ و ۵۹/۴۰±۰/۹۱ میکرومتر ( $\mu\text{M}$ ) بود. مقایسه بین تیمارهای ۲ تا ۶ نشان داد که تیمار ۲ و ۳ دارای اختلاف معنی‌دار نبودند و تیمارهای ۵ و ۶ از نظر آماری با هم دارای اختلاف معنی‌دار نبودند اما با تیمار ۲ و ۳ دارای اختلاف معنی‌دار بودند و تیمار ۴ با همه دارای اختلاف معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). میزان TNL سلول‌ها در گروه II در تیمارهای ۱ تا ۶ به ترتیب ۱۲۱/۰۵±۳/۶۱، ۸۵/۰۱±۲/۲۱ و ۱۲۱/۰۵±۳/۶۱

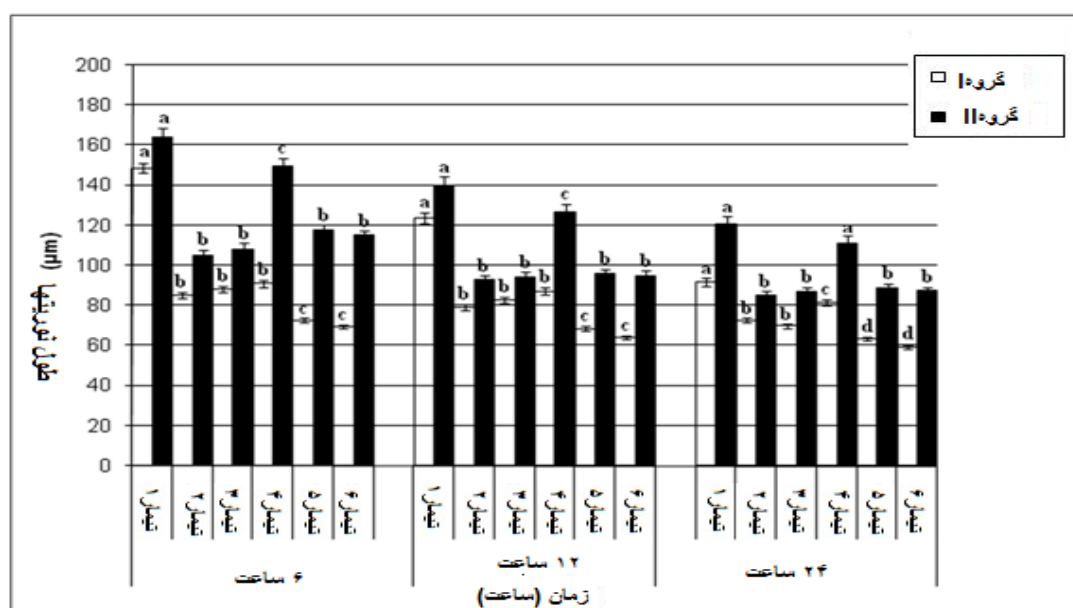
II نسبت به تیمارهای ۲ تا ۶ گروه I افزایش طول نوریت‌ها دیده شد که از نظر آماری اختلاف معنی دار بود ( $p < 0.05$ ). مقایسه بین تیمارهای ۲ تا ۶ گروه II با تیمار ۱ گروه I نشان داد که تیمار ۴ گروه II نسبت به تیمار ۱ گروه I میزان TNL افزایش داشته و از نظر آماری اختلاف معنی دار بود ( $p < 0.05$ ). اما با تیمارهای دیگر از نظر آماری اختلاف معنی دار نبود (نمودار ۲).

۸۷/۱۳±۲/۳۲، ۱۱۱/۱۶±۳/۹۸، ۸۸/۷۰±۲/۱۳ و ۸۷/۴۵±۱/۹۰ میکرومتر ( $\mu\text{M}$ ) 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 ( $p < 0.05$ ). 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



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 تیمار ۱: غلظت ۰ نانو مولار دگزامتازون، تیمار ۲: ۱ nM دگزامتازون، تیمار ۳: ۱۰ nM دگزامتازون، تیمار ۴: ۱۰۰ nM دگزامتازون، تیمار ۵: ۱ μM دگزامتازون و تیمار ۶: ۱۰ μM دگزامتازون.  $a, b, c, d$ : مقایسه تیمارها بشکل درون گروهی و ستون‌هایی با نمادهای مختلف دارای اختلاف معنادار هستند ( $P < 0.05$ , ANOVA).



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

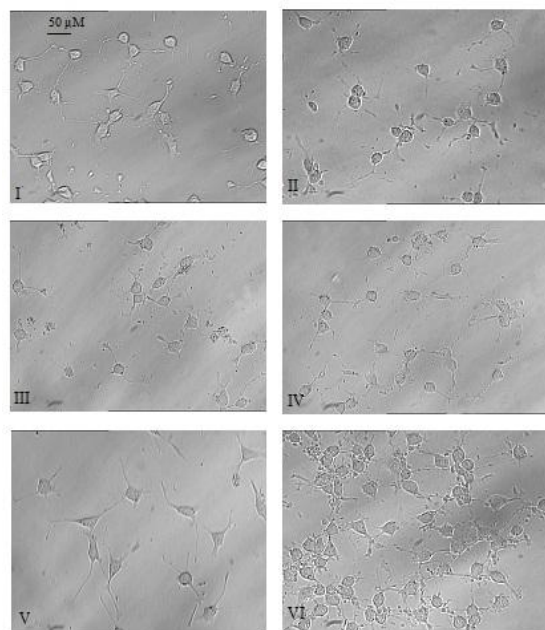
گروه I غلظت‌های مختلف دگزامتازون بدون مورفین، گروه II غلظت‌های مختلف دگزامتازون با مورفین تیمار ۱: غلظت ۰ نانو مولار دگزامتازون، تیمار ۲: ۱ nM دگزامتازون، تیمار ۳: ۱۰ nM دگزامتازون، تیمار ۴: ۱۰۰ nM دگزامتازون، تیمار ۵: ۱ μM دگزامتازون و تیمار ۶: ۱۰ μM دگزامتازون.  $a, b, c, d$ : مقایسه تیمارها بشکل درون گروهی و ستون‌هایی با نمادهای مختلف دارای اختلاف معنی دار هستند ( $P < 0.05$ , ANOVA).

## 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. سلول های PC12 بسته به محرک محیطی می توانند به نورون های سمپاتیک تمایز یابند و یا ویژگی های سلول های کرومافینی را بیان کنند (۲۳). Sadri و همکاران دوز تمایزی اپتیمم استئوروسپورین که بدون ایجاد آپوپتوز، صرفاً تمایز را در سلول های PC12 سبب شود ۲۱۴ نانومولار تعیین کردند (۲۴). اپیوئیدها رشد نوریت را *in vivo* و *in vitro* تحت تاثیر قرار می دهند. مورفین (به واسطه رسپتور) اثرات متفاوت تحرکی یا مهاری (بسته به دوز) روی نورون زایی PC12 دارند. تزریق پیش از تولدمورفین کاهش رشد دندریت در کورتکس مغزی رت را القا می کند، همچنین منشعب شدن نوریت ها در مغز کشت شده جنین جوجه و طول دندریت های سلول پورکینژ را کاهش می دهد (۲۵). اپیوئیدها بر تکوین، تمایز، نوریت زایی و آپوپتوز تاثیر دارند. اپیوئیدها اثر دو گانه وابسته به غلظت روی نوریت زایی دارند. بطوریکه غلظت بالا (۱ mM) طولیل شدن نوریت در PC12، نورون های گرانولی مغزی و نورون های هیپوکامپ را مهار می کند. اما غلظت های پایین مورفین (۱ pM) در PC12 رشد نوریت را در حضور NGF افزایش می دهد (۲۶). نتایج نشان داده اند که غلظت های  $10^{-14}$  و  $10^{-9}$  مولار رشد نوریت ها را در سلول های طناب نخاعی کشت شده افزایش می دهد، ولی غلظت های پیکومولار در سلول های PC12 رشد نوریت ها را افزایش می دهد (۲۵). همچنین مشخص شده است که مورفین قادر به تحریک کانال های 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 سیستم های بیولوژیکی از جمله بهبود عملکرد نورون ها است و انتقالات داخل سلولی یون کلسیم می تواند باعث ایجاد تمایز در شرایط کشت شود. این خود می تواند باعث تسریع یا کاهش سرعت طولیل شدن آکسون ها گردد (۲۷).

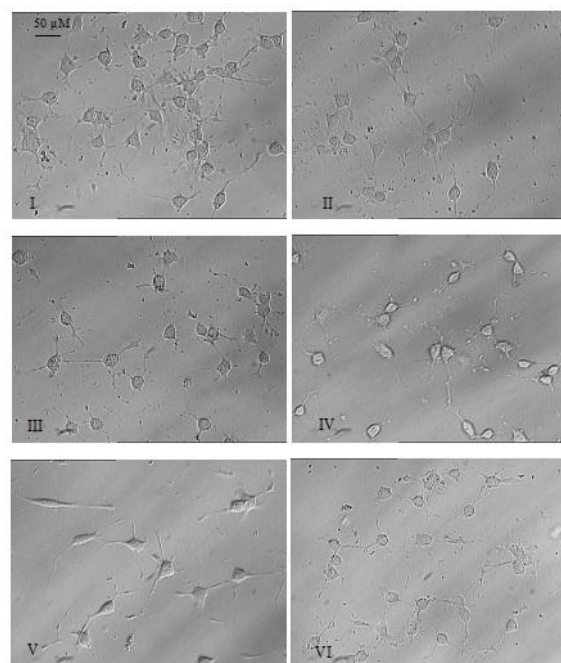
برخی یافته ها پیشنهاد می کنند که مورفین برای نورون ها توکسیک است و آپوپتوز را القا می نماید در حالی که برخی شواهد دیگر نشان می دهند که مورفین می تواند تأثیرات سودمندی بر علیه مرگ سلولی داشته باشد (۲۸). در غلظت های بالا (۱۰ mM-۱۰ μM) مورفین رشد زواید نورونی را در کشت های اولیه نورون های گرانول مخچه ای و هیپوکامپ، در یک مدل وابسته به نالوکسون مهار می کند. در حالی که غلظت های مورفین بین ۱۰ nM و ۱۰ pM، رشد زواید نورونی را در نورون های کورتکس و نخاع تا بیش از ۲۰٪ افزایش می دهد و غلظت های پایین تر از ۱۰ پیکومولار مورفین افزایش طول زواید نورونی را در رده سلولی PC12 تحریک می کند. از آنجاییکه این اثرات به وسیله نالوکسون برگشت پذیر نیستند، پیشنهاد می کنند که به وسیله رسپتورهای خاصی با تمایل بالا میانجی می شوند (۲۵).

در تحقیق حاضر برای دستیابی به روشی که تاثیر دگزامتازون بر سلول های دستگاه عصبی را نشان دهد سلول های PC12 در حضور استئوروسپورین با غلظت های مختلف دگزامتازون بدون مورفین و یا در حضور غلظت  $10^{-14}$  مولار (۱۰۰ پیکو مولار) مورفین تیمار و اثرات آن بر میزان بقا سلولی و طول کل نوریت های یک سلول اندازه گیری شد.



شکل ۱. اثر غلظت های مختلف دگزامتازون بدون مورفین بر ایجاد زواید نرونی (نوریت) در سلول های PC12 (Scale Bar = 50 μm)

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



شکل ۲. اثر غلظت های مختلف دگزامتازون در حضور غلظت ۱۰ پیکومولار مورفین بر ایجاد زواید نرونی (نوریت) در سلول های PC12 (Scale Bar = 50 μm)

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

دگرامتازون بر میزان زنده ماندن سلول‌ها و مورفولوژی سلول‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. این تحقیق نشان داد که استفاده از غلظت‌های پایین دگرامتازون ( $10^{-6}$  M،  $10^{-7}$  M،  $10^{-8}$  M) برای سلول‌هایی که در معرض مورفین قرار گرفته بودند میزان زنده ماندن سلول‌ها را تا حد زیادی نسبت به گروه در معرض دگرامتازون 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 دگرامتازون بدون مورفین و همراه با مورفین درصد زنده ماندن سلول‌ها در بازه‌های زمانی ۰، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت انجام شد. درصد زنده ماندن سلول‌ها در سلول‌های تحت تیمار با غلظت‌های پایین دگرامتازون و مورفین بیشتر از ۹۵ درصد بود اما در غلظت‌های بالای دگرامتازون ( $10^{-6}$  M،  $10^{-7}$  M) درصد زنده ماندن سلول‌ها کمتر از ۹۵ درصد بود. این مساله مبین اینست که غلظت‌های پایین دگرامتازون همراه با مورفین درصد زنده ماندن سلول‌ها را افزایش داده اما غلظت‌های بالای دگرامتازون سبب کاهش درصد زنده ماندن سلول‌ها شده است. اما کاهش درصد زنده ماندن سلول‌ها در غلظت‌های بالای دگرامتازون نقش تخریب عصبی این ماده را نشان می‌دهد. مقایسه میان سلول‌ها نشان داد که غلظت‌های مختلف دگرامتازون 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 دگرامتازون در جمع شدن نوریت‌ها را تأیید 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 می‌دهد که از مورفین می‌توان به عنوان یک عامل کمکی - حفاظتی موثر در بهبود و مهار اثرات تخریبی دگرامتازون در سلول‌های عصبی استفاده کرد.

### تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت مالی و مشارکت گروه زیست‌شناسی دانشگاه رازی کرمانشاه تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

نتایج قبلی نشان دادند که دگرامتازون (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 تأثیر 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 غلظت ۰/۱ میکرومولار دگرامتازون 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 دگرامتازون 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 دگرامتازون همراه با مورفین بودند نیز نشان داد که مورفین طول نوریت‌ها را افزایش داده و سبب طولیل شدن آن‌ها می‌گردد، اما حضور دگرامتازون سبب کاهش طول نوریت‌ها شده و سبب جمع شدن آن‌ها می‌گردد. مقایسه گروه‌های مورد مطالعه نشان داد مورفین توانسته اثر ناشی از دگرامتازون که سبب تخریب سلول‌ها شده است، را تا حدودی جبران کند. شواهد نشان داده است که دگرامتازون عصب‌زایی را در *in vivo* و *in vitro* مهار می‌کند (۳۲). گرچه تنها ۲۰-۱۰ درصد سلول‌های پیش‌ساز در ژيروس دنداندار (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  $10^{-6}$  -  $10^{-7}$  مولار دگرامتازون تکثیر سلولی در سلول‌های HT-108 و فیبروبلاست‌ها را مهار می‌کند (۳۴).

در این تحقیق پس از تیمار سلول‌های PC12 توسط غلظت‌های مختلف دگرامتازون به تنهایی و یا در حضور غلظت  $10^{-6}$  مولار (۱۰۰ پیکو مولار) مورفین بررسی اثر غلظت‌های مختلف دگرامتازون روی این سلول‌ها با یک دید مورفولوژیکی - عملکردی انجام شد. به طوری که پس از بررسی درصد بقای سلول‌ها و مقایسه آنها در گروه‌های مورد بررسی، اثرات غلظت‌های مختلف

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

S. Najmi-Nejad (MSc)<sup>1</sup>, H. Zhaleh (MSc)<sup>1</sup>, M. Azadbakht (PhD)<sup>1\*</sup>

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 26<sup>th</sup> 2013, Revised: May 1<sup>st</sup> 2013, Accepted: Jul 10<sup>th</sup> 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 mM L-glutamin, 1% NEAA and 1% antibiotic penicillin/streptomycine. 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, 1 μM 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 ( $148.70 \pm 2.37$ ,  $85.06 \pm 1.61$ ,  $88.38 \pm 1.58$ ,  $91.05 \pm 1.66$ ,  $72.82 \pm 1.32$  and  $69.18 \pm 1.18$  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  $164.22 \pm 4.45$ ,  $105.19 \pm 2.84$ ,  $108.33 \pm 3.09$ ,  $149.46 \pm 4.04$ ,  $117.60 \pm 3.08$  and  $115.24 \pm 2.73$  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 in preterm 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 Regul 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 Neurosci* 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-1 activity 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.