

تأثیر تجویز روزانه مورفین بر عفونت لیشمانیوز در موش‌های آزمایشگاهی*

علی گرگین کرجی^{1*}؛ مهین اکبری²؛ سمیه شعبانی²؛ غلامرضا بهرامی³

چکیده

زمینه: این مطالعه به منظور ارزیابی اثر تجویز مزمن مورفین بر عفونت با لیشمانیا ماژور، در دو نژاد موش BALB/c و C57BL/6 که به ترتیب حساس و مقاوم به عفونت با این انگل هستند، انجام گردید.

روش‌ها: تزریق مورفین از یک هفته قبل از تلقیح انگل و به صورت زیرجلدی و در دو نوبت در روز با فاصله 12 ساعت انجام گرفت. گروه اول هر نژاد، مورد تزریق 1/5mg/kg مورفین، گروه دوم 15mg/kg مورفین و به گروه کنترل، سالیین تجویز شد. پس از ظهور واکنش موضعی، هفته‌ای یکبار ضخامت پای مورد تزریق انگل و پای مقابل اندازه‌گیری شد. در پایان، حیوانات کشته شده و سلول‌های طحال و غده لنفی آن‌ها در حضور کونکاناوالین A کشت داده شد و سطح اینترلوکین-4 مایع رویی آن‌ها تعیین گردید.

یافته‌ها: در موش‌های C57BL/6، واکنش موضعی در پای مورد تزریق انگل تا هفته پنجم افزایش یافت، سپس شروع به کاهش نموده و به وضعیت نرمال بازگشت. در مقابل، در موش‌های BALB/c، واکنش موضعی تا پایان آزمایش همچنان افزایش یافته و در برخی موارد منجر به نکروز گردید. در هر دو نژاد، تفاوت معناداری در اندازه واکنش موضعی بین گروه‌های تست و کنترل مشاهده نشد. همچنین تفاوت معناداری در سطح تولید اینترلوکین-4 بین گروه‌های تست و کنترل در هر دو نژاد مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: تجویز مزمن مورفین، تأثیر محسوسی بر مقاومت نژاد C57BL/6 و حساسیت نژاد BALB/c به عفونت با لیشمانیا ماژور نداشت، که احتمالاً ناشی از تحمل سیستم ایمنی نسبت به اثرات مورفین باشد.

کلیدواژه‌ها: مورفین، لیشمانیوز، تجویز مزمن، موش BALB/c، موش C57BL/6

«دریافت: 1389/2/5 پذیرش: 1389/5/26»

1. گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه و عضو مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی

2. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

3. گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

*عهده‌دار مکاتبات: کرمانشاه، میدان دانشگاه، خیابان دانشگاه، دانشکده پزشکی، گروه ایمنولوژی، تلفن: 21-08314274618، فکس: 08314276423

Email: ali4459@gmail.com

* این مقاله برگرفته از پایان‌نامه مقطع دکترای حرفه‌ای داروسازی خانم‌ها مهین اکبری و سمیه شعبانی در دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه می‌باشد.

مقدمه

خشک و نوع روستایی یا مرطوب. نوع شهری، دوره کمون طولانی داشته، پاپول‌های جلدی واجد تعداد کمی انگل بوده و تا چند ماه در پوست باقی می‌ماند تا به زخم تبدیل شود. عامل نوع شهری لیشمانیا تروپیکا است و راه طبیعی انتقال آن از انسان به انسان و به وسیله پشه خاکی یا انتقال مستقیم است. اما در نوع روستایی، دوره کمون کوتاه‌تر بوده، پاپول‌ها سریعاً به زخم تبدیل می‌شوند، حاوی تعداد زیادی انگل هستند و معمولاً زود بهبود

لیشمانیوز یک بیماری انگلی ناشی از عفونت با تک‌یاخته لیشمانیا است. این بیماری از طریق خونگیری پشه خاکی (sandfly)، به انسان یا حیوان منتقل می‌شود. لیشمانیا، انگل اجباری داخل سلولی است و پس از بلع توسط ماکروفاژها، در مقابل مکانیسم‌های انهدامی آن‌ها مقاومت کرده و اغلب در این سلول‌ها رشد و تکثیر پیدا می‌کند. لیشمانیوز جلدی دو نوع است: نوع شهری یا

(GM-CSF) می‌شود، دوز بالای آن کاهش تولید این سیتوکین‌ها را در پی دارد (10). همچنین مطالعات نشان داده است که مورفین در حیوانات آزمایشگاهی، موجب حساسیت نسبت به برخی عفونت‌های میکروبی شامل لیستریا منوسیتوزنز (11)، استرپتوکوک پنومونیه (12)، کلبسیلا پنومونیه (13) و توکسوپلازما گوندی (14) می‌شود، اما تأثیری بر عفونت حاصل از باکتری‌های دیگر ندارد (11 و 15). با این وجود هنوز مطالعه‌ای در خصوص اثر مورفین بر عفونت ناشی از انگل لیشمانیا ماژور انجام نشده است. با توجه به این‌که بیماری لیشمانیوز به‌ویژه لیشمانیوز جلدی، مشکلی جهانی و یک مشکل بهداشتی در کشور ما است و از طرف دیگر، مورفین و مشتقات آن علاوه بر مصارف پزشکی، به‌صورت گسترده‌ای مورد سوء مصرف قرار می‌گیرند، مطالعه حاضر به‌منظور بررسی اثر تجویز مزمن مورفین بر حساسیت موش‌های نژاد C57BL/6 و BALB/c به عفونت با لیشمانیا ماژور انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از موش‌های نژاد C57BL/6 و نژاد BALB/c در محدوده وزنی به‌ترتیب 16-18gr و 18-20gr و محدوده سنی 6-8 هفته استفاده شد. تمام موش‌ها از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. حیوان‌ها در حیوانخانه با درجه حرارت محیط (2±22 درجه سانتی‌گراد) و سیکل نوری استاندارد (12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی) نگهداری شده، به آب و غذای کافی دسترسی داشته و از بستر استریل‌شده برخوردار بودند. حیوانات قبل از شروع آزمایش به‌مدت 2 هفته در حیوانخانه نگهداری شدند تا با شرایط جدید تطابق پیدا کنند. موش‌های هر نژاد به 3 گروه و هرگروه شامل 5-6 سر موش تقسیم شدند.

انگل لیشمانیا ماژور نیز از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید و در محیط کشت RPMI 1640 تقویت شده با 20

می‌یابند. عامل نوع روستایی لیشمانیا ماژور است و مخزن این انگل، جوندگان هستند. انگل از جوندگان و به‌وسیله پشه خاکی به انسان منتقل می‌شود (1). عفونت پوستی موش با *Leishmania major* یک مدل تجربی از بیماری مزمن پوستی حاصل از یک پارازیت داخل سلولی است (2). اغلب نژادهای موش، مانند نژادهای CH3، CBA و C57BL/6 به عفونت با لیشمانیا مقاوم هستند. در مقابل، نژادهای دیگر مانند BALB/c به این انگل حساس بوده و به‌دنبال آلودگی با این انگل، زخم‌های پوستی بزرگ و غیربهبودیابنده در آن‌ها تشکیل می‌شود که در نهایت منجر به گسترش انگل در تمام بدن حیوان و مرگ آن می‌گردد (3 و 4).

نژادهای مقاوم موش به هنگام عفونت با این انگل، پاسخ ایمنی‌بخش از نوع T helper1 (Th1) بروز می‌دهند که با فعال‌سازی ماکروفاژها موجبات حذف انگل و بهبودی از عفونت را فراهم می‌سازد. مشخصه این نوع پاسخ ایمنی، تولید مقادیر زیاد اینترفرون-گاما (IFN- γ) است. در مقابل، موش‌های حساس (مانند BALB/c)، پاسخ نوع T helper2 (Th2) ایجاد می‌کنند که اغلب سبب تولید آنتی‌بادی بر علیه انگل می‌شود، ولی این پاسخ ایمنی‌بخش نبوده و قادر به کنترل عفونت لیشمانیا نیست. مشخصه این نوع پاسخ، تولید مقادیر زیاد اینترلوکین-4 (IL-4) است (5-7).

ترکیبات اپیوئیدی از جمله مورفین ارگان‌ها و فعالیت‌های مختلف بدن از جمله اعمال سیستم ایمنی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بررسی‌ها نشان داده است که پپتیدهای اپیوئیدی اندوژن مانند β -اندورفین، اثرات مهارتی بر پاسخ‌های ایمنی سلولی اعمال می‌کنند (8). مورفین نیز فعالیت‌های سیستم ایمنی را تحت تأثیر قرار داده و سبب مهار برخی اعمال ایمنی می‌شود (9). با این وجود، غلظت‌های مختلف مورفین، اثرات متفاوتی بر سیستم ایمنی دارند درحالی‌که دوز پایین مورفین سبب افزایش تولید (M-CSF) Monocyte-colony stimulating factor و Granulocyte-Monocyte-colony stimulating factor

/(ضحامت پای مقابل)- (ضحامت پای مورد تزریق انگل)]
 $100 \times$ [(ضحامت پای مقابل)

به این ترتیب، درصد افزایش ضخامت پای مورد تزریق انگل به‌عنوان معیاری از افزایش اندازه واکنش در طول دوره اندازه‌گیری تعیین گردید (26).

11 هفته پس از تلقیح انگل، موش‌ها کشته شده و طحال و غده لنفی پوپلیتال پای آلوده آن‌ها در شرایط استریل خارج گردید. سپس زیر هود لامینال فلو، طحال و غده لنفی به‌صورت جداگانه از یک Mesh (Cell strainer) با منافذ به قطر 70nm عبور داده شدند تا سلول‌های آن‌ها از هم تفکیک شده و جدا شوند. در مرحله بعد، اریتروسیت‌ها به‌کمک بافر ACK (15M NHCO_3 ، 1M KHCO_3 ، 0/01M Na-EDTA و PH=7/4) لیز شده و سوسپانسیون سلولی حاصل، شستشو شده و شمارش گردید. سلول‌ها به تعداد 5×10^5 سلول در حجم نهایی 200 میکرولیتر در محیط RPMI 1640 تقویت شده با 10 درصد سرم جنین گاوی (FBS)، 100U/ml پنی‌سیلین، 100g/ml استرپتومایسین، 2mM ال-گلوتامین و 40mM بافر HEPES، در میکروپلیت‌های 96 چاهکی در حضور میتوزن کونکاناوالین A (Con A) به مدت 48 ساعت در دمای 37°C و فشار 5 درصد CO_2 کشت داده شدند (27 و 28). در پایان، مایع رویی پلیت‌ها به پلیت دیگری منتقل و تا زمان انجام آزمایش الیزا در دمای 20°C - نگهداری شد.

در ادامه، سطح IL-4 در مایع رویی پلیت‌های کشت، به‌روش الیزا اندازه‌گیری شد. سطح IL-4 با استفاده از کیت شرکت BD Pharmingen (San Diego, CA) و بر اساس دستورالعمل آن شرکت اندازه‌گیری شد (29). به‌طور خلاصه، ابتدا آنتی‌بادی منوکلونال ضد IL-4 (anti-IL-4 capture monoclonal antibody) به پلیت پلی‌استیرن 96 چاهکی اضافه گردید تا جذب چاهک‌ها گردد. سپس مایع رویی کشت‌های سلولی اضافه گردید تا IL-4 موجود در نمونه به این آنتی‌بادی متصل شود. پس از آن آنتی‌بادی منوکلونال آشکارساز ضد IL-4

درصد سرم جنین گاوی (FBS)، 10mM بافر هپس، 2 mM ال-گلوتامین، 2 گرم Na HCO_3 ، 10000Unit/ml پنی‌سیلین و 100 $\mu\text{g/ml}$ استرپتومایسین کشت داده شد (16-18). کد بین‌المللی انگل مورد استفاده در این مطالعه، MRHO/IR/75/ER بود.

برای آلوده‌سازی حیوانات از پروماستیگوت انگل لیشمانیا ماژور در فاز ایستایی رشد استفاده شد. فاز ایستایی، زمانی است که انگل حداکثر رشد را پشت سر گذاشته و رشد آن متوقف شده باشد. به هر حیوان یک میلیون پروماستیگوت لیشمانیا ماژور به‌کمک سرنگ هاملتون در حجم 50 μl به‌صورت زیرجلدی به کف یک پای عقبی تزریق شد (19-21).

برای تجویز دارو در این تحقیق، از داروی مورفین سولفات (شرکت داروپخش ایران) که برای مقاصد پزشکی مصرف می‌شود، استفاده گردید. تجویز دارو از یک هفته قبل از تجویز انگل شروع شده و در دو دوز مختلف (1/5mg/kg و 15mg/kg)، دو بار در روز، با فاصله 12 ساعت و از یک هفته قبل از تجویز انگل به مدت 12 هفته انجام گردید. یک گروه از موش‌های هر نژاد، مورد تزریق 1/5mg/kg مورفین و گروه دیگر تحت تجویز 15mg/kg مورفین به‌صورت زیرجلدی قرار گرفتند (22 و 23). یک گروه نیز به‌عنوان کنترل، مورد تجویز سرم فیزیولوژی قرار گرفتند. تجویز مورفین طبق برنامه (هر 12 ساعت) تا زمان کشته شدن موش‌ها ادامه یافت.

تجویز انگل در هر دو نژاد موش، منجر به ایجاد یک واکنش موضعی در محل تزریق انگل می‌گردد که قابل اندازه‌گیری است. پس از آن‌که واکنش موضعی در محل تزریق انگل ظاهر شد، هفته‌ای یک‌بار ضخامت پای مورد تزریق انگل، که به‌واسطه واکنش مذکور متورم شده بود، به‌کمک ابزار کولیس اندازه‌گیری شد (24 و 25). همزمان، به‌عنوان کنترل، ضخامت پای مقابل نیز اندازه‌گیری شد و درصد افزایش اندازه واکنش موضعی، طبق معادله ذیل محاسبه گردید:

در موش‌های BALB/c (تست و کنترل)، واکنش موضعی حدود 15 روز پس از تجویز انگل به صورت یک تورم کوچک ظاهر گردید، اندازه این واکنش طی روزهای بعد به تدریج افزایش یافت و قطر و حجم واکنش، روزبه‌روز بزرگ‌تر شد. این روند افزایشی تا پایان آزمایش ادامه یافت و گاهی به ایجاد نکروز در محل واکنش و حتی قطع اندام مربوطه انجامید. روند افزایش در اندازه (قطر) واکنش موضعی، طی 9 هفته اندازه‌گیری، در موش‌های تست و کنترل مشابه بود. با این وجود در هفته‌های پایانی آزمایش (هفته 7-9) اندازه واکنش موضعی در موش‌های دریافت‌کننده 1/5mg/kg مورفین، بیشتر از موش‌های کنترل (دریافت‌کننده سرم فیزیولوژی) و موش‌های دریافت‌کننده 15mg/kg مورفین بود و در آخرین اندازه‌گیری، اختلاف معناداری بین موش‌های مورد تزریق 1/5mg/kg و موش‌های دریافت‌کننده 15mg/kg مشاهده شد ($P < 0/05$)، اما در سایر موارد، اختلاف معناداری در اندازه واکنش موضعی بین گروه‌های تست و کنترل مشاهده نشد ($P \geq 0/2$) (نمودار 1).

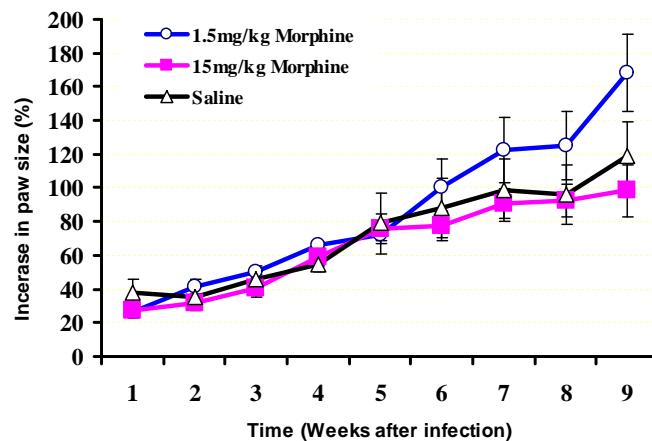
واکنش موش‌های C57BL/6 به عفونت با لیشمانیا ماژور، کاملاً متفاوت از موش‌های BALB/c بود. در این

بهاک‌ها (biotinylated anti-IL-4 detecting mAb) به چاهک‌ها اضافه شد. در مرحله بعد آلکالین فسفاتاز متصل به استرپتاویدین (streptavidin alkaline phosphatase) محصول (Sigma) اضافه گردید تا به آنتی‌بادی آشکارساز متصل شود. سپس سوبسترای آنزیم فسفاتاز (PNPP) محصول (Sigma) اضافه شد تا متناسب با غلظت آنزیم، که خود بیانگر غلظت IL-4 موجود در نمونه است، رنگ تولید گردد. در پایان، جذب نوری (OD: Optical density) نمونه‌ها به کمک دستگاه الیزا ریدر در طول موج 450nm قرائت شد و غلظت IL-4 در نمونه‌ها به کمک نمودار حاصل از رابطه غلظت نمونه‌های استاندارد و OD مربوط به آن‌ها محاسبه گردید.

برای آنالیز آماری داده‌های مربوط به اندازه واکنش موضعی و سطح سیتوکین‌ها از ANOVA و T-test استفاده شد. $P < 0/05$ به عنوان سطح معنادار بودن در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این پژوهش، اثر تجویز مزمن مورفین (دو بار در روز) به مدت 12 هفته در دو دوز مختلف 1/5mg/kg و 15mg/kg بر واکنش موش‌های BALB/c و C57BL/6 به عفونت با لیشمانیا ماژور مورد بررسی قرار گرفت.



نمودار 1- اثر تجویز مزمن مورفین بر واکنش موضعی در موش BALB/c

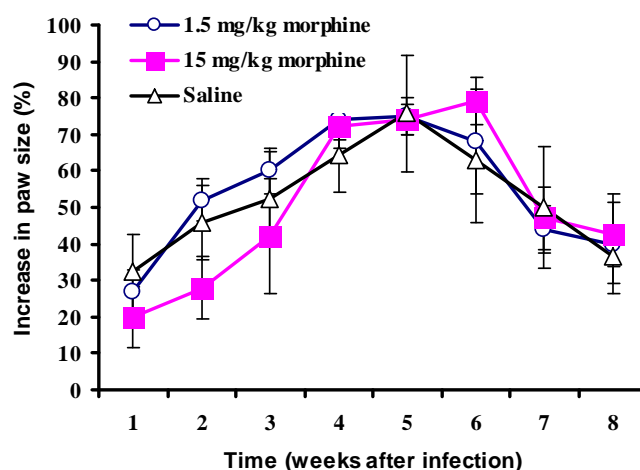
موش‌های BALB/c در حضور Con A، مقادیر قابل توجهی IL-4 تولید کردند. سطح تولید این سیتوکین در حدود 100-120pg/ml بود و در سلول‌های طحالی، تقریباً مشابه با سلول‌های غده لنفی بود. همچنین تجویز مزمن مورفین، تأثیر محسوسی بر تولید این سیتوکین در موش‌های این نژاد نداشت و تفاوت معناداری در میزان تولید IL-4 در سلول‌های طحالی و غده لنفی گروه‌های تست (دریافت‌کننده 15mg/kg و 1/5 مورفین) و کنترل (دریافت‌کننده سرم فیزیولوژی) مشاهده نشد ($P \geq 0/3$) (نمودار 3 و 4).

موش‌های C57BL/6 نیز در حضور Con A، سطح قابل اندازه‌گیری از IL-4 تولید کردند، به‌علاوه سطح تولید IL-4 در سلول‌های طحالی و سلول‌های غده لنفی این نژاد مشابه بود. در مقایسه با موش‌های BALB/c، موش‌های نژاد C57BL/6 میزان کم‌تری IL-4 تولید کردند. سطح تولید IL-4 در سلول‌های طحالی موش‌های BALB/c حدود 8-9 برابر سطح آن در سلول‌های طحالی موش‌های C57BL/6 بود. همچنین سطح این سیتوکین در سلول‌های غده لنفی موش‌های BALB/c حدود 7-9 برابر سطح آن در سلول‌های غده لنفی موش‌های C57BL/6 بود. در کل، این مطالعه نشان داد که موش‌های

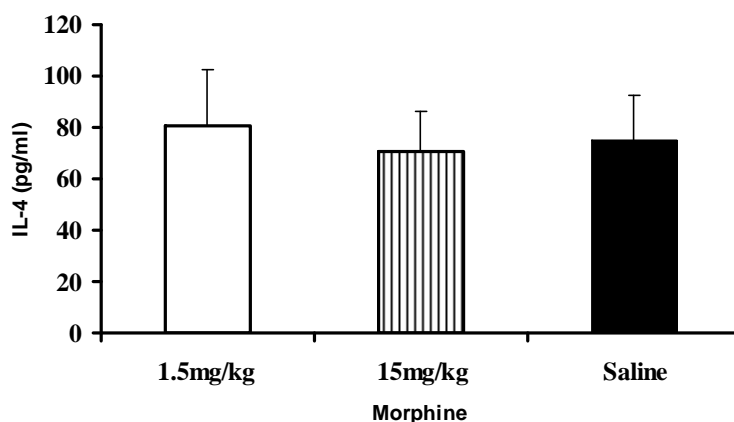
موش‌ها، پس از آن‌که واکنش موضعی، همانند نژاد BALB/c، حدود 15 روز بعد از تجویز انگل ظاهر شد تا هفته 5 به‌صورت ملایمی افزایش نشان داد. سپس روند معکوس طی کرده و بدون آنکه عارضه یا آسیبی بر جا گذارد به وضعیت نرمال برگشت نمود (نمودار 2). افزایش در حجم و قطر واکنش موضعی در این موش‌ها قابل مقایسه با موش‌های BALB/c نبود، در این موش‌ها، افزایش مختصری در اندازه واکنش موضعی صورت گرفت که یک روند موقتی بوده و پس از آن به حالت نرمال برگشت. درحالی‌که اندازه واکنش موضعی در موش‌های BALB/c تا 3-4 برابر افزایش یافته و حجم واکنش و ابعاد آن تا چندین برابر افزایش یافت، در موش‌های C57BL/6، واکنش، موقتاً تا 2 برابر افزایش یافت و از نظر حجم و ابعاد، رشد زیادی نداشت.

تجویز مورفین در موش‌های C57BL/6، اثری بر واکنش این موش‌ها نسبت به عفونت با لیشمانیا ماژور نداشت و اختلاف معنادار در تغییرات واکنش موضعی بین گروه‌های آزمون و کنترل مشاهده نشد ($P \geq 0/2$). به‌طور کلی میزان افزایش واکنش موضعی در موش‌های C57BL/6، بسیار کم‌تر از موش‌های BALB/c بود.

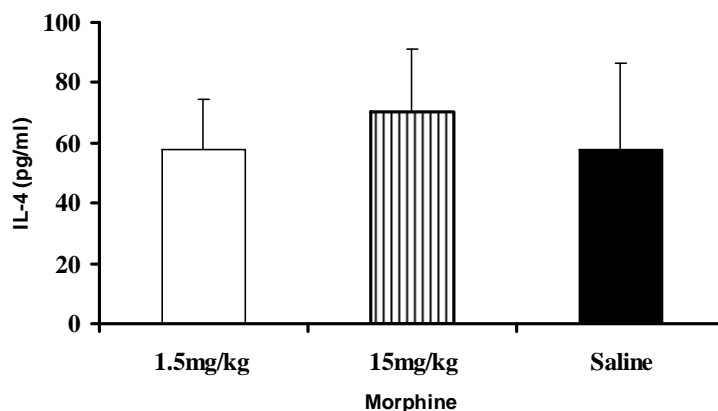
سلول‌های طحالی و سلول‌های غده لنفی پوپلیتال



نمودار 2- اثر تجویز مزمن مورفین بر واکنش موضعی در موش نژاد C57BL/6



نمودار 3- اثر تجویز مزمن مورفین بر تولید IL-4 در سلول‌های طحالی موش BALB/c



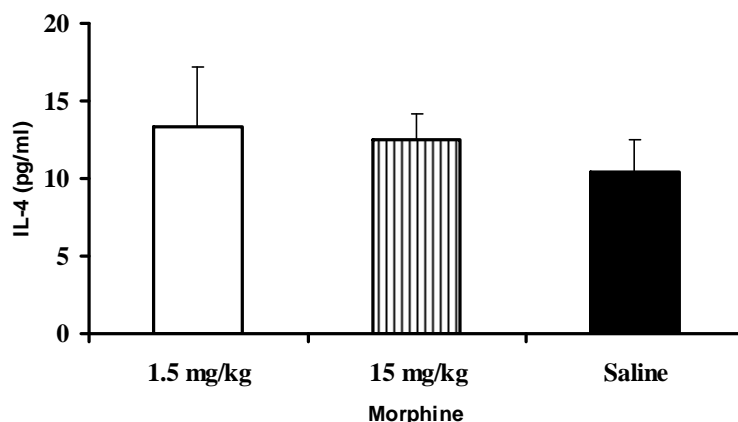
نمودار 4- اثر تجویز مزمن مورفین بر تولید IL-4 در سلول‌های غده لنفی موش BALB/c.

در مقایسه با موش‌های کنترل، میزان بیشتری IL-4 تولید کردند، هر چند این تفاوت از نظر آماری معنادار نبود (نمودار 6).

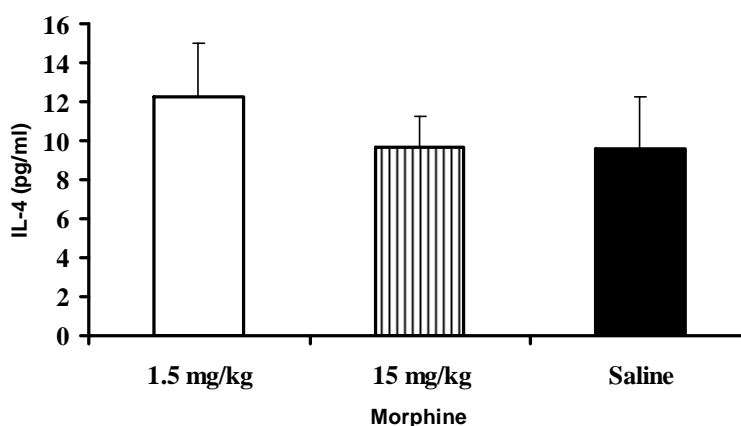
در کل، نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز مزمن مورفین در دوزهای مورد استفاده در این مطالعه، تأثیر محسوسی بر واکنش دو نژاد حساس (BALB/c) و مقاوم (C57BL/6) به عفونت با انگل لیشمانیا ماژور ندارد. همچنین، تفاوت محسوسی بین گروه‌های مختلف موش‌های هر نژاد، از نظر وزن حیوان‌ها، وزن طحال، وزن غده لنفی و تعداد کلی سلول‌های طحال و غده لنفی مشاهده نشد.

نژاد BALB/c، چندبرابر بیش از موش‌های نژاد C57BL/6 اینترلوکین-4، که نقش اساسی در حساسیت به عفونت با لیشمانیا ماژور بازی می‌کند، تولید کردند.

از طرف دیگر، تجویز مزمن مورفین، اثر قابل توجهی بر سطح تولید IL-4 در موش‌های C57BL/6 نداشت. سطح تولید این سیتوکاین در سلول‌های طحالی موش‌های دریافت‌کننده دوز بالا (15mg/kg) و دوز پایین (1/5mg/kg) مورفین و موش‌های کنترل (مورد تجویز سرم فیزیولوژی) مشابه بود و تفاوت معناداری با هم نداشتند ($P \geq 0/2$)، (نمودار 5)، اما سلول‌های غده لنفی موش‌های دریافت‌کننده دوز پایین مورفین (1/5mg/kg)



نمودار 5- اثر تجویز مزمن مورفین بر تولید IL-4 در سلول‌های طحالی موش C57BL/6



نمودار 6- اثر تجویز مزمن مورفین بر تولید IL-4 در سلول‌های غده لنفی موش C57BL/6

بحث

دوز کم ($1/5\text{mg/kg}$) و دوز زیاد (15mg/kg) بر سیر عفونت لیشمانیا ماژور و سرانجام این بیماری در موش‌های نژاد BALB/c، حساس به لیشمانیوز و موش‌های C57BL/6، مقاوم به این عفونت، تأثیر محسوسی ندارد. همچنین تجویز مورفین، سطح تولید IL-4 و $\text{IFN-}\gamma$ (داده‌های این سیتوکین نشان داده نشده است) که سیتوکین‌های کلیدی در ابتلا به این بیماری یا بهبودی از آن هستند را به صورت محسوس تحت تأثیر قرار نمی‌دهد.

در این مطالعه، مورفین به صورت مزمن و از یک هفته

مورفین یکی از اپیوئیدهای شاخص است که موارد مصرف و سوء مصرف زیادی دارد. این دارو ارگان‌های مختلف بدن از جمله سیستم ایمنی را تحت تأثیر قرار داده و سبب تعدیل برخی پارامترهای ایمنی ($30-32$) و تغییر مقاومت بدن نسبت به برخی عوامل عفونی می‌شود (33). در این مطالعه، اثرات تجویز مزمن مورفین بر عفونت لیشمانیوز در موش‌های نژاد BALB/c و C57BL/6 مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز مزمن مورفین در

Con A می‌شود (38).

در مورد اثرات مورفین بر عفونت‌های میکروبی نیز نتایج متفاوت و گاه متضادی گزارش شده است. در بسیاری از مطالعات، مورفین به‌عنوان یک عامل مهارکننده مقاومت میزبان در مقابل بیماری‌های عفونی در مدل‌های حیوانی شناخته شده است (12، 14 و 33). در مقابل، مطالعات دیگر گویای اثرات تقویت‌کنندگی و تحریکی مورفین بر مکانیسم‌های دفاعی میزبان است (39-41). در یک مطالعه، تجویز مزمن مورفین به‌مدت 21-42 روز، سبب تغییر پاتوژنز ویروس هرپس خوک (Swine Herpes Virus) شده، بدین‌صورت که پنومونی حاصل از ویروس، افزایش یافته اما مرگ و میر ناشی از انسفالیت ویروسی کاهش یافته است (40). در مطالعه دیگری گزارش شده است که تجویز روزانه مورفین به‌مدت 16-27 روز به‌میزان 50mg/kg به موش، سبب کاهش علائم بالینی عفونت با ویروس فرند رتروویروس (friend Retrovirus) می‌شود بدون آن‌که بر مرگ و میر ناشی از آن اثری داشته باشد (41). همچنین گزارش شده که مورفین ممکن است سبب افزایش حساسیت نسبت به عفونت با یک عامل عفونی خاص شود اما اثری بر عفونت‌زایی باکتری‌های دیگر نداشته باشد. به‌عنوان مثال درحالی‌که تجویز مزمن مورفین سبب افزایش حساسیت موش به عفونت با سالمونلاتیفی موریوم (33)، لیستریا منوسیتوژنز و سالمونلانتريتیدیس شده است (11)، بر عفونت ناشی از باکتری‌های اشرشیا کولی، شیگلا فلکسنری و یرسینیا اتروکولیتیکا اثری نداشته است (11). بنابراین عدم تأثیر محسوس تجویز مزمن مورفین بر عفونت لیشمانیا ماژور در مطالعه ما، می‌تواند ناشی از این امر باشد که برخلاف عفونت‌های میکروبی دیگر، مصرف مورفین براساس پروتکلی که ما مورد استفاده قرار دادیم بر سیر طبیعی این بیماری (تشدید یا تخفیف آن) و همین‌طور بر سرنوشت نهایی آن در موش‌های حساس و مقاوم، تأثیری نداشته است. در این مطالعه، ما از دوز بالاتری (80 mg/kg) نیز استفاده کردیم، ولی حیوانات

قبل از آلوده‌سازی با انگل به موش‌های هر دو نژاد تجویز شده است، بنابراین به‌نظر می‌رسد تولرانسی که مدتی پس از مصرف ممتد مورفین در ارگان‌های بدن، مانند سیستم عصبی ایجاد می‌شود، به سیستم ایمنی نیز تسری پیدا می‌کند و این سیستم نسبت به اثرات مورفین، تولرانس پیدا کرده و فعالیت‌های آن به وضعیت نرمال بازگشت می‌کند. بنابراین موش‌های حساس یا مقاوم به عفونت با لیشمانیا نیز نسبت به تجویز مورفین، تولرانس پیدا کرده و واکنشی مشابه با واکنش قبل از تجویز مورفین از خود نشان می‌دهند. در مطالعاتی که قبلاً انجام شده نیز گزارشاتی مبنی بر ایجاد تولرانس نسبت به تجویز مزمن مورفین در پاسخ‌های ایمنی حیوانات آزمایشگاهی وجود دارد. بر اساس گزارش Bryant و همکاران، 96 ساعت پس از کاشت پلت 75mg مورفین در زیر پوست موش، مهار پاسخ‌های ایمنی، برطرف شده و سلول‌های طحالی حیوان، پاسخ نرمالی به میتوزن‌هایی مانند Con A و لیپوپلی ساکارید (LPS) می‌دهند (34). همچنین در تجربه Bayer و همکاران در سال 1994، تجویز دوزهای 10-40mg/kg مورفین به‌صورت 2 بار در روز و به‌مدت 4 روز به موش صحرائی، سبب ایجاد تولرانس نسبت به اثرات مهار می‌شود. مورفین بر سیستم ایمنی شده و لنفوسیت‌های خون محیطی حیوان، پاسخ تکثیری نرمالی به Con A نشان داده‌اند (35). در مطالعه Shavit و همکاران در سال 1986، تجویز روزانه 50mg/kg مورفین، به‌مدت 14 روز، سبب تولرانس نسبت به اثرات مهار می‌شود مورفین بر سلول‌های NK شده است (36). در مقابل، در مطالعات دیگر گزارش شده که تجویز مزمن مورفین، اثرات مهار می‌شود بر فعالیت‌های ایمنی دارد. در تجربه Pellis و همکاران گزارش شده است که پس از 7 روز تجویز داخل صفاقی مورفین، پاسخ DTH (واکنش حساسیت تأخیری) به آنتی‌ژن‌های مایکوباکتریوم مهار می‌شود (37). همچنین بر اساس مطالعه Chuang و همکاران، تجویز سه بار در روز مورفین به‌میزان 5mg/kg و به‌مدت سه ماه در میمون رزوس، همچنان سبب مهار پاسخ به

لیشمانیا ماژور ندارد. عدم تأثیر تجویز مزمن مورفین بر عفونت لیشمانیوز، احتمالاً ناشی از ایجاد تحمل در سیستم ایمنی نسبت به مورفین باشد، به طوری که میزان تولید IL-4 در موش‌های دریافت‌کننده مورفین، مشابه با موش‌های نرمال بود. در این مطالعه، تجویز مورفین از یک هفته قبل از تلقیح با انگل لیشمانیا شروع گردید تا وضعیتی مشابه با وضعیت افرادی که مصرف‌کننده مواد بوده و در عین حال مورد گزش پشه خاکی (عامل انتقال لیشمانیوز جلدی) قرار می‌گیرند، ایجاد شود. به هر حال، این نتایج حاصل یک مطالعه بر اساس یک پروتکل معین است، بنابراین برای کسب اطلاعات کامل‌تر و جامع‌تر در خصوص اثرات مورفین بر بیماری سالک یا لیشمانیوز، لازم است مطالعات بیشتری انجام گیرد.

مورد تجویز این دوز بسیار بالا در هر دو نژاد مورد آزمایش، اکثراً (به جز 1-2 حیوان) در نیمه‌های دوره آزمایش تلف شدند. گرچه دلیل مرگ آن‌ها معلوم نشد، اما به نظر می‌رسد ناشی از اثر توکسیک مورفین بوده باشد تا اثر عفونت، زیرا نشانه‌ای حاکی از گسترش عفونت و یا تشدید واکنش موضعی نداشتند، به علاوه 1-2 سر از آن‌ها تا پایان باقی مانده و حتی واکنش خفیف‌تری در مقایسه با موش‌های دریافت‌کننده دوزهای پایین‌تر نشان دادند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز مزمن مورفین در دوز کم ($1/5\text{mg/kg}$) و یا دوز زیاد (15mg/kg)، تأثیر محسوسی بر حساسیت موش‌های حساس (BALB/c) و مقاومت موش‌های مقاوم (C57BL/6) نسبت به عفونت با

References

1. Ourmazdi H. [Medical Parasitology, first volume (Persian)]. 5th ed. Tehran: moasese entesharat jahad daneshgahi 1999; 228-241.
2. Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to Leishmania major. Annu Rev Immunol 1995; 13: 151-77.
3. DeTolla LJ, Scott PA, Farrell JP. Single gene control of resistance to cutaneous leishmaniasis in mice. Immunogenetics 1981; 14(1-2): 29-39.
4. Howard JG, Hale C, Chan-Liew WL. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. 1. Immunogenetic aspects of susceptibility to Leishmania tropica in mice. Parasite Immunol 1980; 2(4): 303-14.
5. Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. J Exp Med 1989; 169(1): 59-72.
6. Locksley RM, Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Gardner KD Jr. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T- cell subsets. Ann Inst Pasteur Immunol 1987; 138(5):744-9.
7. Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. J Exp Med 1988; 168(5): 1675-84.
8. Panerai AE, Manfredi B, Granucci F, Sacerdote P. The beta-endorphin inhibition of mitogen-induced splenocytes proliferation is mediated by central and peripheral paracrine/autocrine effects of the opioid. J Neuroimmunol 1995; 58(1): 71-6.
9. 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): p77-89.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.

14. 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.
15. Bhaskaran M, Reddy K, Sharma S, Singh J, Radhakrishnan N, Kapasi A, et al. Morphine-induced degradation of the host defense barrier: role of macrophage injury. *J Infect Dis* 2001; 184(12): 1524-31.
16. Nabors GS, Farrell JP. Depletion of interleukin-4 in BALB/c mice with established *Leishmania major* infections increase the efficacy of antimony therapy and promote Th1-like responses. *Infect Immun* 1994; 62(12): 5498-504.
17. Nashleanas M, Kanaly S, Scott P. Control of *Leishmania major* infection in mice lacking TNF receptors. *J Immunol* 1998; 160(11): 5506-13.
18. Hondowicz B, Scott P. Influence of parasite load on the ability of type 1 T cells to control *Leishmania major* infection. *Infect Immun* 2002; 70(2): 498-503.
19. Yan H, Takamoto M, Sugane K. Exposure to Bisphenol A prenatally or in adulthood promotes T(H)2 cytokine production associated with reduction of CD4CD25 regulatory T cells. *Environ Health Perspect* 2008; 116(4): 514-9.
20. Cruz KK, Fonseca SG, Monteiro MC, Silva OS, Andrade VM, Cunha FQ, et al. The influence of glutathione modulators on the course of *Leishmania major* infection in susceptible and resistant mice. *Parasite Immunol* 2008; 30(3): 171-4.
21. Yoshimoto T, Yasuda K, Mizuguchi J, Nakanishi K. IL-27 suppresses Th2 cell development and Th2 cytokines production from polarized Th2 cells: a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation. *J Immunol*. 2007 Oct 1; 179(7): 4415-23. Erratum in: *J Immunol* 2010; 184(6): 3298.
22. 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.
23. Singal P, Kinshikar AG, Singh S, Singh PP. Neuroimmunomodulatory effects of morphine in *Leishmania donovani*-infected hamsters. *Neuroimmunomodulation* 2002- 2003; 10(5): 261-9.
24. Kébaïer C, Louzir H, Chenik M, Ben Salah A, Dellagi K. Heterogeneity of wild *Leishmania major* isolates in experimental murine pathogenicity and specific immune response. *Infect Immun* 2001; 69(8): 4906-15.
25. Ahmed SB, Touihri L, Chtourou Y, Dellagi K, Bahloul C. DNA based vaccination with a cocktail of plasmids encoding immunodominant *Leishmania (Leishmania) major* antigens confers full protection in BALB/c mice. *Vaccine* 2009; 27(1): 99- 106.
26. Chen L, Zhang ZH, Watanabe T, Yamashita T, Kobayakawa T, Kaneko A, et al. The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. *Parasitol Int* 2005; 54(2): 109-18.
27. Gavériaux-Ruff C, Matthes HW, Peluso J, Kieffer BL. Abolition of morphine- immunosuppression in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(11): 6326-30.
28. Gavériaux-Ruff C, Filliol D, Simonin F, Matthes HW, Kieffer BL. Immunosuppression by delta-opioid antagonist naltrindole: delta- and triple mu/delta/kappa-opioid receptor knockout mice reveal a nonopioid activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298(3): 1193-8.
29. Sacerdote P, di San Secondo VE, Sirchia G, Manfredi B, Panerai AE. Endogenous opioids modulate allograft rejection time in mice: possible relation with Th1/Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1998; 113(3): 465-9.
30. Grimm MC, Ben-Baruch A, Taub DD, Howard OM, Wang JM, Oppenheim JJ. Opiate inhibition of chemokine-induced chemotaxis. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 840: 9- 20.
31. Mahajan SD, Schwartz SA, Shanahan TC, Chawda RP, Nair MP. Morphine regulates gene expression of alpha- and beta- chemokines and their receptors on astroglial cells via the opioid mu receptor. *J Immunol* 2002 169(7): 3589-99.
32. Holan V, Zajčkov? A, Krulova M, Blahoutov? V, Wilczek H. Augmented production of proinflammatory cytokines and accelerated allotransplantation reactions in heroin-treated mice. *Clin Exp Immunol* 2003; 132(1): 40-5.
33. MacFarlane AS, Peng X, Meissler JJ Jr, Rogers TJ, Geller EB, Adler MW, Eisenstein TK. Morphine increases susceptibility to oral *Salmonella typhimurium* infection. *J Infect Dis* 2000; 181(4): 1350-8.
34. Bryant HU., E.W. Bernton, and J.W. Holaday. Immunosuppressive effects of chronic morphine treatment in mice. *Life Sci* 1987; 41(14): 1731-8.
35. Bayer BM, Brehio RM, Ding XZ, Hernandez MC. Enhanced susceptibility of the immune system to stress in morphine-tolerant rats. *Brain Behav Immun* 1994; 8(3): 173-84.
36. Shavit Y, Terman GW, Lewis JW, Zane CJ, Gale RP, Liebeskind JC. Effects of footshock stress and morphine on natural killer lymphocytes in rats: studies of tolerance and cross-tolerance. *Brain Res* 1986; 372(2): 382-5.
37. Pellis NR, Harper C, Dafny N. Suppression of the induction of delayed hypersensitivity in rats by repetitive morphine treatments. *Exp Neurol* 1986; 93(1): 92-7.

38. Chuang LF, Killam KF Jr, Chuang RY. Opioid dependency and T-helper cell functions in rhesus monkey. In Vivo 1993; 7(2): 159-66.
39. Pacifici R, Patrini G, Venier I, Parolaro D, Zuccaro P, Gori E. Effect of morphine and methadone acute treatment on immunological activity in mice: pharmacokinetic and pharmacodynamic correlates. J Pharmacol Exp Ther 1994; 269(3): 1112-6.
40. Risdahl JM, Peterson PK, Chao CC, Pijoan C, Molitor TW. Effects of morphine dependence on the pathogenesis of swine herpesvirus infection. J Infect Dis 1993; 167(6): 1281-7.
41. Veyries ML, Sinet M, Desforges B, Rouveix B. Effects of morphine on the pathogenesis of murine Friend retrovirus infection. J Pharmacol Exp Ther 1995; 272(2): 498-504.