مقایسه بیان فاکتور رونویسی C-FOS در موش‌های سوری نر و ماده طی قطع وابستگی به مرفین با و بدون تجویز حاد بابونه

دکتر مهناز کسمتی*، دکتر حمید گله داری**، آذر مساح***

* دانشیار گروه زیست شناسی، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم
** دانشیار گروه ژنتیک، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم
*** کارشناس ارشد گروه زیست شناسی، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم

تاریخ دریافت مقاله : ۸۷/۳/۱۳
تاریخ پذیرش مقاله : ۸۷/۱۲/۲۴

Downloaded from zjrms.ir at 8:45 +0430 on Saturday May 25th 2019

چکیده

زمینه و هدف: برخی مطالعات حاکی از تفاوت وابستگی به داروهای مخدر و پاسخ به درمان‌های دارویی گیاهی و صناعی بین جنس نر و ماده است. از آنجائی که نشان داده شده بیان فاکتور رونویسی C-FOS به هنگام سندرم ترک مرفین در بسیاری از مناطق مغز حیوانات نر افزایش چشم‌گیری می‌یابد و با توجه به اثر تسکینی و آرام‌بخشی گیاه بابونه، این مطالعه با هدف مقایسه تغییرات این فاکتور در زمان قطع وابستگی به مرفین با و بدون تجویز این داروی گیاهی در مغز موش سوری نر و ماده بالغ طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش کار: در این مطالعه آزمایشگاهی که در سال ۱۳۸۶ در دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شد از ۵۶ سر موش سوری نر و ماده نژاد NMRI در قالب ۸ گروه ۷ تایی استفاده شد گروه‌ها شامل: دریافت کننده مرفین+سالین، مرفین+ نالوکسان، مرفین+عصاره هیدروالکلی بابونه (۳۰ mg/kg)+ نالوکسان و مرفین+سالین+ نالوکسان بودند. برای ایجاد وابستگی از دوز فزاینده مرفین (۸۰ mg/kg و ۴۰، ۲۰) طی چهار روز استفاده شد و جهت قطع وابستگی مرفین، نالوکسان(۵mg/kg) تزریق شد. جهت بررسی سلولی mRNA، بافت مغز ۹۰ دقیقه پس از تیمار در هر گروه استخراج شد. با استفاده از پروب نشاندارC-FOS و بتااکتین (کنترل مثبت) و روش dot bloting میزان بیان C-FOS به کمک نرم افزار Zero Dscan به دست آمد و با آزمون های t، ANOVA و Duncan و نرم افزار SPSS آنالیز گردید و سطح معنی داری نیز P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: بر اساس یافته های این مطالعه میزان بیان فاکتور رونویسی C-FOS در مغز موش‌های نر پس از قطع مرفین توسط نالوکسان افزایش یافته بود در حالی‌که در موش‌های ماده این میزان کاهش یافته بود (P<۰/۰۱). عصاره بابونه باعث کاهش میزان فاکتور رونویسی C-FOS در مغز موش های نر شد در حالی‌که در موش‌های ماده اثر تقویتی داشت (P<۰/۰۵).

نتیجه گیری: به نظر می رسد فرآیندهای سلولی دخیل در وابستگی به مرفین و پاسخ به درمان بابونه وابسته به جنس بوده و احتمالا این تفاوت در پاسخ‌دهی مربوط به نقش هورمون‌های جنسی در فرآیند های فوق می باشد. **(مجله طبیب شرق، دوره ۱۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۸، ص۱ تا ۱۰)**

کلیدواژه ها: وابستگی به مرفین، C-FOS، بابونه، موش سوری

مقدمه

علی‌رغم مطالعات زیادی که در زمینه وابستگی به مواد مخدر صورت می‌گیرد مکانیسم‌های دقیق وابستگی اوپیوئیدی به خوبی مشخص نشده است. با این حال شواهد اخیر نشان می‌دهد که سازش‌های طولانی مدت ناشی از مصرف مکرر داروهای اوپیوئیدی، مستلزم تغییر در بیان ژن می باشد.[۱،۲] اکنون مشخص شده که تنظیم افزایشی مسیر cAMP نقش مهمی در ایجاد وابستگی به مرفین و همچنین بیان ژن های اولیه فوری مانند فاکتورهای رونویسی C-FOS، به هنگام ترک مرفین در

آدرس نویسنده مسئول: اهواز، دانشگاه شهید چمران
Email: mahnazkessmati@yahoo.com

Downloaded from zjrms.ir at 8:45 +0430 on Saturday May 25th 2019

حیوانات نر دارد.[۳] از طرفی بررسی ها نشان می‌دهند که بیان فاکتور رونویسی C-FOS، به هنگام سندرم ترک مرفین، در بسیاری از مناطق مغز افزایش چشمگیری می یابد.[۲،۳] از سوی دیگر گزارش هایی حاکی از تفاوت در بسیاری از پدیده های فیزیولوژیک و پاسخ به مواد مخدر و درمان‌های دارویی بین جنس نر و ماده وجود دارد. مطالعات قبلی ما نشان داده است که پاسخ‌های موش‌های نر و ماده به اثرات تسکینی عصاره بابونه در زمینه درد، اضطراب و فعالیت حرکتی متفاوت بوده است.[۷-۴]

اثرات ضد التهابی، ضد اسپاسم و آرام‌بخشی از جمله ویژگی‌های است که برای این گیاه در نظر گرفته شده است.[۷] اخیرا ثابت شده که عصاره این گیاه و برخی از ترکیبات فلاونوییدی آن، اثر تعدیلی بر علائم ناشی از قطع مصرف مرفین در موش‌های نر دارند.[۱۱-۸] همچنین نشان داده شده که عصاره بابونه قادر به مهار افزایش cAMP ناشی از ترک مرفین می‌باشد.[۱۲،۱۳] گزارش هایی نیز وجود داردکه نشان می دهد برخی از ترکیبات بابونه مانند آپی ژنین و کامازولن، اثر مهاری بر تنظیم افزایشی پروتئین در سطح رونویسی دارند.[۱۴، ۱۰]

از آنجا که بیان فاکتور رونویسی C-FOS، به هنگام سندرم ترک مرفین می‌تواند شاخصی برای بررسی میزان وابستگی به مرفین باشد[۲،۳] به نظر می‌رسد که توانایی داروهای موثر در مهار وابستگی به مرفین از این طریق قابل ارزیابی و بررسی باشد. جهت دستیابی به این مهم و با توجه به بررسی‌های گذشته، تحقیق حاضر به منظور بررسی و مقایسه بیان فاکتور رونویسی C-FOS در مغز به هنگام قطع وابستگی به مرفین در حضور و غیاب عصاره بابونه در موش های سوری نر و ماده بالغ صورت گرفته است.

روش کار

در این مطالعه آزمایشگاهی (Animal Study) که در سال ۱۳۸۶ در دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شد از ۵۶ سر موش سفید آزمایشگاهی کوچک (سوری) نر و ماده بالغ از نژاد (NMRI(Naval Medical Research Institute به ترتیب با میانگین وزن ۲±۴۰ و ۳±۳۵گرم استفاده شد. موش‌ها تحت شرایط کنترل شده (دمای C ۲±۲۳، سیکل‌های روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته) در قفس های مخصوص وگروه‌های تصادفی ۷ تایی نگهداری شدند. این حیوانات از آب معمولی شهر و غذای فشرده آماده شرکت دام پارس تهران تغذیه شدند. حیوانات نر و ماده هر یک به صورت تصادفی به۴ گروه ۷ تایی زیر تقسیم شدند:

۱- گروه دریافت کننده مرفین + نالوکسان

۲- گروه دریافت کننده مرفین + سالین

۳- گروه دریافت کننده مرفین + عصاره بابونه + نالوکسان

۴- گروه دریافت کننده مرفین + سالین + نالوکسان

کلیه آزمایشات بین ساعت ۸ صبح تا ۲ بعد از ظهر و در آزمایشگاه گروه زیست شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شد. مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل مرفین تهیه شده از شرکت تماد ایران، نالوکسان هیدروکلراید از شرکت سهامی تولید دارو، گل بابونه تهیه شده از شرکت گل داروی اصفهان، کیت های استخراج mRNA و DNA، کیت سنتز cDNA، کیت تهیه پروب، کیت تخلیص محصول PCR(تهیه شده از شرکت ROCHE)، مواد PCR، غشاء نایلونی (شرکت ROCHE) و نیتروژن مایع بود. وسایل مورد استفاده نیز شامل تانک الکتروفورز، آون هیبریداسیون، دستگاه اتوکلاو و انکوباتور متحرک بود. برای القاء وابستگی وایجاد اعتیاد به مرفین به مدت چهار روز و برای ده نوبت، حیوانات دوزهای افزاینده مرفین را به صورت زیرپوستی به ترتیب زیر دریافت کردند: روز اول سه نوبت با دوز mg/kg ۲۰، روز دوم سه نوبت با دوز mg/kg۴۰ و روز سوم هم سه نوبت با mg/kg ۸۰ مرفین. موش‌ها صبح روز چهارم یک دوز نهایی mg/kg ۴۰ از مرفین را دریافت کردند. برای القا ترک مرفین سه ساعت پس از دریافت آخرین دوز مرفین، نالوکسان با دوزmg/kg۵ به صورت

Downloaded from zjrms.ir at 8:45 +0430 on Saturday May 25th 2019

داخل صفاقی به حیوانات داده شد.[۱۵] دوزهای تزریقی مرفین با حل کردن آن در ۱۰ میلی لیتر سالین (برای هزار گرم) روزانه تهیه شد و حجم تزریقی متناسب با وزن حیوان انتخاب وسپس تزریق انجام شد. برای تهیه عصاره هیدروالکلی گل بابونه (گونه ایرانی با نام علمی Matricaria recutita) از روش خیساندن استفاده شد.[۱۶] ابتدا سرشاخه های گل دار بابونه جدا و با آسیاب برقی خرد شدند. سپس ۲۰گرم از این پودر با ۲۰۰میلی لیتر الکل ۷۰درجه مخلوط شد. در مدت ۴۸ ساعت هر ۱۲ساعت یک‌بار بطری تکان داده شد. مخلوط حاصله دوبار با کاغذ صافی، صاف شد. برای جدا کردن حلال از دستگاه روتاری استفاده شد. مایع حاصل روی یک قطعه شیشه به صورت یک لایه نازک پهن شد. پس از خشک شدن، عصاره به نرمی از روی شیشه جمع آوری و پودر کریستالی حاصل در جای خشک و خنک نگهداری شد. میزان مورد استفاده پودر گل بابونه ۳۰mg/kg بود. ۳۰ میلی‌گرم بابونه در ۱۰ میلی‌لیتر سالین (برای هزار گرم) حل و حجم تزریقی متناسب با وزن حیوان مورد استفاده قرار گرفت. هنگام قطع مصرف مزمن مرفین عصاره بابونه با دوز ۳۰mg/kg در روز آخر ۵ دقیقه قبل از نالوکسان به حیوانات داده شد.[۸،۱۰،۱۷] جهت بررسی مولکولی، موش‌ها در هر گروه، ۹۰دقیقه پس از دریافت نالوکسان و یا سالین کشته شدند و مغز آنها بلافاصله استخراج شده برای چند ثانیه در نیتروژن مایع قرار گرفت سپس بلافاصله وزن شده و تا مرحله استخراج mRNA برای نگهداری به دمای ۷۰ْC- منتقل شد.[۱۸] برای مقابله با آنزیم‌های RNAse که از مقاوم‌ترین آنزیم‌ها هستند و تمامیت RNA را در تمام مراحل استخراج و کار با آن تهدید می‌کنند، اقدامات احتیاطی انجام گرفت.

مرحله استخراج mRNA مغز موش توسط کیت mRNA Isolation Kit from Roche انجام گردید. در این کیت با استفاده از حضور دم پلی A در mRNA،از پروب الیگو-(dT)۲۰ نشاندار با بیوتین و ذرات مغناطیسی streptavidin برای جداسازی mRNA استفاده گردید. استخراج دقیقا به ازای ۱۰۰ میلی گرم بافت مغز صورت گرفت. سپس با استفاده از تکنیک دات بلا تینگ (Dot Blotting) میزان بیان C-FOS بررسی گردید. OD(Optic Density) هر نمونه mRNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری گردید(Gene quest) و به میزان مساوی ۱/۲ میکروگرم از هر نمونه mRNA روی نایلون تثبیت شد. برای تهیه پروب های ژن C-FOS وبتا اکتین، ابتدا پرایمرها توسط نرم افزار Primer 3 out و به کمک الگوی ترادف ژن‌های مذکور در بانک ژن MGI (MGI Accession ID: MGI:2656884) طراحی و توسط شرکت DNA Technology AIS دانمارک تهیه گردید.

برای تکثیر ژن بتا اکتین از PCR استفاده شد. cDNA سنتز شده از بافت مغز موش به عنوان الگوی Nested PCR به کار برده شد. واکنش مرحله اول Nested PCR با پرایمرهای بتا اکتین ۱ و واکنش مرحله دوم نستد PCR با بتا اکتین۲ انجام گرفت. ژنوم استخراج شده از بافت موش برای PCR ژن C-FOS استفاده و دمای اتصال پرایمرهای C-FOS، ۵۵ درجه سانتی گراد در ۳۵ سیکل اعمال شد. در مرحله بعد محصول PCR هر دو ژن، به کمک کیت High Pure from Roche PCR Product Purification Kit تخلیص گردید. با استفاده از روش نشان‌دار کردن تصادفی با دیگ اکسی ژنین -۱۱-dUTP، محصول تخلیص شده PCR اکتین و C-FOS با استفاده از کیت Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit from roche نشان‌دار شد. ارزیابی محصول نشان‌دار برای تعیین غلظت مناسب پروب نشان‌دار شده با تهیه رقت‌های متفاوت و مقایسه آنها با نمونه نشان‌دار کنترل موجود در کیت انجام شد. در مرحله هیبریداسیون، غشا نایلونی آماده شده از مرحله دات بلات در محلول حاوی پروب C-FOS در دمای ۶۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت قرار گرفت. سپس نایلون طی چند مرحله در بافرهایی مطابق دستورالعمل کیت فوق شستشو داده شد. در مرحله آخر با استفاده ازآنتی دیگ اکسی ژنین (Anti-DIG Alkalin

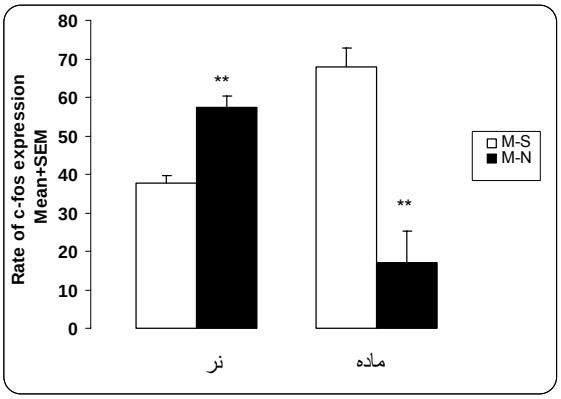
Downloaded from zjrms.ir at 8:45 +0430 on Saturday May 25th 2019

Phosphatase conjugate)، سیگنال ها ظاهر شدند. سپس با استفاده از نرم افزار دنسیتومتری Zero Dscan میزان بیان C-FOS در مغز موش‌ها و در شرایط قطع وابستگی به مرفین با و بدون استفاده از عصاره بابونه بررسی گردید.

داده های حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون های T و ANOVA و Duncan مقایسه شدند. سطح معنی داری در این حالات P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها

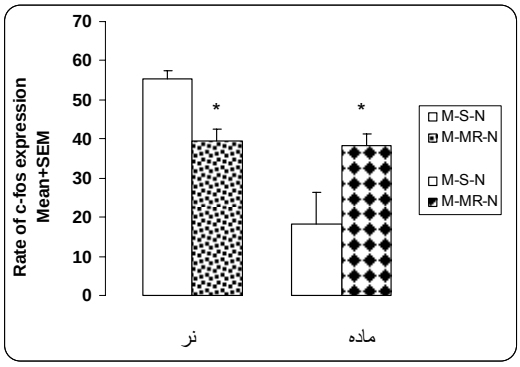
نمـودار ۱ میزان بیـان C-FOS را بین گـروه دریـافت‌کننده مرفین+ نالوکسان وگروه مرفین+ سالین در موش‌های نر و ماده به طور جداگانه نشان می‌دهد. آزمون‌های آنالیز واریانس و Duncan و t تفاوت معنی داری را به طور مستقل بین گروه‌های فوق در موشهای نر و ماده نشان داده است. (P<۰/۰۱) این نتیجه بیان می کند که تزریق نالوکسان(که القا کننده قطع مصرف مرفین است) با دوزmg/kg ۵ سه ساعت پس از آخرین تزریق مرفین باعث افزایش میزان بیان C-FOS در مغز موش نر شده است در حالی که در موش ماده اثر کاهش دهنده داشته است. (P<۰/۰۱)



نمودار۱: اثر تزریق نالوکسان بر میزان بیانC-FOS مغز در هنگام قطع مصرف مزمن مرفین در موشهای نر و ماده در مقایسه با گروه شاهد

N:Naloxone M:Morphine S: Saline *P<۰/۰۱ معنی‌دار است

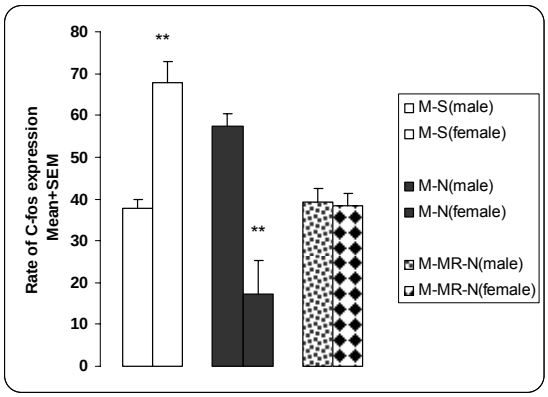
نمودار ۲ میزان بیانC-FOS در موش‌های نر و ماده دریافت کننده مرفین مزمن و عصاره بابونه با دوزmg/kg ۳۰ و نالوکسان (جهت القا قطع مصرف مرفین) و گروه شاهد آن‌ها را نشان می‌دهد. نتایج آماری نشان می دهد که پس از تزریق نالوکسان، تغییر معنی داری در بیان C-FOS هم در موش‌های نر و هم ماده در جهت مخالف بوجود می آید. (P<۰/۰۵) به عبارت دیگر تزریق عصاره بابونه باعث کاهش بیان C-FOS مغز حاصل از قطع مصرف مرفین شده در حالی که در موش‌های ماده باعث افزایش آن شده است.



نمودار۲: اثر تزریق عصاره بابونه با دوزmg/kg ۳۰بر میزان بیان C-FOS مغز به هنگام قطع مصرف مزمن مرفین در موش‌های نر و ماده در مقایسه با گروه شاهد

M: Morphine S: Saline N: Naloxone
MR: Matricaria Recutita *P<۰/۰۵ معنی‌دار است

نمودار ۳ میزان بیانC-FOS مغز موشهای نر و مـاده را طـی سه مرحلـه وابـستگی بـه مـرفین ، قطـع وابـستگی بـه مـرفین و در حضور عصاره بابونه مقایـسه نمـوده اسـت. آزمـون‌هـای آمـاری اختلاف معنی داری را بین مـوش‌هـای نـر و مـاده در مرحلـه اول یعنی دریافت مرفین و سالین بـا P<۰/۰۱ و در مرحلـه دوم یعنـی دریافت مرفین و نالوکسان با P<۰/۰۱ نشان می‌دهد در حـالی‌کـه در مرحله سوم یعنـی دریافـت عـصاره بابونـه (۳۰ mg/kg) طـی قطع وابستگی به مرفین اختلاف معنی داری بین مـوش‌هـای نـر و ماده مشاهده نشد. نتایج این مقایـسه نـشان مـی‌دهـد کـه بیـان C-FOS در موش‌های نر و ماده در طی وابـستگی و قطـع وابـستگی به مرفین بطور متفاوت عمل نموده و بابونه بیان فاکتور مذکور را متناسب با جنس و در جهت تعدیل بیان آن به پیش می برد.



نمودار۳: مقایسه موش‌های نر و ماده از نظر میزان بیانC-FOS مغز در هنگام وابستگی و قطع وابستگی به مرفین در حضور وغیاب بابونه بادوز۳۰ mg/kg

N: Naloxone M: Morphine MR: Matricaria Recutita
S: Saline *P<۰/۰۱ معنی‌دار است

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که پس از قطع مصرف مرفین توسط نالوکسان میزان بیان C-FOS در مغز موش نر افزایش معنی دار و در موش ماده کاهش چشمگیری دارد. از سوی دیگر مشاهده شد که عصاره بابونه اثر مهاری قابل ملاحظه ای را در بیان فاکتور رونویسی C-FOS پس از قطع مصرف مرفین در موش نر اعمال می‌نماید اما در موش ماده نه تنها از آن را ممانعت نمی‌کند بلکه به طور معنی داری افزایش می‌دهد. بدین ترتیب مشاهده می شود که بین موش نر و ماده هم از نظر پاسخ به داروی مخدر مرفین و هم نسبت به گیاه دارویی بابونه تفاوت آشکاری وجود دارد. در راستای این نتایج گزارشاتی وجود دارد که حاکی از اختلاف جنسیتی در پاسخ عصبی نسبت به مواد مخدر و درمان‌های دارویی می باشد، که موید نتایج این مطالعه می باشد. کرافت و همکاران اختلاف جنسی را در تحمل و وابستگی به مرفین گزارش داده‌اند [۱۹] ضمنا دسوزا و همکاران نیز نشان دادند که مرفین باعث بیان بیشتر C-FOS در استریاتوم موش‌های نر نسبت به ماده‌ها شده که این امر وابسته به استروئیدهای جنسی نمی‌باشد.[۲۰]

مطالعات ایمونوهیستوشیمی نیز نشان می‌دهد الگوی بیان C-FOS در پاسخ به مرفین به طور مشخصی بین جنس‌ها متفاوت است. به طوری که در موش نر دو ساعت پس از تزریق مرفین القا این فاکتور رونویسی به جز هسته های داخل تیغه ای تالاموس در بخش پشتی میانی هسته‌های پوتامن- دمدار و هسته اکومبنس نیز افزایش یافت. در موش‌های ماده فاکتور فوق در پوتامن-دمدار افزایش یافت و اختلافات بین گروهی فقط در ماده‌ها مشاهده شد و در هسته‌های بین تیغه‌ای تالاموس، ماده ها تغییرات کمتری را نسبت به نر ها نشان دادند.[۴]

همچنین نشان داده شده که موش‌های نر و ماده پاسخ‌های متفاوتی را نسبت به داروهای آنتاگونیست گیرنده های ان - متیل دی اسپارتات مانند دیزوسیلپین نشان می‌دهند به طوری‌که این دارو فاکتور رونویسی C-FOS ناشی از مرفین را در موش ماده به طور کامل مهار می‌کند در حالی‌که در موش های نر این مهار جزئی است. همچنین این پاسخ مهاری در موش‌های نر فاقد بیضه بطور قابل ملاحظه ای بیشتر است اما در موشهای ماده فاقد گناد تغییر در اثر مهاری دیده نمی‌شود.[۲۰]

با توجه به اینکه در این مطالعه فاکتور رونویسی C-FOS در پاسخ به قطع مصرف مرفین توسط نالوکسان در کل مغز موش‌های نر و ماده بررسی شده است تمایز بخش های مختلف از نظر تولید و یا مهار این فاکتور مدنظر نبوده است اما تحقیقات متعدد نشان داده است که به دنبال ترک اوپیوئیدها توسط آنتاگونیست های اپیوئیدی مانند نالوکسان یا نالترکسان، بیان C-FOS mRNA، به طور قابل ملاحظه ایی در بسیاری از مناطق مغز مانند هسته‌های سوپرا اپتیک هیپوتالاموس، هسته اکومبنس، هسته های پوتامن- دمدار و قشر مغز افزایش می‌یابد [۲،۲۱،۲۲] و این درحالی است که در حالت اعتیاد در اکثر این مناطق فقط میزان پایه از این ژن بیان می‌گردد.[۲]

نتایج حاصل از موش‌های ماده که کاملا متفاوت از موش‌های نر بوده است می‌تواند مربوط به نقش هورمون‌های جنسی باشد که برخی شواهد نیز آن را تایید می‌کند. برای مثال مشخص شده تستوسترون می‌تواند اثر آنتاگونیست‌های ان-متیل دی اسپارتات را برای مهار C-FOS ناشی از مرفین تقویت نماید

Downloaded from zjrms.ir at 8:45 +0430 on Saturday May 25th 2019

Downloaded from zjrms.ir at 8:45 +0430 on Saturday May 25th 2019

در حالی که استروئیدهای جنسی در موش‌های ماده قادر به این عمل نمی‌باشند.[۲۰] این شواهد نشان می‌دهد نقش هورمون‌های جنسی در پدیده اعتیاد و درمان دارویی آن باید در نظر گرفته شوند. نتایج تحقیق دیگری پیشنهاد کرده است القا C-FOS یکی از ویژگی های علائم قطع مصرف مرفین می‌باشد که نقش مهمی در بروز علائم ترک ایفا می‌کند.[۲۳،۲۴] با توجه به این موضوع شاید بتوان گفت عواملی که باعث کاهش بیان فاکتور C-FOS در خلال ترک می‌گردند می‌توانند به عنوان عوامل درمانی علائم ترک در نظر گرفته شوند. لذا کاهش بیان C-FOS درخلال قطع مصرف مرفین به دنبال استفاده از عصاره بابونه در موش‌های نر می تواند بابونه را به عنوان دارویی مفید در پدیده ترک مرفین (در جنس مذکر) معرفی نماید اما اثر تقویتی آن در بیان فاکتور مذکور در موش‌های ماده اثر مفید آن را زیر سوال می‌برد که این امر احتمالا می‌تواند مربوط به اختلاف جنسی و یا ترکیبات موجود در بابونه باشد. در بررسی اثر برخی ترکیبات فلاونوییدی بابونه از جمله آپی ژنین بر تومور پوستی درموش های سوری، پیشنهاد شد که این ترکیب از طریق مهار پروتئین کینازC، باعث سرکوب بیان پروتوانکوژن هایی مانند C-FOS و C-JUN می‌گردد و از این طریق از پیشرفت این تومورها جلوگیری می‌کند.[۲۵] پس یکی از مکانیسم های احتمالی اثر عصاره بابونه بر بیان C-FOS به هنگام قطع مصرف مرفین، می تواند از طریق مهار پروتئین کینازC باشد.

از آنجایی که برخی منابع برای بابونه و یا ترکیبات آن ویژگی مهارکنندگی فسفودی استراز را پیشنهاد کرده‌اند، احتمال می رود که این عصاره از این طریق عمل نموده باشد. به طوری که با جلوگیری از افزایش cAMP در خلال ترک مرفین باعث مهار فعالیت بیش از حد پروتئین کینازA و در نتیجه کاهش فسفوریلاسیون CREB گردد. با کاهش فسفوریلاسیون CREB، بیان ژن های هدف آن نیز (مانند C-FOS) کاهش می‌یابد[۱۲،۱۳] که این امر مطابق نتیجه اثر بابونه در موش های نر در این تحقیق بوده است. بهر حال مجموعه بررسی های انجام گرفته روی عصاره بابونه و ترکیبات موجود درآن نشان دادند که این گیاه دارویی اثرات خود را از طریق اثر براجزا مختلف مکانیسم‌های درون سلولی اعمال می‌کند.[۱۰-۲۵] اما از آنجا که در این تحقیق عصاره تام بابونه استفاده شده دقیقا نمی توان تعیین نمود چه بخشی از ترکیبات بابونه نقش موثرتری در فرآیندهای بیان فاکتورهای رونویسی داشته است در این رابطه پیشنهاد می‌گردد که در تحقیقات آینده اثر انواع ترکیبات بابونه بررسی شود. ضمن آن که در تحقیقات بعدی با پیشنهاد حذف غدد جنسی در موشهای ماده و نر و نیز تزریق هر هورمون به تنهایی می توان نقش هورمون‌ها و تداخل اثر آنها را در پدیده های مرتبط با فاکتورهای رونویسی و نقش بابونه در این زمینه را بررسی نمود.

در نتیجه گیری نهایی می توان گفت که بیان فاکتور رونویسی C-FOS در پدیده وابستگی و رفع وابستگی به مرفین در موشهای نر و ماده به طور وابسته به جنس در مغز تغییر نموده و بابونه نیز متناسب با جنس در تغییر این فرآیند عمل می کند، البته با شناخت دقیق تر اجزا مکانیسم های درون سلولی دخیل در روند وابستگی و قطع وابستگی به مرفین و نقش هورمونهای جنسی در این فرایندها، بهتر می توان در مورد مکانیسم عمل بابونه و محل اثر گذاری آن نظر داد. از این رو بررسی های هم‌زمان در مورد بیان فاکتورهای مختلف در مناطق مختلف مغزی که در روند اعتیاد و سندرم ترک موثرند و مطالعه اثر ترکیبات مختلف بابونه به این امر کمک خواهد کرد.

سپاسگزاری

از دانشگاه شهید چمران اهواز جهت فراهم نمودن امکانات لازم در انجام این پروژه تحقیقاتی کمال تشکر و قدردانی را می نماییم.

Downloaded from zjrms.ir at 8:45 +0430 on Saturday May 25th 2019

References

1. Blendy JA, Maldondo R. Genetic analysis of drug addiction: the role of cAMP response element binding protein. J Mol Med. 1998; 76: 104-110.
2. Georges F, Stinus L, Moine C. Mapping of c-FOS gene expression in the brain during morphine dependence and precipitated withdrawal, and phenotypic identification of the striatal neurons involved. Eur J Neurosci. 2000; 12: 4475-4486.
3. Nestler EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. Nature Rev Neurosci. 2001; 2: 119-128.
4. D 'Souza DN, Harlan RE, Garcia MM. Sexual dimorphism in the response to N-methyl-D-aspartate receptor antagonists and morphine on behavior and c-FOS induction in the rat brain. Neuroscience. 1999; 93:1539-1547.
5. Raei H, Kesmati M, Zadkarami MR. [Interaction between sex hormones and Matricaria chamomilla hydroalchoholic extract on motor activity behavior in gonadectomized male and female mice] Persian. Sci J Hamadan Univ Med Sci and Health Ser. 2006; 13(1): 48-57.
6. Kesmati M, Barfinejad N. Effect of Matricaria recutita on acute pain in presence and absence of sex hormones. J Res Med Sci. 2006; 190-197.
7. Nmecz G. Herbal pharmacy: chamomile, this widely available herb has diverse therapeutic uses, including antiphlogistic, sedative and antimicrobial effects. U.S. Pharmacist. 2000; 23:115-123.
8. Honarvaran F, Kesmati M, Esmaeili MH, et al. [Effect of chronic administration of Matricaria Chamomilla extract on morphine withdrawal syndrome in adult male mice] Persian. Daneshvar Med. 2007; 14(69):27-32.
9. Capasso A, Piacente S, Pizza C, et al. Flavonoids reduce morphine withdrawal in-vitro. J Pharm Pharmacol. 1998; 50 (5): 561-4.
10. Gomaa A, Hashem T, Mohamed M, et al. Matricaria chamomilla extract inhibits both development of morphine dependence and expression of abstinence syndrome in Rats. J Pharmacol Sci. 2003; 92: 50-55.
11. Naidu PS, Singh A, Joshi D, et al. Possible mechanisms of action in quercetin reversal of morphine tolerance and dependence. Addict Biol. 2003; 8 (3): 327-36.
12. Kuppusamy UR, Das NP. Effects of flavonoids on cyclic AMP phosphodiasterase and lipid mobilization in rat adipocytes. Biochem Pharmacol. 1992; 44(7): 1307-15.

Downloaded from zjrms.ir at 8:45 +0430 on Saturday May 25th 2019

13. Revuelta MP, Hidalgo A, Cantabrana B. Involvment of cAMP and beta-adrenoceptors in the relaxing effect elicited by flavonoids on rat uterine smooth muscle. J Auton Pharmacol. 1999; 19(6): 353-8.
14. Kuo ML, Yang NC. Reversion of v-H-ras-transformed NIH 3T3 cells by apigenin through inhibiting mitogen activated protein kinase and its downstream oncogens. Biochem Biophys Res Commun. 1995; 26: 212.
15. Kest B, Hopkins E. Morphine tolerance after chronic intracerebroventricular injection in male and female mice. Br Res. 2001; 892: 208-210.
16. Samsam shariat H.[Extraction of effective constitutes of herbal medicines and their identification and evaluation] Persian.1st ed. Esfahan: Mani press; 1982: 43-56
17. Raei H, Kesmati M, Zadkarami MR. [The effect of Gonadectomy and sex related differences in response to Matricaria Chamomilla on locomotor activity in mouse] Persian. J Mazandaran Univ Med Sci. 2007; 17(58):43-56.
18. Martinez PJ, Laorden ML, Cerezo Martinez-Pinero MG, et al. Characterization of the signal transduction pathways mediating morphine withdrawal-stimulated c-FOS expression in hypothalamic nucli. Eur J Pharmacol. 2001; 430:59-68.
19. Craft, RM, Stratman JA, Bartok RE, et al. Sex differences in development of morphine tolerance and dependence in the rat. Psychopharmacology (Berl). 1999; 143: 1-7.
20. D'Souza DN, Harlan RE, Garcia MM. Sexually dimorphic effects of morphine and MK-801: sex steroid-dependent and -independent mechanisms. J Appl Physiol. 2002; 92: 493-503.
21. Bilecki W, Przewlocki R. Effect of opioids on ca2+/cAMP responsive element binding protein. Acata Neurobiol Exp. 2000; 60:557-567.
22. Johnstone LE, Brown CH, Meeren HKM, et al. Local morphine withdrawal increases c-FOS gene, FOS protein, and oxytocin gene expression in hypothalamic magnocellular neurosecretory cells. J Neuroscience. 2000; 20(3):1272-280.
23. Hamdy MM, Mamiya T, Noda Y, et al. A selective phosphodiesterase IV inhibitor, rolipram blocks both withdrawal behavioral manifestations, and c-FOS protein expression in morphine dependent mice. Behav Br Res. 2001; 118: 85-93.
24. Itoh A, Shiotani T, Nakayama S, et al. Attenuation of the development of morphine dependence/tolerance by nefiracetam: involvement of adenosine 3,5-cyclic monophosphate system. Behav Br Res. 2000; 115: 65-74.
25. Hung YT, Kuo ML, Liu JY, et al. Inhibitions of protein kinase C and proto-oncogene expressions in NIH 3t3 cells by apigenin. Eur J Cancer. 1996; 32: 146-151.

Comparison between C-FOS Expression in Male and Female Mice During Morphine Withdrawal in the Presence and Absence of Acute Administration of Matricaria Recutita

Received: 2/Jun /2008
Accepted: 14/Mar /2009

Kesmati Mahnaz, PhD*; Galedari Hamid, PhD; Massah Azar, MSc*****

Background: *There are some evidences that indicate there are sexual differences in drug abuse and response to synthetic and herbal drugs. It has been shown that the expression of C-FOS increases in many areas of brain during morphine withdrawal. Concerning the sedative effect of Matricaria recutita extract, the aim of this study was to compare expression of C-FOS transcription factor during morphine withdrawal with and without acute administration of Matricaria recutita on male and female adult mice.*

Materials and Methods: *This study was done at Shahid Chamran University of Ahvaz in 2007 on NMRI mice. Male and female mice were assigned into 8 groups (morphine + saline; morphine + naloxone; morphine + Matricaria recutita + naloxone; and morphine + saline + naloxone). To develop morphine dependency, increasing doses of morphine (20, 40, 80 mg/kg injected subcutaneously) for 4 days. Mice received a final morphine injection (40 mg/kg) 3hours prior to naloxone (5 mg/kg) on the day of testing (day 4). Matricaria recutita extract whit a dose of 30 mg/kg was administered intraperitoneally 5 minutes before naloxone injection. In cellular study, 90minute after naloxone injection, mice were decapitated and their brains were separated, then mRNA was extracted from brain tissue. Using DIG-labeled DNA probe of C-FOS, beta-actin and dot blot technique, expression of C-FOS was analyzed by Zero Dscan software. Statistical evaluation of data was performed using student t-test and ANOVA with one factor followed by Duncan test in SPSS software. P values less than 0.05 were considered significant.*

Results: *The rate of expression of C-FOS increased in male mice but decreased significantly in female mice after naloxone-precipitated abstinence) $P<0.01$). Matricaria recutita attenuated the rate of expression of C-FOS in male mice but it showed synergistic effect on it in female mice ($P<0.05$).*

Conclusion: *It seems that the cellular processes involving morphine dependency and response to treatment with Matricaria recutita are sex dependent and are affected by sexual hormones.*

KEYWORDS: *Morphine dependency, C-fos, Matricaria recutita, Mice*

*** Associate Prof, Dept of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran**
**** Associate Prof, Dept of Genetic, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran**
*****Master of Science, Dept of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran**

Downloaded from zjrms.ir at 8:45 +0430 on Saturday May 25th 2019