اثر مورفین بر فاگوسیتوز بیگانه‌خوارهای صفاق موش

هدایت الله شیرزاد[۱]؛ راحیل افتخاری[۱]؛ ندا سلیمانی[۱]؛ رضا میرزایی[۱]؛ ابوالفضل خوشدل[۲]؛ محمود رفیعیان کوپایی[۳]*

چکیده

زمینه: با توجه به وجود گزارشاتی مبنی بر تشدید مواردی از عفونت‌ها در مصرف‌کنندگان مورفین، این مطالعه با هدف بررسی تأثیر مورفین بر عمکرد بیگانه خوارهای صفاق موش سوری انجام شد.

روش‌ها: ۵۶ سر موش Balb/c ماده، با سن ۸-۶ هفته و با وزن ۲±۲۸ گرم به دو گروه تقسیم شدند. به گروه مورد در روزهای اول تا چهارم در دو نوبت صبح و عصر به‌ترتیب مقادیر ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مورفین و ۱۰۰ میلی‌گرم یکبار در روزهای پنجم تا دهم با حجم نهایی ۰/۵ میلی‌لیتر، به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید. به گروه شاهد در همان دوره زمانی، میزان ۰/۵ میلی‌لیتر نرمال‌سالین تزریق شد. سپس در ۳ مرحله، در روزهای ۳، ۵ و۱۰ پس از تجویز مورفین، موش‌ها را کشته و محتویات صفاق آسپیره و سپس با گلبول‌های قرمز گوسفندی (SRBC)، مخلوط گردیدند. تعداد بیگانه خوارهای فاگوسیت‌کننده گلبول قرمز با استفاده از میکروسکوپ نوری تعیین و در دو گروه با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج: تعداد بیگانه خوارهای فاگوسیت‌کننده گلبول قرمز در گروه مورد در مقایسه با گروه شاهد در روز دهم (کشتار مرحله سوم) به‌طور معناداری کاهش داشت ($P<۰/۰۳۱$).

نتیجه‌گیری: تجویز مورفین به‌مدت ده روز فعالیت بیگانه خوارهای صفاق را در موش Balb/c کاهش می‌دهد. لذا در بیمارانی که تضعیف سیستم ایمنی خطرناک است بایستی با احتیاط مصرف شود یا از داروهای جانشین استفاده گردد.

کلیدواژه‌ها: بیگانه خواری، موش، ماکروفاژ، مورفین.

«دریافت: ۱۳۹۰/۵/۲ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۶»

۱. مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

۲. مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

۳. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

* **عهده‌دار مکاتبات:** شهر کرد، رحمتیه، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، تلفن: ۳۳۴۶۶۹۲-۰۳۸۱

Email: rafieian@skums.ac.ir, rafieian@yahoo.com

مقدمه

اپیوئیدها قوی‌ترین داروهای موجود برای تسکین درد محسوب می‌شوند (۱ و ۲) و مورفین به‌عنوان یک انتخاب مناسب جهت تسکین درد به‌خصوص در بیماران سرطانی به‌کار می‌رود (۳ و ۴). بر اساس تحقیقات متعدد، مشخص شده است که افراد معتاد به مورفین، در مقایسه با افراد غیر معتاد، نسبت به عفونت آسیب‌پذیری بیشتری دارند. علاوه بر استفاده مشترک از سوزن‌های آلوده، وقوع عفونت بیشتر در این افراد، به اثرات تنظیم‌کنندگی مورفین بر روی سیستم ایمنی مربوط می‌شود (۵ و ۶).

اخیراً گزارش شده که مورفین باعث کاهش فعالیت و مهاجرت نوتروفیل‌ها و همچنین القاء آپوپتوز ماکروفاژها می‌شود (۱۰-۷). این دارو ممکن است با افزایش آپوپتوز ماکروفاژها در بیماران معتاد، به‌طور مستقیم سبب اختلال عملکرد سیستم ایمنی شود (۸، ۹ و ۱۱).

نشان داده شده که پپتیدهای اپیوئیدی اندوژن مانند بتا-اندرفین، اثر مهاری بر پرولیفراسیون سلول‌های T داشته (۱۲) و مورفین نیز تولید سیتوکین‌ها را کاهش می‌دهد (۱۳). مورفین در حیوانات آزمایشگاهی باعث افزایش ابتلا به برخی از عفونت‌های میکروبی و انگلی

مانند استرپتوکک پنومونیه (۱۴)، کلبسیلا پنومونیه (۱۵) و توکسوپلاسماگوندی (۱۶) شده است. بنابراین به‌نظر می‌رسد مصرف مورفین باعث تضعیف سیستم ایمنی می‌گردد. تضعیف سیستم ایمنی به‌خصوص در افرادی که دچار بیماری‌های عفونی شده‌اند می‌تواند خطرناک باشد لذا بررسی دقیق‌تر تأثیر مورفین بر سیستم ایمنی اهمیت زیادی دارد.

یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های دفاعی میزبان در برابر تهاجم میکروارگانیزم‌ها، فاگوسیتوز است که به‌وسیله کشتن و هضم داخل سلولی میکروارگانیزم‌ها توسط سلول‌های فاگوسیت‌کننده انجام می‌شود (۱۷، ۱۸). با توجه به اهمیت سیستم فاگوسیتی در دفاع علیه میکروارگانیزم‌ها و همچنین نظر به استفاده گسترده از مورفین و مشتقات آن در بیمارستان‌ها، از طرفی دیگر مطرح بودن تضعیف سیستم ایمنی در افراد معتاد و این‌که عمده اطلاعات به‌دست‌آمده بر روی بیگانه‌خواری مبتنی بر مطالعات اینویترو بوده است، لذا در این تحقیق، اثر تزریق مورفین بر عملکرد فاگوسیتوز بیگانه‌خوارهای جدا شده از صفاق موش Balbc بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر یک مطالعه تجربی است که برای انجام آن ۵۶ سر موش Balb/c با سن ۸-۶ هفته و وزن ۲±۲۸ گرم (خریداری شده از انستیتو رازی ایران) به دو گروه مساوی ۲۸تایی مورد و شاهد تقسیم شدند. به گروه مورد، دوزهای مختلف مورفین و به گروه شاهد، نرمال‌سالین تزریق شد. با توجه به احتمال تأثیر جنس حیوان در میزان فاگوسیتوز، به‌منظور حذف این عامل مداخله‌گر، جنس مذکر حیوان از این مطالعه حذف و موش‌ها فقط از جنس ماده انتخاب شدند.

برای تهیه سرم حاوی Mouse anti Sheep RBC، در ابتدا تعداد $۱۰^{۵}$ گلبول قرمز گوسفند (تهیه‌شده از دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد) در سه نوبت و به فاصله زمانی سه روز زیر پوست ناحیه سینه موش تزریق شد. سپس تمام خون حیوان از طریق قلب با سرنگ آسپیره و سرم آن پس از لخته شدن خون در محیط آزمایشگاه جدا گردید. سرم‌ها بدون تغییر تا انجام آزمایشات در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند (۱۹).

در ادامه تجویز مورفین به موش‌ها انجام شد. به گروه مورد در روزهای اول تا چهارم در دو نوبت صبح و عصر به‌ترتیب مقادیر ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مورفین و ۱۰۰ میلی‌گرم یک‌بار در روزهای پنجم تا دهم با حجم نهایی ۰/۵ میلی‌لیتر، به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید (۲۰). به گروه شاهد در همان مدت‌زمان، میزان ۰/۵ میلی‌لیتر نرمال‌سالین تزریق شد.

در ۳ مرحله کشتار، در روزهای ۳، ۵ و ۱۰ پس از تجویز، تعداد ۷ رأس موش از هر گروه مورد و شاهد از طریق قطع نخاع کشته شدند، پوست ناحیه شکم کنار زده شد و ۵cc محیط کشت سلولی DMEM (Dulbecco's Mod-Eagle-Medium) حاوی سرم گوساله به داخل صفاق تزریق گردید. مایع موجود در حفره صفاقی به‌وسیله سرنگ، آسپیره و سانتریفیوژ گردید. پس از شستشو در PBS (محلول بافر فسفات ۷/۲) بیگانه‌خوارهای صفاق موش به‌طور جداگانه با تعداد ۵×۱۰^{۸} گلبول قرمز گوسفندی که قبلاً به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۱۰ درصد آنتی‌بادی ضد گلبول‌های قرمز موشی اپسونیزه شده بودند، در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به‌مدت نیم ساعت بر روی روتاتور (یک دور در دقیقه) انکوبه شدند. پس از انجام انکوباسیون، مخلوط سلولی دو بار توسط محلول سرد HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) شستشو داده شد. ۲۰ میکرولیتر از مخلوط سلولی توسط سایتو سانتریفیوژ روی لام سانتریفیوژ شده و مستقیماً مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفت (۱۹).

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و با آزمون t مستقل تحلیل شدند. مقدار $P<۰/۰۵$ از نظر آماری معنادار تلقی گردید.

یافته‌ها

بر اساس تعداد SRBCهای بلعیده‌شده در ۱۰۰ بیگانه‌خوار موجود در لام مربوط به کشتار اول، مشخص شد که ۱۸ درصد بیگانه‌خوارها بیش از ۴ عدد SRBC، ۴۳ درصد آن‌ها ۳-۲ عدد SRBC و ۳۹ درصد فقط یک SRBC بلعیده بودند. در گروه شاهد این مقادیر به‌ترتیب ۴۳ درصد، ۲۲ درصد و ۳۵ درصد به‌دست آمد (P<۰/۰۳۱) (جدول ۱).

اگر در شدت فاگوسیتوز، تعداد ماکروفاژهایی که بیشتر از ۴ گلبول قرمز بلعیده‌اند را موارد شدید، آن‌هایی که ۲ و ۳ گلبول قرمز بلعیده‌اند را موارد متوسط و آن‌هایی که کم‌تر یا مساوی یک گلبول قرمز بلعیده‌اند را موارد خفیف تعریف کنیم، در مجموع موارد شدید در گروه مورد کم‌تر از گروه شاهد بوده است (P<۰/۰۵).

در خصوص میزان فاگوسیتوز (یعنی تعداد بیگانه‌خوارهایی که عمل فاگوسیتوز را انجام داده بودند)، نتایج نشان داد که میانگین و انحراف‌معیار تعداد بیگانه، در گروه مورد در نمونه‌های (کشتار) اول، دوم و سوم به‌ترتیب ۶±۱۱، ۳±۱۴، ۸±۲۲ و در گروه شاهد به‌ترتیب ۹±۱۸، ۱۱±۱۹ و ۲±۳۲ بود. داده‌ها نشان داد که گرچه میزان فاگوسیتوز در هر سه مورد نمونه‌گیری تفاوت داشت، ولی فقط در نمونه‌گیری سوم میزان فاگوسیتوز در گروه مورد کم‌تر از گروه شاهد بود (P<۰/۰۳۱) (جدول ۲).

جدول ۱- شدت فاگوسیتوز[a] بیگانه‌خوارهای صفاقی موش Balb/c پس از مواجهه باگلبول قرمز گوسفندی (SRBC)

گروه	تعداد SRBC بلعیده شده توسط بیگانه خوارها	درصد بیگانه خوارهای حاوی SRBC در هر کشتار		
		کشتار اول	کشتار دوم	کشتار سوم
مورد	>۴	۱۸٪[a]	۲۱٪	۱۲٪
	۳ و۲	۴۳٪	۴۳٪	۳۴٪
	۱	۳۹٪	۳۶٪	۵۴٪
شاهد	>۴	۴۳٪[b]	۴۰٪	۲۰٪
	۳ و ۲	۲۲٪	۳۵٪	۷۱٪
	۱	۳۵٪	۲۵٪	۹٪

[a]شدت فاگوسیتوز: تعداد SRBCهای بلعیده شده توسط ۱۰۰ بیگانه‌خوار مشاهده شده در هر لام که عمل فاگوسیتوز را انجام داده بودند.

*P<0.011 بین a و b (n=7).

جدول۲- میانگین تعداد بیگانه‌خوارهای صفاق موش Balb/c حاوی گلبول قرمز گوسفندی (SRBC) در یکصد سلول صفاقی شمارش‌شده در نمونه‌های جدا شده از موش‌های مورد مطالعه

گروه	نوبت کشتار		
	کشتار اول	کشتار دوم	کشتار سوم
مورد	۶±۱۱	۳±۱۴	۸±۲۲
شاهد	۹±۱۸	۱۱±۱۹	۲±۳۲
Pvalue	>۰/۰۶۵	>۰/۰۹	<۰/۰۳۱

بحث

هدف این مطالعه بررسی تأثیر مورفین بر عمکرد بیگانه‌خوارهای صفاق موش سوری بود. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده مشخص شد که میزان فاگوسیتوز تنها در کشتار سوم در گروه مورد به‌طور معناداری کم‌تر از گروه شاهد است. این مسأله ضمن تأیید اثر تضعیفی مورفین بر سیستم ایمنی، نشان می‌دهد که مورفین ممکن است در کوتاه‌مدت و در موارد تک‌دوز بر این سیستم بی‌تأثیر

باشد. در تأیید این ادعا در مطالعه‌ای مورفین تجویزشده به‌مدت ۴۲ روز به‌صورت ۴ روز در میان تأثیری بر پاسخ هومورال به آنتی‌ژن باکتری و ویروسی و مقاومت حیوان نسبت به میکروب‌هایی که نسبت به آن‌ها ایمن شده بود نداشته است (۲۱).

نتایج مطالعه‌ای که اخیراً منتشر شده نشان می‌دهد که تجویز مورفین در دوزهای بالا و وابسته به دوز، باعث افزایش حساسیت موش سوری نسبت به عفونت لیشمانیا ماژور می‌شود (۲۲). مطالعه Rouveix نیز بیان کرده که مورفین در غلظت فارموکولوژیک ایمنی سلولی، تولید آنتی‌بادی توسط سلول‌های B وابسته به سلول T و تکثیر و فعالیت این سلول‌ها را کاهش می‌دهد (۲۳). مطالعه Levier نیز کاهش عمل فاگوسیتوز در ماکروفاژهای کبد و طحال موش را ۱۸ ساعت پس از تزریق مورفین گزارش و اعلام کرده که این اثر، ۴۸ ساعت دوام داشته است (۲۴).

مطالعه West نیز سرکوب فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی (NK) را توسط مورفین گزارش کرده است (۲۵). نتایج فوق همگی نشان‌دهنده کاهش فعالیت سیستم ایمنی می‌باشد که با نتایج این مطالعه هماهنگی دارد. کاهش شرکت فاگوسیت‌ها در عمل فاگوسیتوز در مطالعه حاضر را می‌توان به تأثیر مورفین بر روی سیستم سیتواسکلتی که جابه‌جایی سلول‌های فاگوسیتی را بر عهده دارد نسبت داد (۲۶). همین‌طور تغییر در رسپتورهای سطح سلولی، تغییرات در محیط بیوشیمیایی داخل سلول و آشفته کردن تنفس سلولی می‌توانند به‌عنوان عوامل کاهش‌دهنده فاگوسیتوز محسوب شوند. در این شرایط گرچه فاگوسیت‌ها در محل وجود دارند ولی قادر به انجام عمل فاگوسیتوز نیستند (۸).

البته لازم به ذکر است که اثر تضعیفی مورفین فقط بر برخی عفونت‌ها و نژادها مشاهده شده است. تجویز موضعی تریاک در محل زخم سالک در انسان، اثر محسوسی در بهبود زخم سالک نداشته است (۲۶). در مطالعه‌ای دیگر نیز تجویز مورفین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌مدت ۱۴ روز، باعث افزایش حساسیت موش‌های سوری نسبت به عفونت به لیستریا مونوسیتوژنز و سالمونلا انتری تیدیس و همچنین انتشار عفونت و مرگ و میر بیشتر حیوان شده است در حالی‌که تأثیری بر حساسیت حیوان نسبت به شیگلا فلکس نری و اشریشیاکلی نداشته است (۲۷). نتیجه این‌که احتمالاً اثر مورفین بر سیستم ایمنی متفاوت است و در همه موارد نتایج آزمایشگاهی و حیوانی را نمی‌توان به انسان تعمیم داد.

همچنین تجویز دوزهای ۲۰-۵ میلی‌گرم مورفین در موش‌های صحرایی به‌صورت وابسته به دوز سبب افزایش واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری و افزایش تولید اینتر فرون گاما شده است (۲۸). این مسأله نشان‌دهنده این است که اثر مورفین بر سیستم ایمنی به اثر بر بیگانه‌خوارها محدود نمی‌شود. در ضمن اثر مورفین در تک‌دوزهای پایین در مواردی تشدیدکننده سیستم ایمنی بوده است (۲۲) ولی در اکثر موارد، تجویز مورفین در دوزهای متعدد و یا در حیوانات معتاد باعث تشدید عفونت شده که با نتایج این مطالعه مبنی بر کاهش بیگانه‌خواری در موش‌های تحت دوزهای متعدد مورفین هماهنگی دارد.

نتیجه‌گیری

هم تعداد سلول‌های بیگانه‌خوار شرکت‌کننده در فاگوسیتوز و هم تعداد SRBCهای بلعیده شده توسط این سلول‌ها تحت تأثیر مورفین کاهش می‌یابد که نشان‌دهنده کاهش فعالیت سیستم ایمنی است. لذا در بیمارانی که تضعیف سیستم ایمنی خطرناک است بایستی با احتیاط مصرف شود یا از داروهای جانشین استفاده گردد. البته عدم تأثیر دوزهای اولیه بر فاگوسیتوز در این مطالعه ممکن است نشان‌دهنده این موضوع باشد که این احتیاط در مصرف کوتاه‌مدت و به‌خصوص در موارد مصرف تک‌دوز مورفین موردی ندارد.

References

1. Radbruch L, Nauck F. Morphine and alternative opioids in cancer pain: the EAPC recommendations. Schmerz. 2002;16(3):186-93.
2. Anthony D, Jasinski DM. Postoperative pain management: morphine versus ketorolac. J Perianesth Nurs. 2002;17(1):30-42.
3. Brownstein MJ. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90(12):5391-3.
4. Donnelly S, Davis MP, Walsh D, Naughton M. Morphine in cancer pain management: a practical guide. Support Care Cancer. 2002;10(1): 13-35.
5. Arora PK. Morphine-induced immune modulation: does it predispose to HIV infection? NIDA Res Monogr. 1990; 96: 150-65.
6. Roy S, Wang J, Kelschenbach J, Koodie L, Martin J. Modulation of immune function by morphine: implications for susceptibility to infection. J Neuroimmune Pharmacol. 2006; 1(1): 77-89.
7. Rahim RT, Meissler JJ, Zhang L, Adler MW, Rogers TJ, Eisenstein TK. Withdrawal from morphine in mice suppresses splenic macrophage function, cytokine production, and costimulatory molecules. J Neuroimmunol. 2003; 144(1-2): 16-27.
8. Menzebach A, Hirsch J, Nost R, Mogk M, Hempelmann G, Welters ID. Morphine inhibits complement receptor expression, phagocytosis and oxidative burst by a nitric oxide dependent mechanism. Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther. 2004; 39(4): 204-11.
9. Singhal PC, Sharma P, Kapasi AA, Reddy K, Franki N, Gibbons N. Morphine enhances macrophage apoptosis. J Immunol. 1998; 160(4): 1886-93.
10. Sacerdote P. Opioids and the immune system. Palliat Med. 2006;20 Suppl 1:s9-15.
11. Weed MR, Carruth LM, Adams RJ, Ator NA, Hienz RD. Morphine withdrawal dramatically reduces lymphocytes in morphine-dependent macaques. J Neuroimmune Pharmacol. 2006; 1(3): 250-9.
12. Manfredi B, Sacerdote P, Bianchi M, Locatelli L, Veljic-Radulovic J, Panerai AE. Evidence for An opioid inhibitory effect on T Cell proliferation. J Neuroimmunol. 1993; 44(1): 43-8.
13. Singal P, Singh PP. Leishmania Donovani Amastigote Component-Induced Colony-Stimulating Factor Production By Macrophages: Modulation By Morphine. Microbes Infect. 2005; 7(2): 148-56.
14 Wang J, Barke RA, Charboneau R, Roy S. Morphine Impairs Host Innate Immune Response and Increases Susceptibility To Streptococcus Pneumoniae Lung Infection. J Immunol. 2005; 174(1): 426-34.
15. Tubaro E, Borelli G, Croce C, Cavallo G, Santiangeli C. Effect Of Morphine On Resistance To Infection. J Infect Dis. 1983; 148(4): 656-66.
16 Chao CC, Sharp BM, Pomeroy C, Filice GA, Peterson PK. Lethality Of Morphine In Mice Infected With Toxoplasma Gondii. J Pharmacol Exp Ther. 1990; 252(2): 605-9.
17. Singh PP, Singal P. Morphine-induced neuroimmunomodulation in murine visceral leishmaniasis: the role(s) of cytokines and nitric oxide. J Neuroimmune Pharmacol. 2007; 2(4): 338-51.
18. Bhat RS, Bhaskaran M, Mongia A, Hitosugi N, Singhal PC. Morphine-induced macrophage apoptosis: oxidative stress and strategies for modulation. J Leukoc Biol. 2004; 75(6):1131-8
19. Shirzadeh H, Clarke GR, McNeil HP, Hongwei W, Burton RC, Smart YC. An IL-3 induced spelenic NC-1.1+ mast cell line mediate natural cytotoxicity independent of TNF-a. Cellular Immunology1996; 174: 147-54.
20. Rafieian-Kopaei M, Sewell RDE. Opioid tolerance and K ATP channel mediated antinociception. Analgesia. 1995; 1(4-6): 667-70.
21. Molitor TW, Morilla A, Risdahl JM, Murtaugh MP, Chao CC, Peterson PK. Chronic morphine administration impairs cell mediated immune responses in Swine. J Pharmacol Exp Ther. 1992; 260(2): 581-6
22. Gorgin Karaji A, Shabani S, Akbari M. Effect of morphine on leishmania major infection in BALB/c and C57BL/6 mouse strains (Persian). Journal of Guilan University of Medical Sciences. 2011; 20 (78): 1-7.
23. Rouveix B. Opiates and immune function. Consequences on infectious diseases with special reference to AIDS. Therapie. 1992; 47(6): 503-12.
24. Levier DG, Brown RD, McCay JA, Fuchs BA, Harris LS, Munson AE. Hepatic and splenic phagocytosis in female B6C3F1 mice implanted with morphine sulfate pellets. J Pharmacol Exp Ther. 1993; 267(1): 357-63.
25. Bosshart H. Morphine-mediated suppression of phagocytosis. Int Immunopharmacol. 2009; 10(2): 264-5.
26. Marie-Claire C, Courtin C, Roques BP, Noble F. Cytoskeletal genes regulation by chronic morphine treatment in rat striatum. Neuropsychopharmacology. 2004; 29(12): 2208-15.
27. Asakura H, Kawamoto K, Igimi S, Yamamoto S, Makino S. Enhancement of mice susceptibility to infection With listeria monocytogenes by the treatment of morphine. Microbiol Immunol. 2006; 50(7):543-7.
28. Nelson CJ, How T, Lysle DT. Enhancement of the contact hypersensitivity reaction by acute morphine administration at the elicitation phase. Clin Immunol. 1999; 93(2): 176-83