

## اثر حفاظتی مورفین بر مرگ سلولی القا شده در کشت بدون سرم در سلول‌های PC12

حسین ژاله<sup>۱</sup>(MSc)، علی بیدمشکی پور<sup>۱</sup>(PhD)\*، مهری آزادبخت<sup>۱</sup>(PhD)، محمدمبین حرمشاهی<sup>۱</sup>(MSc)

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

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

### خلاصه

**سابقه و هدف:** مورفین یکی از داروهای مهم در درمان درد بوده و بعنوان تنظیم کننده بقا یا مرگ سلولی در سلول‌های عصبی و توموری می باشد. بیشتر مطالعات پیشنهاد می کنند که مورفین باعث القا آپوپتوزیس در سلول‌های عصبی می شود اما در مطالعات دیگری بیان شده که مورفین اثرات مهاری بر علیه مرگ سلولی القا می کند. در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف مورفین بر مرگ سلولی القا شده در سلول‌های PC12 تحت شرایط کشت بدون سرم بررسی شد.

**مواد و روشها:** سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640 همراه با ۲٪ درصد BSA کشت داده شدند. سلول‌ها به دو گروه (گروه I: بدون پیش تیمار با نالتروکسان و گروه II: همراه با پیش تیمار نالتروکسان) تقسیم شدند. در هر گروه سلول‌ها همراه با غلظت‌های مختلف (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 اندازه گیری لاکتات دهیدروژناز و میزان مرگ سلول‌ها از طریق رنگ آمیزی افتراقی Hoechst/PI اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** بعد از ۶ روز تمامی سلول‌های کنترل در اثر عدم وجود سرم کاملاً دچار آپوپتوزیس (۱۰۰٪) و مرگ سلولی شدند ( $p < 0.05$ ). ارزیابی میزان سیتوتوکسیسیته و مرگ سلول‌ها نشان داد که مورفین در تمامی غلظت‌ها میزان سیتوتوکسیسیته و مرگ سلول‌های القا شده توسط شرایط بدون سرم در سلول‌های PC12 مهار می کند ( $p < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که مورفین بعنوان یک فاکتور کمکی با مکانیسم وابسته به رسپتورهای اپیوئیدی منجر به مهار مرگ سلولی در سلول‌های PC12 در شرایط کشت بدون سرم می شود.

**واژه‌های کلیدی:** آپوپتوزیس، مورفین، سرم، PC12.

### مقدمه

الیگودندروسیت‌ها و نورون‌های تمایز یافته وابسته به وجود عوامل رشد موجود در سرم است (۹ و ۱۰). اپیوئید اصطلاحی است که به هرنوع ماده درون‌زا و یا صناعی مولد اثرات شبه مورفینی اطلاق می گردد (۱۱ و ۱۰). از طرفی عملکردهای اپیوئیدها وابسته به تشکیل کمپلکس رسپتور- آگونیست در سطح غشاهای سلولی به وجود می آید. اتصال آگونیست‌های اپیوئیدی به رسپتورها و فعال شدن رسپتورها باعث شروع آبشاری از وقایع بیولوژیکی در درون سلول‌ها می گردد (۱۲). مطالعات نشان می دهند که مورفین بعنوان داروئی اپیوئیدی سبب تنظیم فرآیند‌های اندوکربینی (۱۵-۱۳) و سیستم ایمنی (۱۷ و ۱۶) می گردد. مورفین علاوه بر اثرات ضد دردی، در تشکیل مغز، عصب‌زایی، تمایز سلولی و آپوپتوز و در شرایط *in vivo* مورفین وابسته به دوز مصرفی، مرگ سلولی یا بقا سلول‌ها را در نورون‌های سیستم عصبی مرکزی تعدیل می‌کند (۱۹ و ۱۸). مطالعه اثرات مورفین در کشت سلول‌های مختلف مانند نورون‌ها و میکروگلیاها، سلول‌های ریوی و حتی

مرگ سلولی نتیجه نهایی آسیب سلول و یکی از وخیم‌ترین رویدادها در روند آسیب هر بافت یا عضو است (۲ و ۱). آپوپتوز مرگ فیزیولوژیک سلول است که برای تکامل و هموستاز بافتی ضروری است. حذف سلول‌های پیر و آسیب دیده و از بین رفتن حالت پره‌ای بین انگشتان در انسان در دوره جنینی، نمونه‌هایی از نقش آپوپتوز در حفظ هموستاز و تکوین اعضا می‌باشد (۳). محرک‌های مختلف شامل عوامل ژنوتوکسیک (شیمی درمانی و رادیوتراپی)، هورمون درمانی و محرومیت سلول از عوامل رشد مانند سیتوکاین‌ها سبب تسریع روند آپوپتوز می شوند (۴). وجود و یا فقدان فاکتورهای رشد در محیط کشت سلول‌ها به ترتیب نقش مهمی در بقا و مرگ سلول‌ها دارد (۵ و ۶). در سیستم عصبی، بیشتر نورون‌ها و الیگودندروسیت‌ها به علت عدم دسترسی به عوامل نوروتروفیک دچار تخریب و مرگ سلولی می شوند (۸ و ۷). در کشت آزمایشگاهی، شرایط بدون سرم استرس‌های مختلفی را در سلول‌ها القا می کنند و میزان زنده ماندن

این مقاله حاصل پایان نامه حسین ژاله دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی دانشگاه رازی کرمانشاه می باشد.

\* مسئول مقاله:

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

e-mail: a.bidmeshkipour@gmail.com

کشت داده شدند. پس از آن که سلولها به کف ظرف چسبیدند، محیط کشت سلولها برداشته و با محلول PBS شستشو داده شدند. سپس سلول ها در محیط کشت سلولی همراه با غلظتهای مختلف مورفین و به صورت سه تایی تیمار شدند. جهت تعیین میزان تأثیر مواد بر بقای سلولها، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط رویی سلولها با استفاده از سمپلر به ظرف کشت ۹۶ خانه‌ای منتقل شدند. به منظور تهیه مخلوط واکنش، ابتدا کاتالیست در یک میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شد و برای تهیه مخلوط واکنش به تعداد ۱۰۰ تست، ۲۵۰ میکرولیتر از محلول کاتالیست با ۱۱/۲۵ میلی‌لیتر محلول رنگ مخلوط شد. ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش به هر چاهک اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و به دور از نور انکوبه شد. سپس جذب نمونه‌ها در ۴۹۰-۵۰۰ نانومتر با استفاده از یک دستگاه ELISA reader خوانده شده و طول موج ۶۰۰ نانومتر نیز به عنوان رفرانس انتخاب گردید. این آزمایش در روزهای ۳، ۶ و ۱۲ روز پس از تیمار انجام شد.

**ارزیابی میزان مرگ سلولی سلول ها:** اندازه گیری میزان مرگ سلولی با استفاده از رنگ های فلورسنتس به روش اترافی انجام شد (۲۳). در این روش سلولهای PC۱۲ تیمار شده در دو مرحله رنگ آمیزی شدند. سلولها با تراکم  $10^4$  سلول در میلی‌لیتر در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۰/۲ درصد BSA در چاهک‌های ظروف کشت ۶ خانه‌ای کشت داده شدند. پس از آنکه سلولها به کف ظرف چسبیدند، محیط کشت سلول ها برداشته شد و با محلول PBS شستشو داده شدند. سپس سلول های محیط کشت سلولی همراه با غلظتهای مختلف مورفین و به صورت سه تایی تیمار شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، جهت تعیین میزان مرگ سلولی، سلولها با PBS شسته و به مدت ۳۰ دقیقه توسط محلول رنگی بیس بنز آمید (۱۰ میکروگرم در میلی لیتر محیط کشت) رنگ آمیزی شدند. پس از نفوذ رنگ به داخل هسته سلول ها و اتصال به DNA، هسته سلول ها به رنگ آبی در آمد. سپس سلول ها سه بار و به مدت ۵ دقیقه در PBS شستشو داده شدند. سپس سلول ها به مدت پنج دقیقه در محلول رنگ پروپیدیوم یدید (PI) (۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر محیط کشت) قرار داده شدند. بعد سلولها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول پارافمالدهید ۰/۴ درصد قرار داده و فیکس شدند. پس از رنگ آمیزی سلول های آپوپتوتیک دارای ظاهر صورتی روشن و هسته ای متراکم و قطعه قطعه هستند. این آزمایش در روزهای ۳، ۶ و ۱۲ روز پس از تیمار انجام شد.

بررسی آماری داده های حاصل از ارزیابی میزان سیتوتوکسیسیته و میزان مرگ سلولی 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  $p < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

### یافته ها

**اثر مورفین بر میزان سیتوتوکسیسیته سلول های PC12:** نتایج بدست آمده از بررسی سیتوتوکسیسیته سلولهای PC۱۲ نشان داد که یک روز پس از تیمار در هر گروه با افزایش غلظت مورفین در تیمارهای مختلف در مقایسه با تیمار ۶ میزان سیتوتوکسیسیته کاهش می یابد ( $p < 0.05$ ). پس از گذشت ۳ روز از انجام آزمایش میزان سیتوتوکسیسیته سلول ها در هر گروه با افزایش

سلولهای سرطانی همگی به نقش تخریبی دوزهای بالای آن بر القای مرگ سلولی یا نکروز در این سلول ها تأکید دارند (۲۰). از این رو جهت بهبود رشد و پایداری سلول ها و جلوگیری از مرگ سلولی و تخریب سلولهای عصبی معمولاً از سرم بعنوان فاکتور خارجی و یا از عوامل پایدار کننده سلول ها استفاده می شود. امروزه علاوه بر سرم از عوامل متفاوتی جهت بهبود رشد و مهار مرگ سلولی در سلول های کشت شده مانند FGF، NGF و انسولین استفاده می شود (۲۱ و ۲۲). این عوامل گرچه باعث مهار مرگ سلولی در سلول های PC12 و نیز تحریک تقسیم سلولی می گردند، اما بعلت هزینه زیاد و محدودیت دسترسی به این فاکتورها مشکلاتی را برای محققین ایجاد می کند. از این رو محققین همواره بدنبال تولید و کشف عواملی با عملکردهای شبیه فاکتورهای رشد با شرایط ارزان، در دسترس و مناسب هستند. لذا در این مطالعه با توجه به اثر وابسته به غلظت مورفین، اثرات جبرانی شبه فاکتور رشدی این ماده بر مرگ سلولی القا شده در کشت سلولهای PC۱۲ بدون حضور فاکتورهای کمکی موجود در سرم مورد مطالعه قرار گرفت.

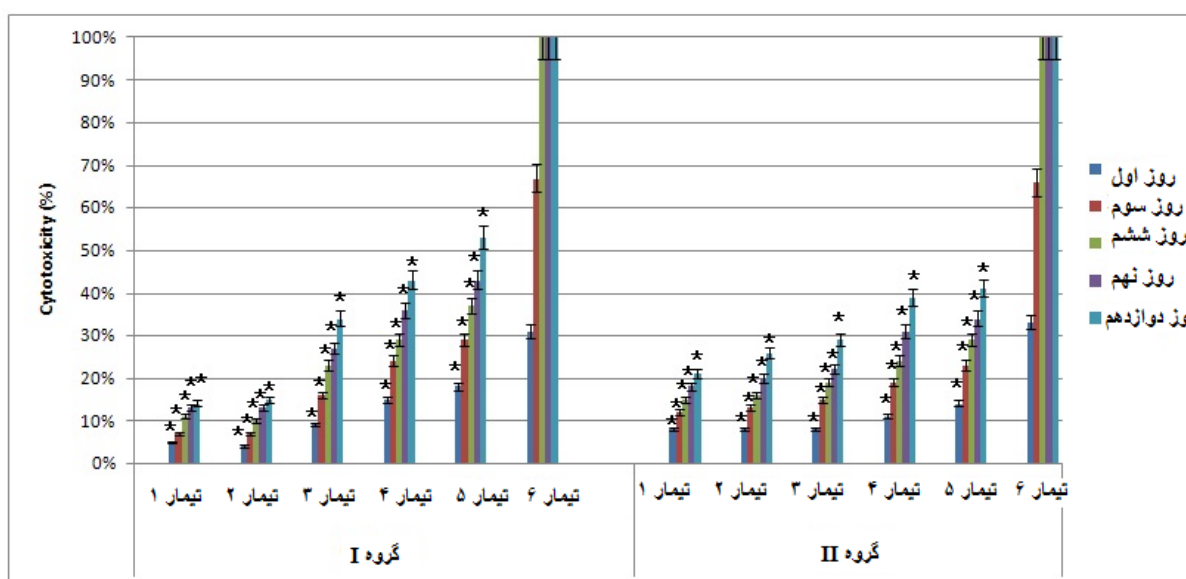
### مواد و روشها

**کشت سلولهای PC۱۲:** سلول های PC۱۲ از انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت RPMI1640 همراه با (Bovine %۲(w/v) BSA (Bovine %۱ L-Glutamin ، Serum Albumin; BSA) NEAA (Nonessential Amino Acids; NEAA) (v/v)٪۱ 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. **تیمار سلولهای PC۱۲:** سلولها در درون فلاسک کشت سلول T-25 و با تراکم  $10^4$  Cell/Cm<sup>2</sup> در محیط کشت RPMI1640 همراه با (Bovine %۲(w/v) BSA (Bovine %۱ L-Glutamin ، Serum Albumin; BSA) NEAA (Nonessential Amino Acids; NEAA) (v/v)٪۱ کشت داده شدند و در انکوباتور با دمای ۳۷ °C و CO<sub>2</sub> ۵٪ نگهداری شدند. سلول ها به دو گروه تقسیم شدند. گروه I شامل سلولهای PC۱۲ که توسط مهارکننده نالتروکسان پیش تیمار نشده بودند و گروه II: شامل سلولهای رده PC۱۲ که توسط مهارکننده نالتروکسان پیش تیمار شده بودند. در هر گروه سلولها با ۶ دوز تیماری متفاوت (تیمار ۱:  $10^{-12}$  ، تیمار ۲:  $10^{-10}$  ، تیمار ۳:  $10^{-8}$  ، تیمار ۴:  $10^{-6}$  ، تیمار ۵:  $10^{-4}$  و تیمار ۶: ۰/۰ مولار) مورفین تیمار شدند. سلولهایی که محیط تیمار آنها فاقد مورفین بود (تیمار ۶ در هر گروه) به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. سپس سلول ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO<sub>2</sub> به مدت ۱۲ روز انکوبه شدند. سلولها از لحاظ میزان سیتوتوکسیسیته و میزان مرگ سلولی با میکروسکوپ معکوس مجهز به دوربین عکسبرداری و بررسی شدند.

**ارزیابی میزان سیتوتوکسیسیته سلول ها:** سنجش لاکتات دهیدروژناز روشی سریع و ساده بمنظور کمیت سنجی سیتوتوکسیسیته براساس اندازه گیری فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز آزاد شده از سلولهای آسیب دیده می باشد. در این روش، سلولها با تراکم  $10^4$  سلول در میلی‌لیتر در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۰/۲ درصد BSA در چاهک‌های ظروف کشت ۲۴ خانه

تیمارهای ۱ تا ۵ در گروه های I و II معنی دار و ناشی از تحریک سیگنال های درون سلولی ناشی از فعالیت رستپورهای اپیوئیدی بود ( $P < 0.05$ ). مطالعات آماری نشان داد که اختلاف افزایشی در میزان سیتوتوکسیسیته پس از ۶ روز در مقایسه با روزهای اول و سوم در تیمارهای ۱ تا ۵ در هر دو گروه I و II معنی دار بود ( $P < 0.05$ ). پس از گذشت ۹ و ۱۲ روز از انجام آزمایش میزان سیتوتوکسیسیته در سلول ها در گروه های I و II در تیمار های ۱ تا ۵ در مقایسه با تیمار ۶ (۱۰۰ درصد) در هر گروه دارای کاهش معنی دار بودند و این اختلافات آماری بین گروه ها نیز معنی دار بودند ( $P < 0.05$ ). بررسی آماری در مطالعات آزمایشگاهی پس از ۹ و ۱۲ روز از آزمایش نشان داد که اختلافات افزایشی در تیمارهای ۱ تا ۵ در هر دو گروه در مقایسه با روزهای پیشین معنی دار بودند ( $P < 0.05$ ) (نمودار ۱).

غلظت مورفین در تیمار های مختلف در مقایسه با تیمار ۶ کاهش یافت ( $P < 0.05$ ). بررسی آماری نشان داد که افزایش در میزان سیتوتوکسیسیته پس از ۳ روز در مقایسه با روز اول در تیمارهای ۱، ۲، ۳ و ۴ در گروه I در مقایسه با تیمارهای مشابه در گروه II معنی دار بودند ( $P < 0.05$ ). اما این اختلاف بین تیمار ۱ و ۲ از نظر آماری معنی دار نبود. پس از گذشت ۶ روز از انجام آزمایش میزان فعالیت سیتوتوکسیسیته سلول ها در گروه I در تیمارهای ۱ تا ۵ (به ترتیب ۱۰، ۱۱، ۲۳، ۲۹ و ۳۷ درصد) در مقایسه با سلولهای تیمار ۶ (۱۰۰ درصد) که در این زمان کاملاً از بین رفته و دچار تخریب شده بودند، دارای کاهش معنی داری بودند ( $P < 0.05$ ). کاهش میزان سیتوتوکسیسیته در تیمارهای ۱ تا ۵ در گروه II در مقایسه با تیمار ۶ (۱۰۰ درصد) دیده شد که تمامی این اختلافات معنی دار بود ( $P < 0.05$ ). مقایسه بین گروه ها نشان داد که اختلافات آماری ایجاد شده در



نمودار ۱. اثر مورفین بر میزان سیتوتوکسیسیته سلول های رده PC12 بدون حضور سرم در زمان های مختلف.

گروه I غلظت های مختلف مورفین بدون پیش تیمار نالتروکسان، گروه II غلظت های مختلف مورفین همراه با پیش تیمار نالتروکسان، تیمار ۱:  $10^{-12}$  مولار مورفین، تیمار ۲:  $10^{-10}$  مولار مورفین، تیمار ۳:  $10^{-8}$  مولار مورفین، تیمار ۴:  $10^{-6}$  مولار مورفین، تیمار ۵:  $10^{-4}$  مولار مورفین و تیمار ۶:  $10^{-2}$  مولار مورفین. \*: مقایسه تیمارها به شکل درون گروهی و ستون ها با این نماد دارای اختلاف معنی دار با تیمار ۶ هستند.

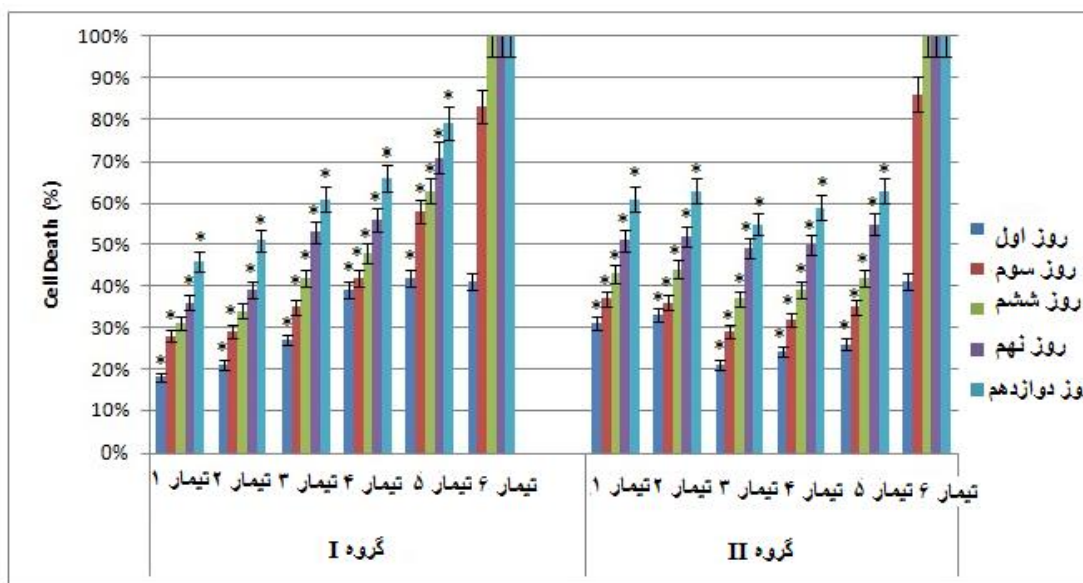
میزان مرگ سلولی در تیمارهای ۱ تا ۵ (به ترتیب ۳۷، ۲۹، ۳۶، ۳۲ و ۳۵ درصد) در گروه II در مقایسه با تیمار ۶ (۸۲٪) دیده شد که تمامی این اختلافات معنی دار است ( $P < 0.05$ ). مقایسه بین گروه ها نشان می دهد که اختلافات آماری ایجاد شده در تیمارهای ۱ تا ۵ در گروه های I و II معنی دار و ناشی از تحریک سیگنال های درون سلولی ناشی از فعالیت رستپورهای اپیوئیدی است ( $P < 0.05$ ). مطالعات آماری نشان می دهد که اختلاف افزایشی در میزان مرگ سلولی پس از ۳ روز در مقایسه با روز اول در تیمارهای ۱ تا ۵ در گروه I و گروه II معنی دار بوده است ( $P < 0.05$ ). پس از گذشت ۶ روز از انجام آزمایش میزان مرگ سلولی در سلول های گروه I در تمامی تیمارهای ۱ تا ۵ به ترتیب ۳۱، ۳۴، ۴۲، ۴۸ و ۶۳ درصد بود که در مقایسه با سلولهای تیمار ۶ (۱۰۰٪) که در این زمان کاملاً از بین رفته و دچار مرگ سلولی شده بودند دارای اختلاف معنی داری بودند ( $P < 0.05$ ). کاهش میزان مرگ سلولی در تیمارهای

اثر مورفین بر میزان مرگ سلولی سلولهای PC12: نتایج بدست آمده از بررسی مرگ سلولی در سلول های رده PC12 نشان داد که یک روز پس از اعمال اثر مورفین در گروه I تیمارهای ۱، ۲ و ۳ (به ترتیب ۱۸، ۲۱ و ۲۷ درصد) در مقایسه با تیمار ۶ (۴۱٪) و در گروه II تیمارهای ۱ تا ۵ (به ترتیب ۳۱، ۳۴، ۳۳، ۲۶ و ۲۹ درصد) که پیش تیمار شده بودند و در معرض مورفین قرار داشتند اختلاف معنی داری از نظر میزان مرگ سلولی با تیمار ۶ (۴٪) وجود داشت ( $P < 0.05$ ). در این مرحله بین تمامی تیمارهای ۱ تا ۵ در گروه I در مقایسه با تیمارهای ۱ تا ۵ در گروه II در میزان مرگ سلولی اختلاف معنی داری دیده شد ( $P < 0.05$ ). پس از گذشت ۳ روز از انجام آزمایش میزان مرگ سلولی سلول ها گروه I در تمامی تیمارهای ۱ تا ۵ به ترتیب ۲۷، ۲۹، ۳۵، ۴۲ و ۵۸ درصد بود که در مقایسه با سلولهای تیمار ۶ (۸۳٪) که در این زمان دچار مرگ سلولی شدیدی شده بودند، دارای اختلاف معنی داری بودند ( $P < 0.05$ ). کاهش

کاهش معنی دار بود و این اختلافات آماری بین گروه ها نیز معنی دار بود ( $p < 0.05$ ).

اختلافات آماری و افزایش نسبی میزان مرگ سلولی در گروه II در مقایسه با گروه I در تمامی روزهای تیماری نتیجه سرکوب سیگنالهای سلولی ناشی از فعال شدن رستپورهای اپیوئیدی است که توسط مهارکننده نالتروکسان ایجاد می شود. در تمامی تیمارها با مورفین، در هر دو گروه، میزان مرگ سلولی در مقایسه با گروه کنترل (تیمار ۶) دچار کاهش معنی داری بود که این مسئله می تواند بازگوکننده نقش حفاظتی دوزهای مختلف مورفین در برابر مرگ سلولی ناشی از کمبود سرم در محیط سلول ها باشد (نمودار ۲).

۱ تا ۵ (به ترتیب ۴۳، ۳۷، ۴۴، ۳۹ و ۴۲ درصد) در گروه II در مقایسه با تیمار ۶ (۱۰۰ درصد) دیده شد که تمامی این اختلافات معنی دار بود ( $p < 0.05$ ). مقایسه بین گروه ها نشان داد که اختلافات آماری ایجاد شده در تیمارهای ۱ تا ۵ در گروه های I و II معنی دار و به دلیل تحریک سیگنال های درون سلولی ناشی از فعالیت رستپورهای اپیوئیدی است ( $p < 0.05$ ). مطالعات آماری نشان داد که اختلاف افزایشی در میزان مرگ سلولی پس از ۶ روز در مقایسه با روز اول و سوم در تیمارهای ۱ تا ۵ در هر دو گروه I و II معنی دار بود ( $p < 0.05$ ). پس از گذشت ۹ و ۱۲ روز از انجام آزمایش میزان مرگ سلولی در سلول ها در گروه های I و II در تیمار های ۱ تا ۵ در مقایسه با تیمار ۶ (۱۰۰٪) دارای



نمودار ۲. اثر مورفین بر میزان درصد مرگ سلولی سلول های رده PC۱۲ بدون حضور سرم در زمان های مختلف.

گروه I غلظت های مختلف مورفین بدون پیش تیمار نالتروکسان، گروه II غلظت های مختلف مورفین همراه با پیش تیمار نالتروکسان، تیمار ۱:  $10^{-12}$  مولار مورفین، تیمار ۲:  $10^{-10}$  مولار مورفین، تیمار ۳:  $10^{-8}$  مولار مورفین، تیمار ۴:  $10^{-6}$  مولار مورفین، تیمار ۵:  $10^{-4}$  مولار مورفین و تیمار ۶:  $10^{-2}$  مولار مورفین. \*مقایسه تیمارها بشکل درون گروهی و ستون ها با این نماد دارای اختلاف معنی دار با تیمار ۶ هستند.

## بحث و نتیجه گیری

سلول ها در مقابل آپوپتوز در برخی از مدل های کشت بدون سرم می گردند (۲۷). در سلول های PC۱۲ حذف کامل سرم تحریکی موجب فعالیت سریع مسیر JNK و در نتیجه القا فعالیت آپوپتوتیکی در تیپ های سلولی عصبی می شود (۲۸). مورفین به عنوان یک داروی  $\mu$  اپیوئیدی قوی، یکی از پر مصرف ترین داروها در درمان دردهای مزمن است. سیگنال مورفین بسیار پیچیده بوده و این مسئله به علت پیوستگی پیچیده رستپورهای اپیوئیدی با مولکول های افکتوری غشاء پلاسمایی و سازمان های داخل سلولی سلول هاست که باعث فعال شدن پروتئین کینازهای مختلف شامل ERK، p38MAPK، JNK و ERK5 می شود. این عوامل در بسیاری از سیگنال های سلولی مانند تکثیر سلولی، تمایز، بقا، یادگیری و حافظه نقش فعالی دارند (۲۹).

مورفین با تحریک و فعال کردن زیر واحد G پروتئینی  $\beta\gamma$  سبب فسفریلاسیون و فعال کردن  $IP3K\gamma$  و  $IP3K\beta$  (۳۱ و ۳۰) و مهار آپوپتوز از طریق مهار (۳۳ و ۳۲) پروتئین پیش مرگی Bad و فعال کردن پروتئین NF-k $\beta$

در این تحقیق بررسی های مورفولوژیک سلول های غیر تیمار شده و تحت تیمار با دوزهای مورد استفاده مورفین به مدت ۱۲ روز نشان داد که فقدان سرم در محیط کشت سلول های PC۱۲ سبب القا سیتوتوکسیسیتی و مرگ سلولی شدید در سلول ها می شود بطوریکه سلول ها پس از حدود ۵ روز از کشت کاملاً دچار آپوپتوز می گردند. محققین سال های متمادی است که 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. سلول های PC۱۲ در صورت فقدان عوامل رشد موجود در سرم قادر به زنده بودن و تقسیم نبوده و دچار مرگ سلولی می شوند (۲۴ و ۲۱). در این مطالعه نشان داده شد که فقدان عوامل رشد موجود در سرم باعث القا مرگ سلولی در سلول های PC12 می شود. علاوه بر القا مرگ سلولی، در سلول های PC۱۲ در صورت فقدان سرم و عوامل رشد موجود در آن، دچار تمایز سلولی نمی گردند (۲۶ و ۲۵ و ۲۲). عوامل نوروتروفیک باعث تحریک فعال شدن مسیر PI3K/AKT و در نتیجه حفاظت

مختلف مورفین در شرایط بدون مهارکننده در غلظت های مختلف مورفین رفتارهای معکوسی حاصل می شود که نشان می دهد رفتارهای مورفین در محیط کشت وابسته به تحریک و فعالیت رسپتورهای اپیوئیدی توسط مورفین است.

به طور کلی نتایج حاصل از ارزیابی میزان سیتوتوکسیسیته و مرگ سلولی پیشنهاد می کند که مورفین در یک روش وابسته به غلظت و وابسته به رسپتورهای اپیوئیدی می تواند نقش یک فاکتور کمکی - حفاظتی را برای سلولهای PC۱۲ داشته باشد. این نتایج نشان می دهد که از مورفین می توان به عنوان یک عامل کمکی موثر در پروتوکل های کشت سلول های PC۱۲ استفاده کرد.

### تقدیر و تشکر

بدینوسیله از گروه زیست شناسی دانشگاه رازی کرمانشاه، قدردانی بعمل می آید.

می شود. این فعالیت کاملاً به واسطه رسپتورهای اپیوئیدی و تمامی اثرات فوق به واسطه نالتروکسان و مهار کننده PI3K (ورتاماین) مهار می گردد (۳۵و۳۴). مطالعات نشان داد که استفاده از مورفین در خلال جنین زایی باعث جلوگیری از آپوپتوز نورونهای گانلیون ciliary که به شکل نرمال در خلال تشکیل سیناپسها از بین می روند، می گردد (۳۶). مورفین همچنین باعث مهار القا آپوپتوز با واسطه پراکسی نیتريت در آستروسیت های اولیه (۳۷) و تحریک تکثیر سلولی سلولهای اندوتلیال (۳۸)، فیبروبلاست های کلیه (۳۹) و نورونهای پیش سازی هیپوکامپ (۳۷) می شود. غلظت های  $10^{-12}$  -  $10^{-1}$  و  $10^{-4}$  مولار مورفین به ترتیب ایجاد کمترین و بیشترین فعالیت سیتوتوکسیسیته و القای اثر مرگ سلولی را در مقایسه با سایر غلظت های مورفین ایجاد کرده اما در مقایسه با سلول های کنترل (فاقد غلظت های مورفین) دارای اثرات جبرانی بر مرگ سلولی و سیتوتوکسیسیته بودند. بررسی فعالیت مهار کننده رسپتورهای اپیوئیدی (نالتروکسان) نشان داد که با پیش تیمار سلول ها توسط این مهارکننده، اثرات

## Protective Effects of Morphine on Serum Deprivation-induced Cell Death in PC12 Cells

H. Zhaleh (MSc)<sup>1</sup>, A. Bidmeshki Pour (PhD)<sup>1\*</sup>, M. Azadbakht (PhD)<sup>1</sup>, M.A. Haramshahi (MSc)<sup>1</sup>

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

J Babol Univ Med Sci; 15(6); Nov 2013; pp: 44-51

Received: Mar 9<sup>th</sup> 2013, Revised: May 1<sup>st</sup> 2013, Accepted: Jul 10<sup>th</sup> 2013.

### ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** Morphine is the most effective pain-relieving drugs in the management of pain. Morphine modulates survival and apoptosis of neural and tumoral cells. Some data suggest that morphine induces apoptosis in neurons, while other evidence shows that morphine could have beneficial effects against apoptosis. The present study was undertaken to evaluate the effects of different concentrations of morphine on serum deprivation-induced cell death in PC12 cells

**METHODS:** In this study PC12 cells (Pastour Insititue, Iran) were cultured in RPMI1640 culture medium supplemented with 0.2% BSA. Cells were divided to 2 groups (group I: cells unpretreated with naltrexone; group II: cells pretreated with naltrexone). There were six treatments in each group. Cells treated with different concentrations (The treatments were: treatment1:  $10^{-12}$ , treatment 2:  $10^{-10}$ , treatment 3:  $10^{-8}$ , treatment 4:  $10^{-6}$ , treatment 5:  $10^{-4}$ , Treatment 6: 0.0 M,) of morphine. The percentage of cytotoxicity by lactate dehydrogenase assay and the percentage of cell death by Hoechst/PI differential staining of each group were assessed.

**FINDINGS:** After 6 days, serum deprivation result in full cell death (100%) in PC12 cells ( $p < 0.05$ ). The percentage of cytotoxicity and cell death assessment showed that morphine at different concentration inhibited serum deprivation-induced cell death and cytotoxicity in PC12 cells ( $p < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Our results concluded that morphine with an opioid receptor-dependent as a growth factor lead to inhibition of serum deprivation-induced cell death in PC12 cells.

**KEY WORDS:** Apoptosis, Morphine, Serum, PC12.

\*Corresponding Author;

Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, Razi University, Bagh Abrisham St., Kermanshah, Iran

Tel: +98 831 4274545

E-mail: a.bidmeshkipour@gmail.com

## References

1. Amin F, Bowden ID, Szegedi Z, Mihalik R, Szende B. Apoptotic and non-apoptotic modes of programmed cell death in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Cell Biol Int* 2000;24(4):253-60.
2. Ceruti S, Beltrami E, Matarrese P, et al. A key role for caspase-2 and caspase-3 in the apoptosis induced by 2-chloro-2-deoxy-adenosine (cladribine) and 2-chloro-adenosine in human astrocytoma cells. *Mol Pharmacol* 2003;63(6):1437-47.
3. Sadoul R, Catsicas S, Martinou JC. Neuronal death: common mechanisms during development and disease. *Seminars Neurosci* 1994;6(5):343-6.
4. Robbins S, Cotran R, Kumar V. Robbins basis pathology. 7th ed. Boston: Harvard Medical School 2009; pp: 400-2.
5. Raff, M. C. Social controls on cell survival and cell death. *Nature (Lond.)* 1992 Apr 2;356(6368):397-400.
6. Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 1993;262(5134):695-700.
7. Barres BA, Hart IK, Coles HS, et al. Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 1992;70(1):31-46.
8. Martin DP, Schmidt RE, Distefano PS, Lowry OH, Carter JG, Johnson EM. Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. *J Cell Biol* 1988;106(3):829-44.
9. Birren SJ, Lo L, Anderson DJ. Sympathetic neuroblasts undergo a developmental switch in trophic dependence. *Development* 1993;119(3):597-610.
10. Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H. Opioid pharmacology. *Pain Physician* 2008;11(Suppl 2):133-53.
11. McClean G, Smith HS. Opioid for persistent noncancer pain. *Med Clin North Am* 2007;91(2):177-97.
12. Minami M, Onogi T, Nakagawa T, et al. DAMGO, a mu-opioid receptor selective ligand, distinguishes between mu- and kappa-opioid receptors at a different region from that for the distinction between mu- and delta-opioid receptors. *FEBS Lett* 1995;364(1):23-7.
13. 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.
14. Brown SM, Stimmel B, Taub RN, Kochwa S, Rosenfield R. Immunologic dysfunction in heroin addicts. *Arch Intern Med* 1974;134(6):1001-6.
15. Roy S, Loh HH. Effects of opioids on the immune system. *Neurochem Res* 1996;21(11):1375-86.
16. Minneman KP, Lee D, Zhong H, Berts A, Abbott KL, Murphy TJ. Transcriptional re- sponses to growth factor and G protein-coupled receptors in PC12 cells: Comparison of 1- adrenergic receptor subtypes. *J Neurochem* 2000;74(6):2392-400.
17. 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.
18. 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.
19. Cadet P, Rasmussen M, Zhu W, Tonnesen E, Mantione KJ, Stefano GB. Endogenous morphinergic signaling and tumor growth. *Front Biosci* 2004;9:3176-86.
20. 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.
21. Rukenstein A, Rydel RE, Greene LA. Multiple agents rescue PC12 cells from serum-free cell death by translation and transcription-independent mechanisms. *J Neurosci* 1991;11(8):2552-63.

22. Batistatou A, Greene LA. Aurintricarboxylic acid rescues PC12 cells and sympathetic neurons from cell death caused by nerve growth factor deprivation: correlation with suppression of endonuclease activity. *J Cell Biol* 1991;115(2):461-71.
23. Yuan W, Guo J, Li X, et al. Hydrogen peroxide induces the activation of the phospholipase C-g1 survival pathway in PC12 cells: protective role in apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin* 2009;41(8): 625-30.
24. Fujita K, Lazarovici P, Gurol'f G. Regulation of the differentiation of PC12 pheochromocytoma cells. *Environ Health Perspect* 1989;80: 127-42,
25. Batistatou A, Greene LA. Internucleosomal DNA cleavage and neuronal cell survival/death. *J Cell Biol* 1993;722(3):523-32.
26. Pittman RN, Wang S, Dibenedetto AJ, Mills JC. A system for characterizing cellular and molecular events in programmed neuronal cell death. *J Neurosci* 1993;13(9):3669-80.
27. Krause D, Lyons A, Fennelly C, O'Connor R. Transient activation of Jun N-terminal kinases and protection from apoptosis by the insulin-like growth factor I receptor can be suppressed by dicumarol. *J Biol Chem* 2001;276(22): 19244-52.
28. Levresse V, Butterfield L, Zentrich E, Heasley LE. Akt negatively regulates the cJun N-terminal kinase pathway in PC12 cells. *J Neurosci Res* 2000; 62(6):799-808.
29. Trapaidze N, Gomes I, Cvejic S, Bansinath M, Devi LA. Opioid receptor endocytosis and activation of MAP kinase pathway. *Brain Res Mol Brain Res* 2000;76(2):220-8.
30. Brock C, Schaefer M, Reusch HP, et al. Roles of G beta gamma in membrane recruitment and activation of p110 gamma/p101 phosphoinositide 3-kinase gamma. *J Cell Biol* 2003;160(1):89-99.
31. Maier U, Babich A, Nurnberg B. Roles of non-catalytic subunits in gbetagamma-induced activation of class I phosphoinositide 3-kinase isoforms beta and gamma. *J Biol Chem* 1999;274(41):29311-7.
32. Madrid LV, Wang CY, Guttridge DC, Schottelius AJ, Baldwin ASJr, Mayo MW. Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB. *Mol Cell Biol* 2000;20(5):1626-38.
33. Polakiewicz RD, Schieferl SM, Gingras AC, Sonenberg N, Comb MJ. Mu-opioid receptor activates signaling pathways implicated in cell survival and translational control. *J Biol Chem* 1998;273(36):23534-41.
34. Belcheva MM, Haas PD, Tan Y, Heaton VM, Coscia CJ. The fibroblast growth factor receptor is at the site of convergence between mu-opioid receptor and growth factor signaling pathways in rat C6 glioma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;303(3):909-18.
35. Tegeder I, Geisslinger G. Opioids as modulators of cell death and survival-unraveling mechanisms and revealing new indications. *Pharmacol Rev* 2004;56(3):351-69.
36. Persson AI, Thorlin T, Bull C, Eriksson PS. Opioid-induced proliferation through the MAPK pathway in cultures of adult hippocampal progenitors. *Mol Cell Neurosci* 2003;23(3):360-72.
37. Moon TD. The effect of opiates upon prostatic carcinoma cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;153(2):722-7.
38. Ni X, Lin BC, Song CY, Wang CH. Dynorphin A enhances mitogen-induced proliferative response and interleukin-2 production of rat splenocytes. *Neuropeptides* 1999;33:137-43.
39. Law PY, Bergsbaken C. Properties of delta opioid receptor in neuroblastoma NS20Y: receptor activation and neuroblastoma proliferation. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;272(1):322-32.