# تغییر فاکتورهای آپوپتوزی PARP, Caspase-3 و نسبت Bax/Bcl-2 در ناحیه تگمنتوم شکمی پس از اکتساب ترجیح مکان شرطی و دوره ترک مصرف مورفین در موش بزرگ آزمایشگاهی

یاسمن رضوی [۱و۲](M.Sc)، نجمه کاتبی [۱و۲](M.Sc)، شبنم ضیغمی علمداری [۲](M.Sc)، شهربانو عریان [۱](Ph.D)، فریبا خداقلی [۲](Ph.D)، عباس حق‌پرست [*۲](Ph.D)

۱- *دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست‌شناسی*

۲- *دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب*

## چکیده

**سابقه و هدف: تحقیقات پیشین نشان داده‌اند که مورفین مزمن القاکننده آپوپتوز می‌باشد. از جمله مراکز اصلی در مدار پاداش ناحیه تگمنتوم شکمی (Ventral tegmental area, VTA) می‌باشد. تحریک مسیر پاداش در مغز توسط مورفین می‌تواند از طریق فعال کردن رسپتورهای اپیوئیدی سبب القاء فاکتورهای آپوپتوزی در برخی از مناطق مغزی شود و بیان رسپتورهای مرگ را در سطح سلول افزایش دهد. در این مطالعه تغییر فاکتورهای پروتئینی Bax/Bcl-2، PARP، caspase-3 دخیل در آپوپتوز، در پاسخ به دوزهای مختلف مورفین در دوره اکتساب و ترک به مصرف مورفین در حیوان بررسی گردید.**

**مواد و روش‌ها: آزمایشات رفتاری و مولکولی بر روی شصت و چهار موش صحرایی نر بالغ Wistar انجام گردید. در بخش رفتاری از مدل ترجیح مکان شرطی (Conditioned place preference, CPP) شد. در این مدل، به حیوانات در طول دوره شرطی‌سازی در گروه‌های مختلف، سالین و دوزهای ۰/۵ mg/kg، ۵ و ۱۰ مورفین تزریق گردید. هم‌چنین اثر مورفین (۵ mg/kg) در ناحیه VTA در روزهای چهارم و هشتم ترک مصرف مورفین، نیز بررسی گردید. در بخش مولکولی، میزان فاکتورهای آپوپتوزی, با روش وسترن بلاتینگ در هر گروه بررسی شد.**

**یافته‌ها: داده‌های به‌دست آمده در بخش رفتاری نشان داد که مورفین با دوزهای ۵ mg/kg و ۱۰ به‌طور معنی‌داری سبب ترجیح مکان شرطی می‌شوند. این در حالی است که در دوره ترک، اثر مورفین موثر (۵ mg/kg) در روز چهارم هم‌چنان معنی‌دار و در روز هشتم ترجیح مکان شرطی دیده نشد. در بخش مولکولی، فاکتورهای آپوپتوزی در سه گروه تیمار شده به مورفین به طور معنی‌داری در VTA در دوز ۵ mg/kg بیش‌ترین افزایش را نشان می‌دهند. در حالی که در دوره ترک هیچ تغییری در روند آپوپتوز دیده نشد.**

**نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که مورفین در تمامی دوزها سبب آپوپتوز می‌گردد ولیکن با افزایش دوز درگیری گیرنده‌های اوپیوئیدی متفاوتی دیده و اثرات نوروپروکتیو مورفین نیز ظاهر می‌شود.**

**واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، ناحیه تگمنتوم شکمی، مورفین، ترجیح مکان شرطی، وسترن‌بلات، موش سفید آزمایشگاهی**

## مقدمه

داروهای اپیوئیدی موجب القا آپوپتوز در رده‌های مختلف

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۲۱۴۹۸۵۷ نمابر: ۲۲۴۳۱۶۲۴ -۰۲۱

Email: haghparast@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۱۴



[ Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04 ]

سلولی می‌گردند [۲،۱]. مورفین به عنوان یک داروی ضد درد اپیوئیدی مورد سوءاستفاده زیادی قرار گرفته است که می‌تواند منجر به بروز آپوپتوز در نورون‌ها گردد [۳]. از طرفی در صورت دریافت مورفین مدار نورونی در مغز به‌نام مدار پاداش فعال می‌شود که نتیجه آن ایجاد احساس آرامش و بی‌دردی در فرد می‌باشد [۴]. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که پدیده پاداش پایه اعتیاد است. مطالعات صورت گرفته با استفاده از روش خودتزریقی داخل مغزی (Intracranial self-administration)، بیانگر این است که بیش‌ترین جای‌گاه‌های حساس در مسیر پاداش در طول دسته پیش مغز میانی (Medial forebrain bundle) و به ویژه در مناطقی چون، ناحیه تگمنتوم شکمی (Ventral tegmental area, VTA)، هیپوکامپ، هسته اکومبنس، قشر سینگولا قدامی، آمیگدال، قشر پیش پیشانی، لوکوس سرلئوس، هیپوتالاموس جانبی، پیازبویایی و هسته‌های دم‌دار و پوتامن واقع شده‌اند. این نواحی در مراحل مختلف پاداش مواد مخدر (مورفین، کوکائین، نیکوتین و...) در روش ترجیح مکان شرطی (Conditioned place preference, CPP) از جمله اکتساب (Acquisition)، ترک (Extinction)و بازگشت مجدد (Reinstatement) نقش دارند [۴]. از جمله مراکز اصلی در مدار پاداش ناحیه VTA می‌باشد. شواهد قطعی وجود دارد که تجویز سیستمیک مورفین در موش بزرگ آزمایش‌گاهی باعث تحریک نورون‌های دوپامینرژیک موجود در VTA شده و این امر منجر به افزایش رهایی دوپامین در مدار پاداش می‌گردد [۵]. بنابراین سیستم دوپامینرژیک مزولیمبیک که ازVTA خارج شده و به هسته اکومبنس می‌رود، برای فرآیند تمایل دوباره به مصرف مواد مخدر ضروری است [۶]. مطالعات نشان داده‌اند که VTA نقش مهمی در اکتساب CPP ناشی از مورفین بازی می‌کند [۵]. از طرفی در مطالعه‌ای نشان داده شد که مورفین از طریق کاهش سطح دوپامین داخل سلولی که با افزایش متابولیسم و آسیب اکسیداتیو به سلول همراه است، موجب مرگ نورون‌ها می‌گردد [۷]. علی‌رغم مشخص بودن نقش اپیوئیدها در مدار پاداش، مکانیسم سلولی و مولکولی اثر این مواد در مدار پاداش به خوبی مشخص نمی‌باشد. تحقیقات نشان داده‌اند، تزریق مکرر اپیوئیدهایی هم‌چون مورفین بیان ژن‌ها را در نواحی مختلف مغز تغییر می‌دهد که ناشی از فعال شدن فاکتورهای رونویسی چندگانه در حالت حساسیت به مورفین و مقاومت به مورفین می‌باشد [۸]. از طرفی بسیاری از سیگنال‌های خارج و داخل سلولی می‌توانند از طریق گیرنده‌های موجود در سطح سلول هم‌چون گیرنده‌های مرگ (Death receptors) سبب القای آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی شوند [۹]. مورفین یکی از موادی است که می‌تواند از طریق فعال کردن گیرنده‌های اپیوئیدی مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی را راه‌اندازی کند [۱۰]. علاوه بر آن دیده شده است که مورفین می‌تواند بیان گیرنده‌های مرگ را در سطح سلول افزایش دهد [۱۱]. این نوع مرگ در رشد و نمو طبیعی بدن موجودات پرسلولی نقش دارد، به‌طوری که سلول‌ها به صورت کنترل شده می‌میرند. در حالی که دیگر مرگ‌ها مثل نکروز با التهاب و لیز شدن سلولی غیر کنترل شونده هم‌راه هستند. مسیرهای پیام‌رسانی آپوپتوز با راه‌اندازی فرایندهایی اختصاصی، سلول را به سمت مرگ پیش می‌برند. در این فرایندها پروتئین‌های ویژه‌ای به عنوان فاکتورهای آپوپتوزی نقش دارند. کاسپازها یک گروه از این پروتئین‌ها هستند که در مراحل اولیه‌ی آپوپتوز فعال می‌شوند. این پروتئین‌ها ترکیبات کلیدی سلول هم‌چون پروتئین‌های ساختاری اسکلت سلولی و پروتئین‌های هسته‌ای مثل آنزیم‌های ترمیم DNA را تخریب می‌کنند.

PARP (Poly ADP ribose polymerase) پروتئینی است که به DNAای تک‌رشته آسیب‌دیده متصل شده و در ترمیم آن نقش دارد. PARP سوبسترای کاسپازهای خاصی از جمله کاسپاز ۳ می‌باشد. کاسپاز ۳ در فرم فعال خود، می‌تواند PARP را تجزیه کند. حاصل این تجزیه قطعات ۸۹ و ۲۴ کیلو دالتونی است. پروتئین‌های خانواده (B-cell lymphoma 2, Bcl-2) گروهی از پروتئین‌ها هستند که شامل فاکتورهای ضدآپوپتوزی (Bcl-2, Bcl-xl, ...) و



[ Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04 ]

پروآپوپتوزی (bcl-2 associated x protein, Bax) می‌باشد. حساسیت سلول به آپوپتوز به تعادل فاکتورهای پروآپوپتوزی و ضد آپوپتوزی خانواده‌ی Bcl-2 بستگی دارد [۱۲,۹]. افزایش فاکتورهای پروآپوپتوزی خانواده‌ی Bcl-2 در سطح میتوکندری در ایجاد منافذ در جدار آن نقش دارد.

بعضی یافته‌ها نشان می‌دهد مورفین برای نورون‌ها سمی است و آپوپتوز را القا می‌کند در حالی که شواهد دیگر به اثرات مفید مورفین اشاره می‌کنند [۱۳]. مطالعات نشان داده‌اند که تیمار طولانی‌مدت موش آزمایش‌گاهی با مورفین (در حالت وابسته یا مقاوم) با تغییرات قابل توجه فاکتورهای آپوپتوزی در ارتباط است. این تغییرات شامل افزایش گیرنده‌ی FAS (فاکتور پروآپپتوزی) و کاهش Bcl-2 (فاکتور ضدآپپتوزی) در مغز می‌باشد [۱۰].

هم‌چنین تزریق مورفین منجر به افزایش پروتئین‌های (caspase-3,Cysteinyl Aspartate-Specefic Protease) و Bax (پروآپوپتوتیک) و کاهش پروتئین Bcl-2 (ضدآپوپتوزی) در طناب نخاعی موش می‌شود [۱۴]. با توجه به آن‌که مطالعات اخیر نقش اوپیوئیدها را در القا فرآیند آپوپتوز نشان دادند، به طوری که اوپیوئیدها مانع رشد سلول‌ها می‌شوند، از طرفی فعال کردن مسیر پاداش توسط اوپیوئیدها سال‌هاست که مورد تائید پژوهش‌گران می‌باشد، بنابراین در این مطالعه بر آن شدیم تا القا آپوپتوز و بررسی چهار فاکتور آپوپتوزی Bax، Bcl-2، PARP، caspase-3 را در ناحیه VTA به عنوان یکی از اصلی‌ترین مناطق درگیر در مسیر پاداش در مدل ترجیح مکان شرطی پس از اکتساب و ترک آن به مصرف مورفین مورد بررسی قرار دهیم.

## مواد و روش‌ها

**حیوان.** در این مطالعه تعداد ۶۴ موش بزرگ آزمایش‌گاهی نژادWistar به وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم که به صورت سه تایی در هر قفس با دسترسی آزاد به آب و غذا نگه‌داری می‌شدند مورد بررسی قرار گرفتند. سیکل روشنایی و تاریکی به صورت ۱۲ ساعت به ۱۲ ساعت و دمای اطاق در ۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد تنظیم شدند. تمامی آزمایشات مطابق با کتاب راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایش‌گاهی انجام شد.

**دارو.** مورفین که از شرکت تماد تهیه شده به عنوان داروی اپیوئیدی استفاده گردید. آنتی‌بادی‌های ضد PARP, caspase-3, Bax, Bcl-2 و β-Actin که از شرکت Cell signaling و کیت Ecl Advanced chemiluminescenc که از شرکت Amersham خریداری شدند.

**بخش رفتاری.** آزمون رفتاری- ترجیح مکان شرطی

جهت بررسی اثرات پاداشی مورفین از مدل ترجیح مکان شرطی استفاده شد. این روش شامل سه مرحله می‌باشد. مرحله پیش‌آزمون (Pre-conditioning)، مرحله شرطی‌سازی (Conditioning) و مرحله پس از شرطی‌سازی (Post-conditioning) . در این روش از یک جعبه با دو قسمت اصلی و یک قسمت خنثی (null) استفاده می‌شود که در این مطالعه در یک بخش، موش مورفین با دوز موثر و در بخش دیگر سالین دریافت کردند. حیوانات در روز اول(Pre-test)داخل جعبه در فضای خنثی (Null) قرار گرفته و به مدت ۱۰ دقیقه به صورت آزادانه در هر سه قسمت حرکت می‌کنند. مرحله شرطی‌سازی شامل ۶ جلسه ۳۰ دقیقه‌ای بود (۳ جلسه سالین و ۳ جلسه دارو) که در هر روز ۲ جلسه و با فاصله زمانی ۶ ساعت صورت گرفت. در این مرحله نیمی از حیوانات، مورفین را صبح در جعبه شرطی‌سازی و سالین را عصر در جعبه مخالف دریافت کردند و تزریق نیمه گروه دوم معکوس نیمه اول بود. حیوانات پس از دریافت دارو به مدت ۳۰ دقیقه در داخل جعبه باقی می‌ماندند و به‌دلیل بسته بودن درب بین جعبه‌ها قادر به خروج از هر جعبه نبودند. در مرحله پس از شرطی‌سازی که در روز پنجم بود حیوانات به مدت ۱۰ دقیقه در داخل دستگاه قرار داده شده و حیوان قادر است به صورت آزادانه در داخل جعبه‌ها حرکت کند. در این مرحله، زمان سپری شده در هر قسمت توسط دوربین فیلم‌برداری ضبط شده و توسط نرم‌افزار اتوویژن مورد آنالیز قرار گرفت. به منظور محاسبه نمره شرطی‌سازی به عنوان فاکتور ترجیح

[ Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04 ]

(تغییر ترجیح) مدت زمان سپری شده در محفظه دریافت دارو (مورفین) را از مدت زمان سپری شده در محفظه دریافت سالین کم کردیم [۱۶،۱۵].

**طراحی آزمایش‌ها.** تعیین منحنی دوز- پاسخ مورفین در دوره اکتساب ترجیح مکان شرطی

در این گروه جهت بررسی منحنی دوز- پاسخ مورفین، حیوانات دوزهای متفاوت مورفین (۰/۵ mg/kg، ۵ و ۱۰) را به‌صورت زیر جلدی طی دوره شرطی‌سازی دریافت کردند. سپس در روز آزمون، ترجیح مکان شرطی و میزان فعالیت حرکتی حیوان در مدت ۱۰ دقیقه مورد ارزیابی قرار گرفت.

**دوره ترک ناشی از مصرف مورفین.** در این بخش از مطالعه حیوانات وارد پروتکل CPP شده و در سه روز شرطی‌سازی دوز موثر مورفین به‌دست آمده از گروه‌های فوق را دریافت و در روز پنجم آزمون ترجیح مکان شرطی به مدت ده دقیقه انجام شد و سپس حیوانات وارد پروتکل القای extinction شدند. در این پروتکل از روز بعد از آزمون، حیوانات روزی یک بار به مدت ۳۰ دقیقه در جعبه CPP قرار گرفتند؛ به صورتی که دسترسی آزادانه به هر سه بخش جعبه CPP را داشتند و با استفاده از نرم‌افزار اتویژن رفتار حیوانات ثبت و در پایان هر روز نمره شرطی شدن محاسبه گردید و این آزمون ادامه یافت تا روزی که حیوانات ترجیح مکانی به بخشی که در آن مورفین دریافت کرده‌اند را از دست دادند، یعنی نمره شرطی شدن (دوبار پی در پی) از ۵۰ درصد نمره اولیه کم‌تر شد. لازم به‌ذکر است که در این مطالعه نمره شرطی شدن حیوان در روزهای چهارم و هشتم بررسی گردید.

**بخش مولکولی.** پس از انجام آزمایشات رفتاری در دوره اکتساب و ترک مصرف مورفین (روزهای چهارم و هشتم) سر حیوانات جدا و ناحیه تگمنتوم شکمی از مغز حیوان توسط دستگاه Brain Matrix استخراج شد و نمونه جدا شده درون میکروتیوب‌هایی بلافاصله به تانک نیتروژن مایع منتقل گردید و تا روز آزمایش وسترن در آن‌جا نگه‌داری شد.

**سنجش میزان بیان PARP, caspase-3, Bax, Bcl-2 با تکنیک وسترن بلات.** ناحیه تگمنتوم شکمی توسط Lysis Buffer و طبق دستورالعمل (Jalalvand, E, 2008) برای به‌دست آوردن عصاره سلولی هموژن شد. بعد از انجام سانتریفوژ میزان پروتئین موجود در محلول رویی به دست آمده با استفاده از دستگاه بررسی پروتئین Bio Rad با تکنیک برادفورد به صورت کمی مورد بررسی قرار گرفت.

**تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد.** یکی از روش‌های تعیین غلظت پروتئین روش برادفورد است که بر اساس تفاوت در جذب نور در طول موج ۶۳۰ نانومتر می‌باشد. هر چه غلظت پروتئین محلول مورد بررسی بیش‌تر باشد میزان رنگ آبی حاصل و جذب نوری آن افزایش می‌یابد. برای سنجش مقدار غلظت پروتئین کل، با استفاده از آلبومین سرم گاوی (Bovin serum albumin; BSA) به عنوان یک پروتئین استاندارد یک منحنی استاندارد رسم و غلظت پروتئین‌ها محاسبه شد. عصاره پروتئینی به دست آمده به میزان ۸۰ میکروگرم از هر نمونه مورد الکتروفورز SDS-PAGE قرار گرفت. سپس پروتئین‌ها به روی کاغذ (Poly vinylidene difluoride; PVDF) منتقل شد و با محلول Blocking به منظور پوشاندن غشا برای ممانعت از واکنش غیراختصاصی با آنتی‌بادی اولیه (Amersham Ecl Advance TM blocking agent cpk1075)، اشباع شد. سپس انکوباسیون غشاها با آنتی‌بادی ضد caspase-3, Bax, Bcl-2 و PARP (۱/۱۰۰۰ v/v) انجام گرفت و پروتئین‌ها با ایمنوگلوبولین ضد خرگوش (به عنوان آنتی‌بادی ثانویه) انکوبه شدند. باندهای پروتئینی مورد نظر توسط کیت Ecl Advanced chemiluminescenc قابل رؤیت شدند و بیان نسبی باندهای پروتئینی با استفاده از اسکن دانسیتومتری فیلم‌های رادیوگرافی توسط نرم‌افزار Image J انجام شد [۱۷].

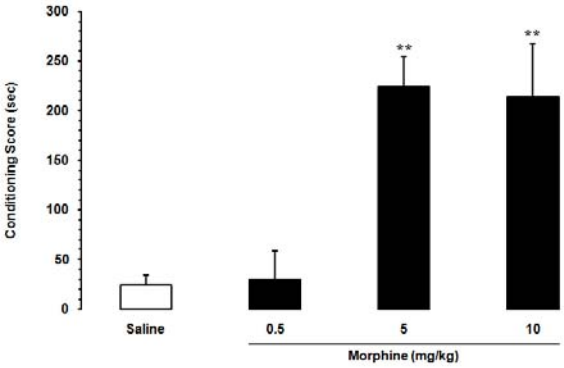
**تجزیه و تحلیل آماری.** جهت مقایسه نمره شرطی شدن (Conditioning Score) در گروه‌های مختلف از آنالیز واریانس (ANOVA) و متعاقب آن تست آماری Dunnett برای مقایسه با گروه کنترل استفاده شد. در بخش مولکولی مقایسه میزان دانسیتومتری در گروه‌های مختلف با آنالیز

[ Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04 ]

Image J و مقایسه‌های داده‌های آن با استفاده از آزمون Kruskal-Wallis انجام گرفت. در تمامی موارد سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

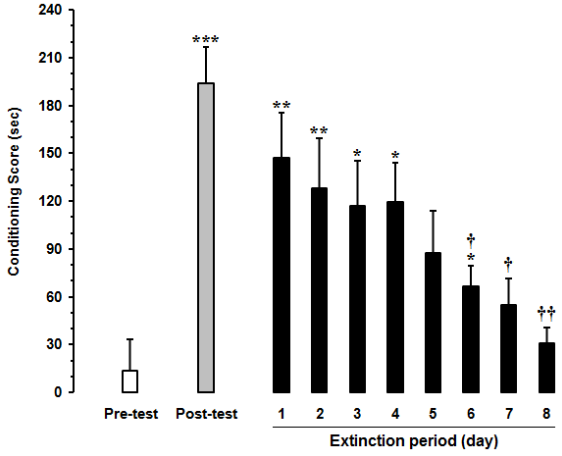
## نتایج

**نتایج رفتاری. بررسی دوز- پاسخ مصرف مورفین در دوره اکتساب.** در مطالعه حاضر، یافته‌های به‌دست آمده از منحنی دوز-پاسخ مورفین در شکل ۱ نشان می‌دهد که تزریق دوزهای متفاوت مورفین (۰/۵ mg/kg، ۵ و ۱۰) به صورت وابسته به دوز موجب افزایش نمره شرطی‌سازی می‌گردد. هم‌چنین نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک‌طرفه به‌دنبال پس‌آزمون Dunnett نشان داد که بین گروه‌های دریافت‌کننده مورفین اختلاف معنی‌داری در فعالیت حرکتی وجود ندارد [$F(3,29)=9/02$، $P=0/0003$] لازم به‌ذکر است که با توجه به یافته‌های به‌دست آمده از منحنی دوز-پاسخ مورفین بر ترجیح مکان شرطی، از دوز موثر ۵ mg/kg زیر جلدی مورفین در مطالعه مربوط به دوره ترک ناشی از مورفین استفاده شد.




شکل ۱. اثر دوزهای متفاوت مورفین در ترجیح مکان شرطی. همانطور که دیده می شود، دوز ۵ بهترین دوز مورفین در مدل ترجیح مکان شرطی است. $P<0.01$ ** نشان دهنده اختلاف نسبت به گروه سالین

**بررسی نمره شرطی شدن در دوره ترک ناشی از مصرف مورفین.** در این بخش از مطالعه پس از شرطی شدن حیوانات با دوز موثر ۵ mg/kg از یافته‌های بخش پیشین، حیوانات به مدت ۸ روز بدون دریافت مورفین به طور آزادانه در جعبه شرطی‌سازی قرار گرفتند و به مدت ۳۰ دقیقه با استفاده از اتویژن فعالیت حرکتی و زمان سپری شده در جعبه CPP بررسی گردید. نتایج به‌دست آمده از آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد [$F(9,70)=2/655$، $P<0/01$] که نمره شرطی‌سازی روزهای ۶، ۷ و ۸ تفاوت معنی‌داری نسبت به آزمون CPP در روز تست (Post-conditioning) نشان می‌دهند؛ به طوری که روزهای ۷ و ۸ با آزمون پیش شرطی‌سازی (Pre-test) اختلاف معنی‌داری ندارند، لذا در دو روز متوالی علائمی از ترجیح مکان شرطی وجود نداشت و بنابراین extinction رخ داده است. لازم به ذکر است جهت بررسی مولکولی فاکتورهای آپوپتوز از موش‌هایی که در روزهای چهارم (هنوز حیوان ترجیح مکان شرطی به مورفین دارد) و هشتم (حیوان دیگر ترجیح مکان شرطی به مورفین ندارد) که در دوره ترک مصرف مورفین قرار داشتند، استفاده گردید (شکل ۲).




شکل ۲. بررسی اثر مورفین در مدل ترجیح مکان شرطی در روزهای پیش شرطی سازی (Pre-test)، پس از شرطی سازی (Post-test) و در طول دوره ترک مورفین به مدت هشت روز. داده های مربوط به نمرات شرطی سازی نشان می دهد که در روزهای ۶، ۷ و ۸ دوره ترک مورفین نسبت به زمان پس از شرطی سازی (Post-test)، کاهش معنی داری یافته است.

$P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ * نشان دهنده اختلاف نسبت به آزمون پیش از شرطی سازی (Pre-test) می باشد.

$P<0.05$, †† $P<0.01$ † نشان دهنده اختلاف نسبت به آزمون پس از شرطی سازی (post-test) می باشد.

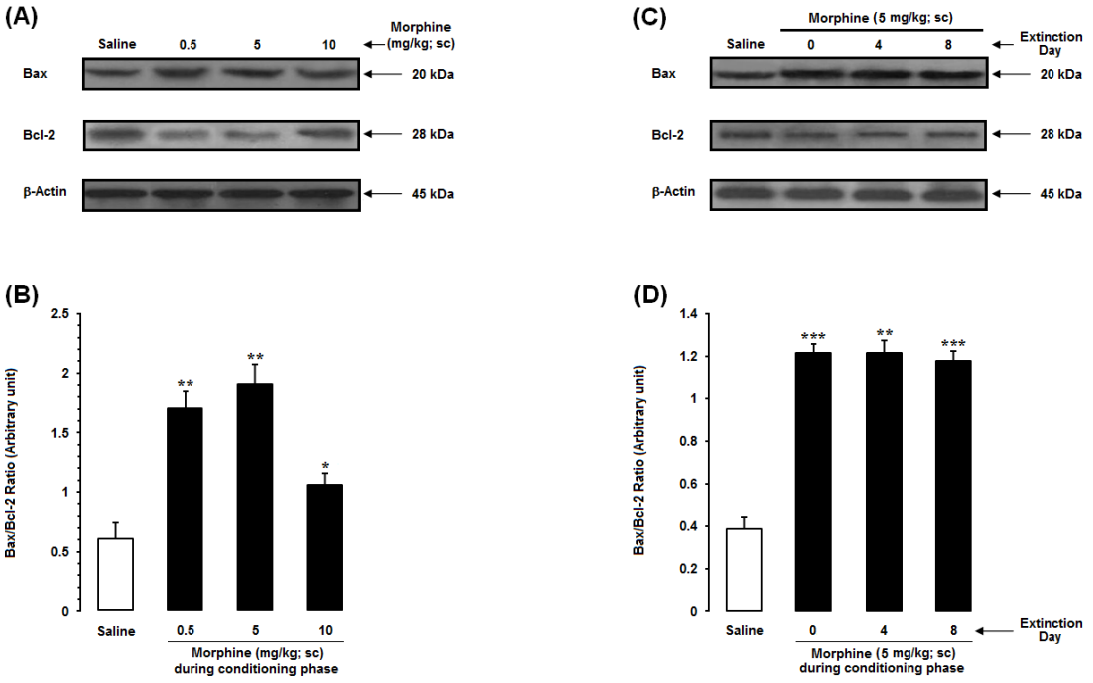


[ Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04 ]

**نتایج مولکولی.** اثر مورفین بر تغییر فاکتورهای آپوپتوزی Bax/Bcl-2 در ناحیه تگمنتوم شکمی در دوره اکتساب و ترک

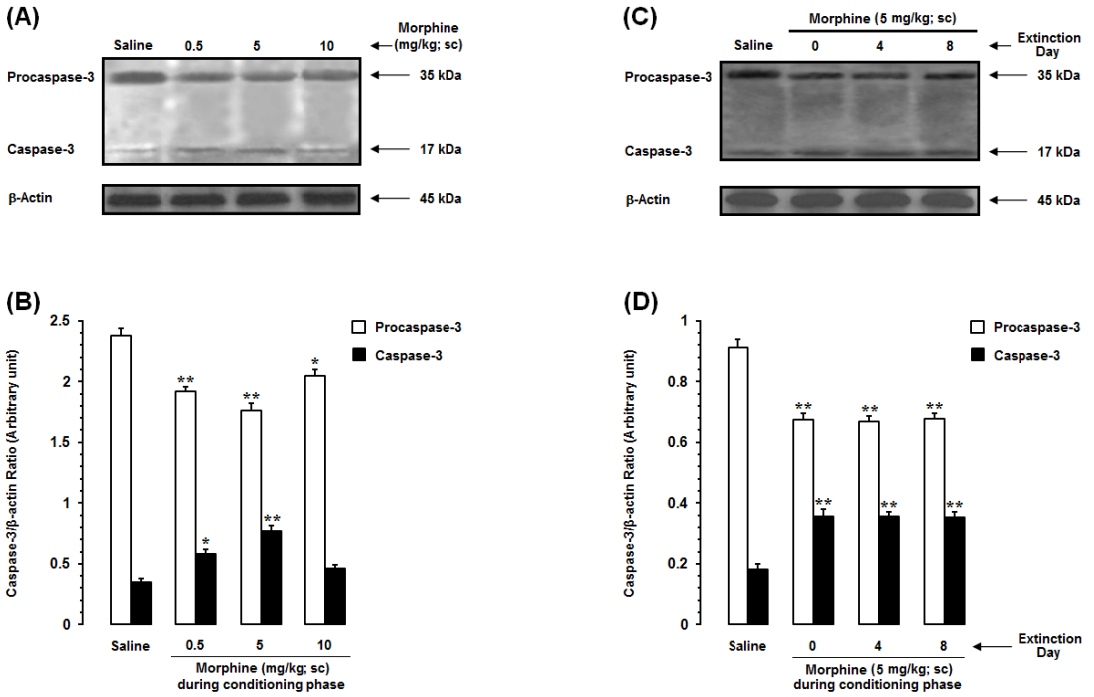
خانواده پروتئین‌های Bcl-2 از دو گروه جداگانه پروآپوپتوتیکی و ضدآپوپتوتیکی مشتق شده است. Bcl-2 با وزن ۲۸ کیلودالتون با نقش ضد آپوپتوزی، مانع از مرگ سلول‌ها می‌شود. بر اساس این یافته‌ها و مطالعه اثر مورفین بر مسیر آپوپتوتیکی، سطح پیش‌برنده آپوپتوزی پروتئین Bax و ضد آپوپتوزی Bcl-2 به‌وسیله تکنیک وسترن‌بلات با دوزهای مختلف مورفین (۰/۵ mg/kg، ۵ و ۱۰) اندازه‌گیری شد. شکل ۳ (A, B)، نتایج حاصل از تغییر نسبت Bax/Bcl-2 در ناحیه VTA موش در دوزهای مختلف مورفین را پس از آزمون Kruskal-Wallis نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود نسبت پروتئین Bax/Bcl-2 در تمامی دوزها به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه سالین افزایش یافته است، که بیش‌ترین میزان افزایش این نسبت در دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم دیده می‌شود [P<۰/۰۱]. این در حالی است که تغییر این نسبت در طول دوره ترک حیوان تفاوت معنی‌داری با روز آزمون CPP پس از دوره شرطی‌سازی نشان نمی‌دهد (شکل ۳؛ C, D).

**اثر مورفین بر تغییر فاکتور آپوپتوزی caspase-3 در ناحیه تگمنتوم شکمی در دوره اکتساب و ترک.** کاسپاز-۳ جزء کاسپازهای اجرایی بوده و در مسیرهای داخلی و خارجی آپوپتوز نقش به‌سزایی دارد. فعال شدن این مولکول در اکثر سیستم‌های سلولی با تأثیر بر روی سوبستراهای خود باعث القای آپوپتوز می‌شود. در بررسی اثرات مورفین بر کاسپاز-۳ نتایج آزمون Kruskal-Wallis نشان داد (شکل ۴؛ A, B) که سطح کاسپاز شکسته شده به‌طور معنی‌داری در حضور مورفین (۵ mg/kg) در مقایسه با گروه سالین افزایش داشته است [P<۰/۰۱]. هم‌چنین در طول دوره ترک در روزهای ۴ و ۸ در دوز (۵ mg/kg) هیچ‌گونه تغییری در روند آپوپتوز ایجاد نشده است (شکل ۴؛ C, D).

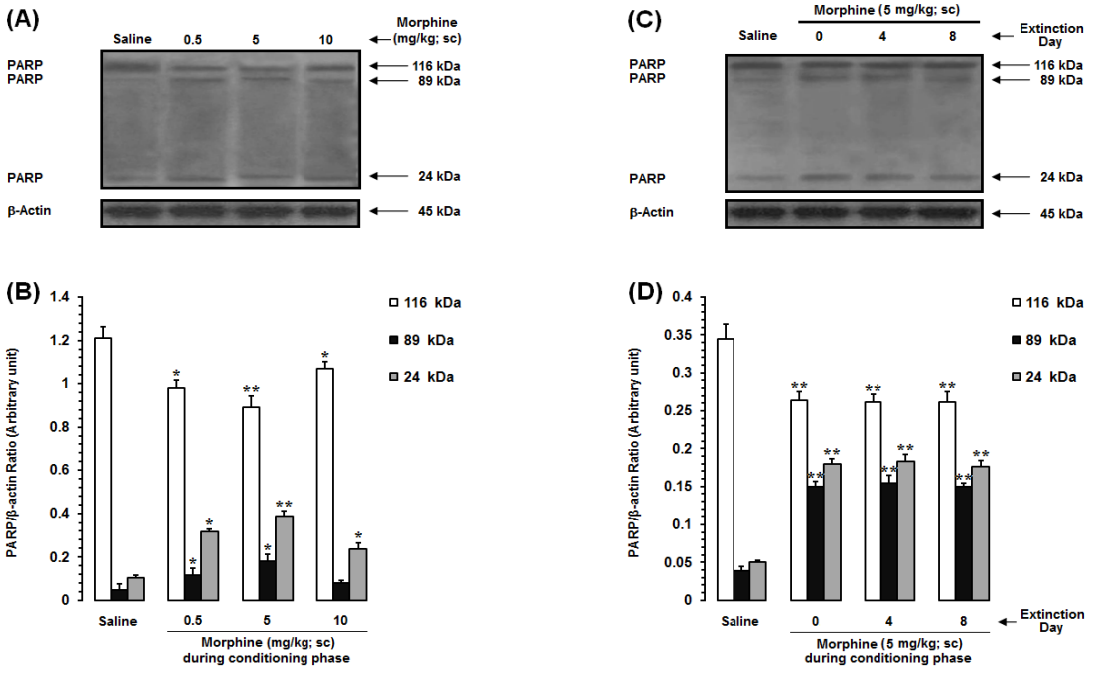



شکل ۳. بررسی اثرات پاداشی دوزهای مختلف مورفین بر نسبت Bax/Bcl-2 در روند اکتساب (A,B) و دوره ترک مصرف مورفین (C,D). دوزهای مختلف مورفین در دوره اکتساب سبب تغییر باند پروتئینی (A) و نسبت میانگین دانسیته (B) پروتئین های Bax/Bcl-2 گردیدند. این در حالی است که در دوره ترک مورفین در روزهای ۴و ۸ تفاوت معنی داری در تغییر باند پروتئینی (C) و نسبت میانگین دانسیته (D) پروتئین های Bax/Bcl-2 رخ نداده است.
* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 نشان دهنده اختلاف نسبت به سالین

[ Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04 ]




شکل۴. بررسی اثرات پاداشی دوزهای مختلف مورفین بر بیان پروتئین caspases-3 در روند اکتساب (A,B) و دوره ترک مصرف مورفین (C,D). دوزهای مختلف مورفین در دوره اکتساب سبب تغییر باند پروتئینی (A) و میانگین دانسیته (B) پروتئین caspases-3 گردیدند. این در حالی است که در دوره ترک مورفین در روزهای ۴و ۸ تفاوت معنی داری در تغییر باند پروتئینی (C) و میانگین دانسیته (D) پروتئین caspases-3 دیده نشده است. لازم بذکر است که تغییر باند پروتئینی و میانگین دانسیته Procaspase-3 به عنوان شکل غیرفعال پروتئین caspases-3 در این شکل نیز نشان داده شده است.
* نشان دهنده اختلاف نسبت به سالین P<0.05, ** P<0.01




شکل ۵. بررسی اثرات پاداشی دوزهای مختلف مورفین بر بیان پروتئین های PARP (۲۴ و ۸۹ کیلو دالتونی) در روند اکتساب (A,B) و دوره ترک مصرف مورفین (C,D). دوزهای مختلف مورفین در دوره اکتساب سبب تغییر باند پروتئینی (A) و میانگین دانسیته (B) پروتئین های ۲۴ و ۸۹ کیلو دالتونی PARP گردیده که نشاندهنده فعالیت caspase-3 در روند آپوپتوز است. این در حالی است که در دوره ترک مورفین در روزهای ۴ و ۸ تفاوت معنی داری در تغییر باند پروتئینی (C) و میانگین دانسیته (D) پروتئین های PARP دیده نشده است. لازم بذکر است که تغییر باند پروتئینی و میانگین دانسیته پروتئین ۱۱۶ کیلو دالتونی به عنوان شکل فعال پروتئین PARP نیز در این شکل نیز نشان داده شده است. * نشان دهنده اختلاف نسبت به سالین P<0.05, ** P<0.01

[ Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04 ]

**اثر مورفین بر تغییر فاکتور آپوپتوزی PARP در ناحیه تگمنتوم شکمی در دوره اکتساب و ترک.** PARP اولین پروتئینی است که به عنوان سوبسترای کاسپازها شناخته شده است، در آسیب‌های DNA وارد عمل شده و فعال شدن کاسپاز-۳ منجر به شکست آنزیمی و غیر فعال شدن مولکول PARP می‌شود. PARP دارای سه زیرواحد ۲۴، ۸۹ و ۱۱۶ دالتونی است که زیرواحدهای ۸۹ و ۲۴ نشان‌دهنده آپوپتوز و تاییدکننده فعالیت کاسپاز-۳ می‌باشد، همان‌طور که از شکل ۵ (A, B) مشخص است آزمون Kruskal-Wallis نشان داد که نسبت پروتئین PARP در تمامی دوزها به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه سالین افزایش یافت که بیش‌ترین افزایش این نسبت در دوز ۵ mg/kg دیده شد [P<۰/۰۵]. این در حالی است که تغییر این نسبت در طول دوره ترک حیوان تفاوت معنی‌داری با روز آزمون CPP پس از دوره شرطی‌سازی نشان نداد (شکل ۵؛ C, D).

## بحث و نتیجه‌گیری

تحقیقات متعدد نشان داده است که مورفین موجب القا آپوپتوز در نورون‌ها می‌شود [۲,۱]، در حالی که تحقیقات دیگری دلالت بر نقش حفاظتی مورفین دارند [۱۸]. نتایج ما خواص پاداشی مورفین در دوزهای ۵ mg/kg و ۱۰ در مدل ترجیح مکان شرطی را نشان داد. هم‌چنین در این مطالعه مقدار فاکتورهای آپوپتوزی ناحیه VTA موش تیمار شده به مورفین در روش ترجیح مکان شرطی با تکنیک وسترن‌بلات مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که مورفین می‌تواند مقدار فاکتورهای آپوپتوزی را در ناحیه VTA در مقایسه با گروهی که سالین دریافت کرده به‌طور معنی‌داری افزایش دهد. از طرفی در ناحیه VTA دوز ۵ mg/kg مورفین توانست اثرات آپوپتوتیکی بیش‌تری در بیان پروتئین caspase-3, Bax/Bcl-2 و PARP نسبت به بقیه دوزها نشان دهد. علاوه بر این تغییر در فاکتورهای آپوپتوزی فوق در طول دوره ترک حیوان در روزهای چهارم و هشتم تفاوت معنی‌داری با روز آزمون CPP پس از دوره شرطی‌سازی نشان نداد. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که مورفین مزمن، القاکننده آپوپتوز در شاخ پشتی طناب نخاعی است [۱۴]. علاوه بر این مشخص شده است که تیمار طولانی‌مدت مورفین با افزایش فاکتور پروتئینی گیرنده‌ی FAS (پروآپپتوزی) و کاهش فاکتور پروتئینی Bcl-2 (ضد آپوپتوزی) موجب القای آپوپتوز در مغز موش آزمایش‌گاهی می‌شود [۱۰]. هم‌چنین استفاده از مورفین به صورت طولانی‌مدت منجر به القای آپوپتوز در نواحی مختلف مغزی از جمله نواحی CA1, CA2, CA3 هیپوکامپ می‌گردد [۱۹]. از نتایج این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت افزایش فاکتورهای آپوپتوزی در اثر مورفین می‌تواند از طریق فعال شدن گیرنده‌های اپیوئیدی ایجاد شده باشد. چنان‌چه در تحقیقات گذشته ثابت شده است که مورفین از طریق فعال کردن گیرنده‌های اپیوئیدی می‌تواند مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی را راه‌اندازی کند [۱۰]. در ناحیه VTA مورفین در دوز ۵ mg/kg توانست اثرات آپوپتوتیک بیش‌تری نشان دهد که این می‌تواند نتیجه تفاوت در تعداد و نوع گیرنده‌های اوپیوئیدی در این ناحیه باشد [۲۰]. از نتایج این تحقیق و کارهای گذشته می‌توان چنین برداشت کرد که مورفین از طریق گیرنده‌های مختلفی در نورون‌ها آپوپتوز ایجاد می‌کند. توانایی مورفین و DAMGO (آگونیست اختصاصی گیرنده مو) را در القا آپوپتوز در لنفوسیت‌های T از طریق کاهش در بیان پروتئین آنتی‌آپوپتوزی BCL-2 و افزایش در بیان پروتئین پروآپوپتوزی Bax نشان داده‌اند [۲۱]. هم‌چنین دیده شده است که در موش‌هایی که گیرنده مو نداشتند، سیگنال بقای سلولی در نورون‌های هیپوکامپ افزایش داشته است [۲۲] که می‌تواند نشان‌دهنده تاثیر مورفین از طریق گیرنده‌های اختصاصی مثل مو بر فرایند آپوپتوز باشد. هم‌چنین از بین این سه نوع گیرنده مو، دلتا و کاپا، گیرنده مو بیش‌ترین میل اتصالی (affinity) را به مورفین داشته و این در حالی است که مطالعه‌ای نشان داده است که اوپیوئیدها از طریق گیرنده دلتا با فعال کردن مسیر سیگنالینگ ERK1/2 باعث مهار FADD و راه‌اندازی سیگنال‌های حیاتی در سلول می‌شود و در موش‌های فاقد گیرنده دلتا چنین مهاری دیده نشده است [۲۳].

[ Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04 ]

مطالعات دیگری نیز بر اثرات حفاظتی و ضد آپوپتوزی مورفین اشاره دارند. دیده شده است که تزریق هم‌زمان مورفین با عوامل دوپامینرژیک، علائم بیماری پارکینسون را در میمون پارکینسونی کاهش می‌دهد که نشان‌دهنده نقش حفاظتی مورفین می‌باشد [۲۵،۲۴]. در کار تحقیقاتی دیگری نیز اثر حفاظتی مورفین بر آپوپتوز القاشده با پراکسی‌نیتریت در آستروسیت‌های موش آزمایش‌گاهی نشان داده شده است [۲۶]. در مطالعه حاضر در ناحیه VTA در دوز ۱۰ mg/kg کاهش فاکتور آپوپتوزی دیده شد که می‌تواند نشان‌دهنده فعال شدن مسیرهای حفاظتی توسط مورفین در مقابل آپوپتوز به واسطه گیرنده‌های دیگری در ناحیه VTA باشد. در کار تحقیقی حاضر افزایش مقدار فاکتورهای آپوپتوزی در پاسخ به تزریق میان مدت مورفین در دوزهای مختلف در ناحیه VTA (بیش‌ترین افزایش در دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) که ناحیه درگیر در مدار پاداش می‌باشد، می‌تواند بیانگر این باشد که اثرات آپوپتوتیک مورفین در مسیر هسته‌های Reward می‌تواند تغییر کند. لذا ادامه این مطالعه در درازمدت برای دست‌یابی به روش‌های جدید در جهت کاهش اثرات سوءمصرف مواد و جلوگیری از مرگ سلولی نواحی دخیل در مدار پاداش در معتادان می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. از طرفی بررسی نوع گیرنده و تعداد گیرنده‌های اپیوئیدی در این نواحی جهت دست‌یابی به اطلاعات دقیق‌تر به تغییر در فاکتورهای آپوپتوز در این نواحی در مطالعات بعدی لازم به نظر می‌رسد که به‌دلیل محدودیت‌های زمانی و مالی انجام بررسی اختصاصی این گیرنده‌ها به مطالعات بعدی موکول گردید.

## تشکر و قدردانی

این پژوهش با استفاده از اعتبارات مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به انجام رسید که بدین‌وسیله از حمایت‌های مادی و معنوی آن مرکز سپاس‌گزاری می‌شود.

## منابع

[1] Hsiao PN, Chang MC, Cheng WF, Chen CA, Lin HW, Hsieh CY, Sun WZ. Morphine induces apoptosis of human endothelial cells through nitric oxide and reactive oxygen species pathways. Toxicology 2009; 256: 83-91.

[2] Bryant L, Doyle T, Chen Z, Cuzzocrea S, Masini E, Vinci MC, et al. Spinal ceramide and neuronal apoptosis in morphine antinociceptive tolerance. Neurosci Lett 2009; 463: 49-53.

[3] Cunha-Oliveira T, Rego AC, Oliveira CR. Cellular and molecular mechanisms involved in the neurotoxicity of opioid and psychostimulant drugs. Brain Res Rev 2008; 58: 192-208.

[4] Moaddab M, Haghparast A, Hassanpour-Ezatti M. Effects of reversible inactivation of the ventral tegmental area on the acquisition and expression of morphine-induced conditioned place preference in the rat. Behav Brain Res 2009; 198: 466-471.

[5] Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G. Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92: 12304-12308.

[6] Sahraei H, Amiri YA, Haeri-Rohani A, Sepehri H, Salimi SH, Pourmotabbed A, et al. Different effects of GABAergic receptors located in the ventral tegmental area on the expression of morphine-induced conditioned place preference in rat. Eur J Pharmacol 2005; 524: 95-101.

[7] Oliveira MT, Rego AC, Morgadinho MT, Macedo TR, Oliveira CR. Toxic effects of opioid and stimulant drugs on undifferentiated PC12 cells. Ann N Y Acad Sci 2002; 965: 487-496.

[8] Ammon-Treiber S, Hollt V. Morphine-induced changes of gene expression in the brain. Addict Biol 2005; 10: 81-89.

[9] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol 2007; 35: 495-516.

[10] Boronat MA, Garcia-Fuster MJ, Garcia-Sevilla JA. Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in rat brain. Br J Pharmacol 2001; 134: 1263-1270.

[11] Greeneltch KM, Kelly-Welch AE, Shi Y, Keegan AD. Chronic morphine treatment promotes specific Th2 cytokine production by murine T cells in vitro via a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. J Immunol 2005; 175: 4999-5005.

[12] Skommer J, Wlodkowic D, Deptala A. Larger than life: Mitochondria and the Bcl-2 family. Leuk Res 2007; 31: 277-286.

[13] Zhang Y, Chen Q, Yu LC. Morphine: a protective or destructive role in neurons? Neuroscientist 2008; 14: 561-570.

[14] 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: 7650-7661.

[15] Taslimi Z, Haghparast A, Hassanpour-Ezatti M, Safari MS. Chemical stimulation of the lateral hypothalamus induces conditioned place preference in rats: Involvement of OX1 and CB1 receptors in the ventral tegmental area. Behav Brain Res 2010; 217: 41-46.

[16] Azizi P, Haghparast A, Hassanpour-Ezatti M. Effects of CB1 receptor antagonist within the nucleus accumbens on the acquisition and expression of morphine-induced conditioned place preference in morphine-sensitized rats. Behav Brain Res 2009; 197: 119-124.

[17] Haghparast A, Taslimi Z, Ramin M, Azizi P, Khodagholi F, Hassanpour-Ezatti M. Changes in phosphorylation of CREB, ERK, and c-fos induction in rat ventral tegmental area, hippocampus and prefrontal cortex after conditioned place preference induced by chemical stimulation of lateral hypothalamus. Behav Brain Res 2011; 220: 112-118.

[18] Qian L, Tan KS, Wei SJ, Wu HM, Xu Z, Wilson B, et al. Microglia-mediated neurotoxicity is inhibited by morphine through an opioid receptor-independent reduction of NADPH oxidase activity. J Immunol 2007; 179: 1198-1209.

[19] Atici S, Cinel L, Cinel I, Doruk N, Aktekin M, Akca A, et al. Opioid neurotoxicity: comparison of morphine and tramadol in an experimental rat model. Int J Neurosci 2004; 114: 1001-1011.

[20] Le Merrer J, Becker JA, Befort K, Kieffer BL. Reward processing by the opioid system in the brain. Physiol Rev 2009; 89: 1379-1412.

[21] Singhal PC, Kapasi AA, Reddy K, Franki N, Gibbons N, Ding G. Morphine promotes apoptosis in Jurkat cells. J Leukoc Biol 1999; 66: 650-658.

[ Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04 ]

[22] Harburg GC, Hall FS, Harrist AV, Sora I, Uhl GR, Eisch AJ. Knockout of the mu opioid receptor enhances the survival of adult-generated hippocampal granule cell neurons. Neuroscience 2007; 144: 77-87.

[23] Garcia-Fuster MJ, Miralles A, Garcia-Sevilla JA. Effects of opiate drugs on Fas-associated protein with death domain (FADD) and effector caspases in the rat brain: regulation by the ERK1/2 MAP kinase pathway. Neuropsychopharmacology 2007; 32: 399-411.

[24] Samadi P, Gregoire L, Bedard PJ. Opioid antagonists increase the dyskinetic response to dopaminergic agents in parkinsonian monkeys: interaction between dopamine and opioid systems. Neuropharmacology 2003; 45: 954-963.

[25] Berg D, Becker G, Reiners K. Reduction of dyskinesia and induction of akinesia induced by morphine in two parkinsonian patients with severe sciatica. J Neural Transm 1999; 106: 725-728.

[26] Kim MS, Cheong YP, So HS, Lee KM, Kim TY, Oh J, et al. Protective effects of morphine in peroxynitrite-induced apoptosis of primary rat neonatal astrocytes: potential involvement of G protein and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 kinase). Biochem Pharmacol 2001; 61: 779-786.

[ Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04 ]

# Changes in apoptotic factors caspase-3, PARP and Bax/Bcl-2 ratio in the ventral tegmental area after the acquisition and extinction of morphine-induced conditioned place preference in the rat

Yasaman Razavi (M.Sc)[1,2], Najmeh Katebi (M.Sc)[1,2], Shabnam Zeighamy Alamdary (M.Sc)[2], Shahrbanoo Oryan (Ph.D)[1], Fariba Khodagholi (Ph.D)[2], Abbas Haghparast (Ph.D)[2*]

*1- Dept. of Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*

*2- Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

(Received: 28 Oct 2012; Accepted: 2 Feb 2013)

***Introduction****:* Chronic high doses of morphine inhibit cell proliferation and induce cell death. One of the centers in reward pathway is the ventral tegmental area (VTA). Stimulation of opioid receptors in the reward circuit in the brain by morphine could be enabling a factor induce apoptosis in some brain regions, and expression of death receptors increases on the cell surface. This study was designed to evaluate the effect of morphine on changes in apoptotic factors (Bax/Bcl-2, PARP and caspase-3) in the VTA during the acquisition of morphine-induced conditioned place preference (CPP) and extinction period.

***Materials and Methods****:* In this study, in behavioral experiments, the CPP paradigm was done on 64 adult male albino Wistar rats. In saline-control and three doses of morphine (0.5, 5, 10 mg/kg) experimental groups in acquisition, in addition with effective dose of morphine (5 mg/kg) evaluate extinction period (8 days). Then, in the molecular section the changes in apoptotic proteins assess with western blot technique.

***Results:*** We found that apoptotic factors increase in all three experimental groups in response to morphine. However, the most response was significantly occurred at the dose of 5 mg/kg morphine. Additionally, there is no change has been seen in the apoptotic factors during the extinction period.

***Conclusion:*** It seems that morphine in all doses cause apoptosis, but quite contrary, by increasing the dose of morphine, the number of receptors involved in apoptosis increases and morphine's neuroprotective effects are appeared.

***Keywords*****:** Apoptosis, Ventral tegmental area, Morphine, Conditioned place preference, Western blot, Rat

* Corresponding author: Fax: +98 21 22431624; Tel: +98 9122149857

haghparast@yahoo.com

[ Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04 ]