DOI: 10.22100/jkh.v18i1.3076

مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی، دوره ۱۸، شماره ۱، بهار ۱۴۰۲

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

گزارش موردی

اثرات حفاظتی پنتوکسی‌فیلین بر مرگ سلولی القا شده توسط مت‌آمفتامین در سلول‌های PC12

کمیل امینی[۱]، حسین ژاله[۲*]، محمدرضا نورایی[۳]، رمضانعلی طاهری[۳]

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

۲- مرکز تحقیقات پیشگیری سوءمصرف مواد، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

۳- مرکز تحقیقاتی نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۲۹، **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۱۰/۲۶

چکیده

مقدمه: *سوء مصرف مت‌آمفتامین یک نگرانی جهانی در چند دهه اخیر بوده است. ۳/۵ میلیون نفر تحت تأثیر سوء مصرف مت‌آمفتامین قرار گرفته‌اند و این مسأله در حال افزایش است. مت‌آمفتامین موجب القای آپوپتوز در اکثر رده‌های سلولی می‌شود. به‌نظر می‌رسد پنتوکسی‌فیلین به‌عنوان یک مهارکننده فسفودی استراز، توانایی کاهش التهاب را در نتیجه توانایی کاهش مرگ سلولی ناشی از مت‌آمفتامین در سلول‌های عصبی را دارد.*

مواد و روش ها: *در این مطالعه، سلول‌های PC12 در محیط کشت DMEM رشد داده شدند. از آزمون MTT برای بقای سلول، آزمون LDH برای اندازه‌گیری سمیت سلولی، کیت سنجش رنگ‌سنجی فعالیت کاسپاز (Bio-techne) برای تشخیص فعالیت کاسپاز ۳، رودامین ۱۲۳ برای تشخیص پتانسیل غشای میتوکندری و میکروسکوپ فلورسانس برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی استفاده کردیم.*

نتایج: *پنتوکسی‌فیلین باعث افزایش بقای سلولی و جذب رودامین-۱۲۳ و کاهش سمیت سلولی و فعالیت کاسپاز-۳ در تمام غلظت‌های ۱ نانومولار تا ۱۰۰ میکرومولار شد و غلظت بهینه آن ۱۰۰ میکرومولار می‌باشد (P>۰/۰۵).*

نتیجه‌گیری: *پنتوکسی‌فیلین به‌عنوان یک مهارکننده فسفودی استراز می‌تواند با اثرات ضدالتهابی خود، مرگ سلولی ناشی از مت‌آمفتامین را به میزان قابل‌توجهی کاهش دهد.*

واژه‌های کلیدی: مت‌آمفتامین، پنتوکسی‌فیلین، آپوپتوز، مرگ سلولی.

***نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات پیشگیری سوءمصرف مواد، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران، **تلفن:** ۰۸۳۳۸۲۶۴۵۱۳، **نمابر:** ۰۸۳۳۸۲۶۴۵۱۳، **Email:** hossain_jale@yahoo.com

ارجاع: امینی کمیل، ژاله حسین، نورایی محمدرضا، طاهری رمضانعلی. اثرات حفاظتی پنتوکسی‌فیلین بر مرگ سلولی القا شده توسط مت‌آمفتامین در سلول‌های PC12. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۱؛۱۸(۱):۶۷-۶۰.

مقدمه

سوء مصرف مواد روان‌گردان یکی از مهمترین عواملی است که بر روند عصب‌زایی در مغز و هیپوکامپ تأثیر می‌گذارد (۱). عصب‌زایی در فرآیندهای یادگیری، حافظه، افسردگی، بازسازی، شکل‌گیری و انعطاف‌پذیری دخالت دارد. عصب‌زایی تحت تأثیر شرایط مختلف فیزیولوژیکی و پاتولوژیک، عوامل رشد، سایتوکین‌ها و داروها قرار می‌گیرد (۲ و ۳).

داروهای آگونیست اپیوئیدی و مت‌آمفتامین جزء پرمصرف‌ترین داروهای اعتیادآور و مخرب هستند که مسیرهای متعدد درون سلولی در سیستم عصبی از جمله تغییر در آبشارهای پیام‌رسانی درون سلولی و ترشح سیتوکین‌ها در سلول‌های عصبی و گلیال را مورد هدف قرار می‌دهند (۴ و ۵). مصرف مزمن داروهای روان‌گردان مانند مت آمفتامین در مغز معتادان موجب تغییر بیان ژن‌های متعدد از جمله ژن‌های ویژه فاکتورهای رونویسی مانند fosB، Creb و NF-KB در هسته اکومبنس می‌شود (۶ و ۷). مت‌آمفتامین آگونیست گیرنده تریس–آمین۱ (TAAR1) است که از انواع گیرنده‌های جفت شده با G پروتئین‌ها (GPCR) می‌باشد که نقش مهمی در تنظیم مونوآمین‌ها در سلول‌های مغزی ایفا می‌کند (۸). تحریک TAAR1 توسط مت‌آمفتامین، فعالیت ناقل مونوآمین‌ها در سلول‌های آستروسیت و میکروگلیال مغز را مهار می‌کند. کوکائین و مت‌آمفتامین می‌توانند رونویسی از ژن Cart به‌عنوان یک نوروپپتید مهم درگیر در رفتارهای تغذیه‌ای، استرس و پاداش را تنظیم و نقش مهمی در بقای نورون‌ها در سلول‌های مغزی ایفا کنند (۹).

مت‌آمفتامین مانند مورفین می‌توانند فعالیت گیرنده‌های دوپامین را افزایش و فعالیت گیرنده‌های N-methyl-D-aspartate (NMDA) را تغییر و ورود یون کلسیم به درون سلول‌های عصبی را افزایش دهد (۱۰). از سوی دیگر، مهار گیرنده NMDA توسط یون منیزیم در مصرف‌کنندگان مت‌آمفتامین می‌تواند به‌عنوان یک درمان اولیه برای کنترل ورود کلسیم به سلول‌های عصبی و جلوگیری از تخریب سلول‌های عصبی مؤثر باشد (۱۱).

اخیراً نشان داده شده است که سیگنال‌های مشترک زیادی میان آگونیست‌های اپیوئیدی و مت‌آمفتامین وجود دارد. این گیرنده‌ها در سیستم عصبی، سلول‌های آستروسیت و میکروگلیال را مورد هدف قرار داده و در صورت تحریک می‌توانند فعالیت و ترشح سیتوکین‌های التهابی مانند اینترلوکین ۱ بتا، فاکتور نکروز آلفا، پروستاگلاندین‌ها و بسیاری از واسطه‌های التهابی دیگر را افزایش دهند (۱۲).

پنتوکسی‌فیلین یک مشتق متیل‌گزانتن و مهارکننده غیراختصاصی فسفودی استراز است که به راحتی در آب حل شده و نیمه عمر طولانی دارد. این دارو به‌طور گسترده جهت درمان ناهنجاری‌های عروقی و ناباروری آقایان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۳ و ۱۴). پنتوکسی‌فیلین به‌عنوان تعدیل‌کننده ایمنی دارای عملکردهای ضدالتهابی است که سنتز سیتوکین‌های مختلف التهابی مانند IL-1، IL-6، IL-10، IL-R و IFN-γ IFN-γ, IL-2, TNF-α را در شرایط in vivo و in vitro مهار می‌کند (۱۵ و ۱۶).

مطالعات نشان داده است که پنتوکسی‌فیلین با فعال کردن برخی از اعضای خانواده NF-KB، به‌ویژه ReIB، P50 و C-Rel، مسیر CAMP-PKA را تحریک کرده، که نقش مهمی در تمایز و بلوغ سلول‌های دندریتیک مشتق شده از مونوسیت‌های انسانی دارند (۱۷).

با این حال، هنوز مطالعه‌ای در مورد اثرات بازدارنده و محافظتی پنتوکسی‌فیلین بر نقش تخریبی مت‌آمفتامین در سلول‌های عصبی انجام نشده است. از این‌رو با توجه به اثرات ضدالتهابی داروی پنتوکسی‌فیلین بر سلول‌های ایمنی و عصبی برآن شدیم تا در این مطالعه اثرات غلظت‌های مختلف پنتوکسی‌فیلین بر غلظت‌کشنده داروی مت‌آمفتامین در سلول‌های PC12 مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

ابتدا رده سلولی PC12 را که منشأ از تومور فئوکروموسیتوما واقع درمدولای غده فوق کلیوی موش صحرایی (قسمتی از غده فوق کلیه که ماهیت عصبی دارد) به‌دست آمده است را در محیط کشت DMEM (Gibco, UK) با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Gibco, UK) FBS)، 1% اسید آمینه غیرضروری (Sigma, USA) (NEAA، 2 میلی‌مولار ال–گلوتامین (Sigma, USA)، 100IU/ml پنی‌سیلین (سیگما) و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین (Sigma, USA) در فلاسک‌های کشت سلول T-25 سانتی‌متر مربع رشد داده شدند و هر ۲ روز یکبار تعویض شدند. هنگامی که کشت‌های سلولی به ۷۰ تا ۸۰ درصد تلاقی رسیدند، با استفاده از تریپسین– EDTA ۰.۲۵ درصد (Sigma, USA) تریپسینه و با تراکم ۱×۱۰^{۴} سلول در میلی‌لیتر در ظروف کشت سلولی ۲۴ خانه کشت داده شدند.

در این مطالعه هفت گروه تیماری شامل کنترل: محیط کشت سلولی بدون پنتوکسی‌فیلین و مت‌آمفتامین، تیمار ۱: ۱ میلی‌مولار مت‌آمفتامین بدون پنتوکسی‌فیلین، تیمار ۲: ۱ میلی‌مولار مت‌آمفتامین همراه با ۱ نانومولار پنتوکسی‌فیلین، تیمار ۳: ۱ میلی‌مولار مت‌آمفتامین همراه با ۱۰ نانومولار پنتوکسی‌فیلین، تیمار ۴: ۱ میلی‌مولار مت‌آمفتامین همراه با ۱۰۰ نانومولار پنتوکسی‌فیلین، تیمار ۴: ۱ میلی‌مولار مت‌آمفتامین همراه با ۱ میکرومولار پنتوکسی‌فیلین، تیمار ۶: ۱ میلی‌مولار مت‌آمفتامین همراه با ۱۰ میکرومولار پنتوکسی‌فیلین و تیمار ۷: ۱ میلی‌مولار مت‌آمفتامین همراه با ۱۰۰ میکرومولار پنتوکسی‌فیلین وجود دارند. سپس سلول‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO2 قرار داده شدند.

بقای سلول‌ها با استفاده از روش MTT اندازه‌گیری شد.سلول‌ها با تراکم ۱۵×۱۰۳ سلول در میلی‌لیتر در ظروف کشت سلولی ۹۶ خانه کشت داده شدند و ۲۰۰ میکرولیتر محیط DMEM (Gibco, UK) حاوی ۵ درصد FBS به هر خانه اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، محیط کشت سلول‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر از محیط‌های مختلف تیماری تعویض شد. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس مایع‌رویی از هر چاهک خارج شد و ۵۰ میکرولیتر محلول MTT (Sigma, USA) (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۳ ساعت انکوبه شد. سپس مایع‌رویی هر چاهک برداشته شد و ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکسید به آن اضافه شد تا بلورهای فورمازان در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه حل شوند. چگالی نوری با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر (Bio Tek Plate Reader, EL800, USA) در طول موج‌های ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. همه آزمایش‌ها به‌طور مستقل حداقل ۳ بار تکرار شدند. در هر آزمایش، ما هر موقعیت را ۴ بار تکرار کردیم (۱۸).

سمیت سلولی با اندازه‌گیری میزان آزادسازی آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) از سلول‌های آسیب‌دیده یا تخریب شده به داخل محیط کشت سلول‌ها اندازه‌گیری شد. سمیت سلولی با کیت تشخیص سمیت سلولی LDH(Roche, Germany) اندازه‌گیری شد. سلول‌ها در ظروف کشت سلولی ۲۴ خانه با تراکم $۱۰^{۴}$ ×۱ سلول در میلی‌لیتر به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفتند. سپس سلول‌ها با محیط‌های مختلف تیماری به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. درصد سمیت سلولی با پروتکل شرکت اندازه‌گیری شد. رنگ‌سنجی فعالیت LDH با محاسبه جذب نمونه‌ها در ۴۹۰ یا ۴۹۲ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر (Bio Tek Plate Reader, EL800, USA) اندازه‌گیری شد. طول موج مرجع باید بیش از ۶۰۰ نانومتر باشد. همه آزمایش‌ها به‌طور مستقل حداقل ۳ بار تکرار شدند. در هر آزمایش، ما هر موقعیت را ۴ بار تکرار کردیم (۱۹).

سلول‌های PC12 در محیط‌های مختلف تیماری با تراکم $۱۰^{۵}$ ×۵ سلول در میلی‌لیتر کشت داده شدند. فعالیت کاسپاز-۳ از سلول‌های تیمار شده با استفاده از کیت سنجش رنگ‌سنجی فعالیت کاسپاز (Bio-techne, USA) طبق پروتکل شرکت سازنده با استفاده از دستگاه استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر (Bio Tek Plate Reader, EL800, USA) اندازه‌گیری شد (۲۰).

پتانسیل غشای میتوکندری با استفاده از پروب فلورسانس کاتیونی نفوذپذیر سلولی رودامین ۱۲۳ اندازه‌گیری شد. سلول‌ها با تراکم $۳×۱۰^{۳}$ سلول در میلی‌لیتر کشت در محیط‌های مختلف تیماری در ظروف کشت سلولی ۲۴ خانه کشت داده شدند، سپس با PBS شسته شدند و توسط ۱ میکرومولار رودامین ۱۲۳ در تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس جذب سلول‌ها با محاسبه جذب نمونه‌ها در تحریک ۴۸۸ و نشر ۵۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر (Bio Tek Plate Reader, EL800, USA) اندازه‌گیری شد. طول موج مرجع بیش از ۶۳۰ نانومتر در نظر گرفته شد. همه آزمایش‌ها به‌طور مستقل حداقل ۳ بار تکرار شدند. در هر آزمایش، ما هر موقعیت را ۴ بار تکرار کردیم (۲۱).

به‌منظوراندازه‌گیری میزان OH یا ROS درون سلولی، سلول‌ها با تراکم $۳×۱۰^{۳}$ سلول در میلی‌لیتر کشت در محیط‌های مختلف تیماری در ظروف کشت سلولی ۲۴ خانه به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند و سپس سه بار با بافر کربس-رینگر-هپس (KRH) شسته شدند و سلول‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. فلورسانس محلول در ۴۹۰ نانومتر تهییج و در طول موج ۵۲۵ نانومتر بازنشر آن با استفاده از دستگاه تصویربرداری سلولی (Cytation 5 Cell Imaging Multi Mode reader) اندازه‌گیری شد (۲۲).

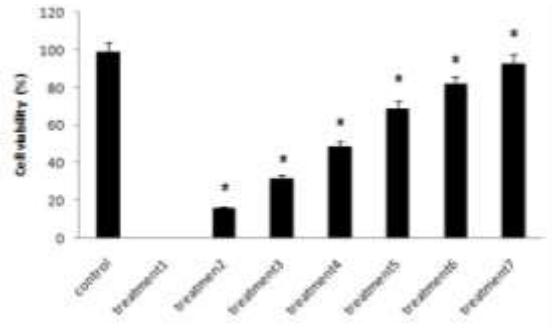
جهت بررسی و تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از مطالعه از نرم‌افزار آماری SPSS ورژن ۲۱و روش تجزیه آماری ANOVA و T-Test و برای رسم نمودارها از برنامه Excel استفاده شد و سطح معنی‌دار بودن داده‌ها نیز در سطح ۹۵٪ مشخص گردید. در این مطالعه، جهت بررسی و مطالعه آماری اختلاف‌های درون‌گروهی در هر مطالعه با استفاده از روش تجزیه آماری ANOVA و بررسی آماری اختلافات بین تیمارهای دو گروه با هم از روش تجزیه آماری T-Test استفاده گردید.

نتایج

بقا سلول‌ها ۲۴ ساعت پس از تیمار دارویی اندازه‌گیری شد. در گروه کنترل، نتایج نشان داد که درصد زنده ماندن سلول ۹۹ درصد بود. در تیمار ۱، تمام سلول‌ها مرده بودند و درصد زنده ماندن سلول ۰ درصد بود. بقای سلولی برای تیمارهای ۲ تا ۷ به‌ترتیب ۱۶٪، ۳۲٪ ۴۹٪، ۶۹٪ ۸۲٪ و ۹۳٪ بود. نتایج نشان داد که قرار گرفتن سلول‌ها در محیط‌های تیمارهای ۲ تا ۷ به‌ترتیب موجب کاهش میزان بقای سلولی در مقایسه با سلول‌های کنترل می‌شود (P>۰/۰۵). درصد بقای سلولی در تیمارهای ۲ تا ۷ نسبت‌به تیمار ۱ افزایش یافت (P<۰/۰۵). کمترین میزان بقا سلولی مربوطبه تیمار ۱ (۰٪) و بیشترین مربوطبه تیمار ۷ (۹۳٪) بود (P>۰/۰۵) (نمودار ۱).

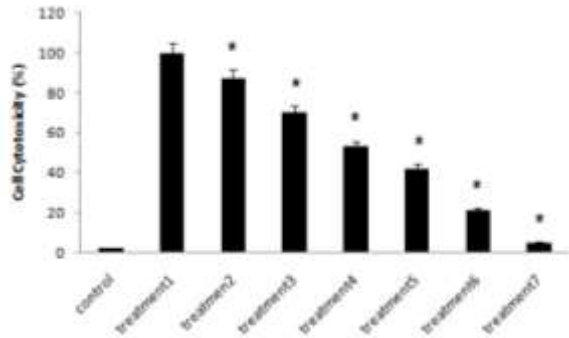
سمیت سلولی ۲۴ ساعت پس از تیمار سلول‌ها اندازه‌گیری شد. در گروه کنترل، نتایج این آزمایش نشان داد که درصد سمیت سلولی ۲ درصد بود. در تیمار ۱، تمام سلول‌ها مرده بودند و درصد سمیت سلولی ۱۰۰ درصد بود. سمیت سلولی برای تیمارهای ۲ تا ۷ به‌ترتیب ۸۷، ۷۰ درصد، ۵۳، ۴۲ درصد، ۲۱ درصد و ۵ درصد بود. نتایج نشان داد که با قرار گرفتن سلول‌ها در محیط تیمارهای ۲ تا ۷، سمیت سلولی نسبت

به سلول‌های گروه کنترل افزایش یافت (P>۰/۰۵). درصد سمیت سلولی در تیمارهای ۲ تا ۷ نسبت‌به تیمار ۱ کاهش یافت (P>۰/۰۵). کمترین سمیت سلولی مربوطبه تیمار ۷ (۵٪) و بیشترین سمیت سلولی مربوطبه تیمار ۱ (۱۰۰٪) بود (P>۰/۰۵). هیچ اختلاف معناداری میان گروه کنترل و تیمار ۷ مشاهده نشد (نمودار ۲).



نمودار ۱- تأثیر تیمارهای مختلف پنتوکسی‌فیلین بر بقای سلول‌ها

*: ستون‌ها با این نماد دارای اختلاف معنادار با تیمار ۱ و گروه کنترل هستند (P<۰/۰۵، ANOVA)

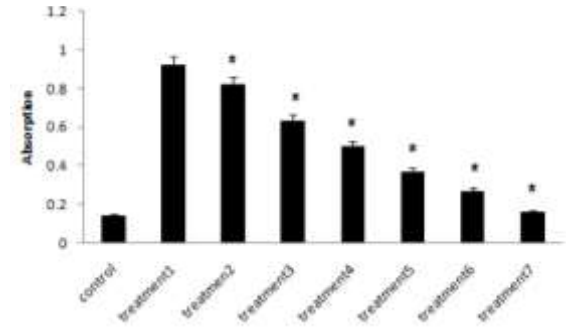


نمودار ۲- تأثیر تیمارهای مختلف پنتوکسی‌فیلین بر سمیت سلولی‌ها

*: ستون‌ها با این نماد دارای اختلاف معنادار با تیمار ۱ و گروه کنترل هستند (P<۰/۰۵، ANOVA).

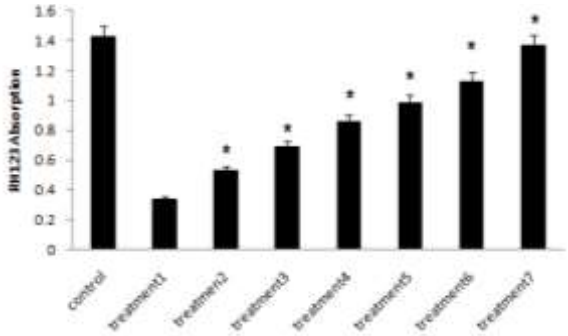
نتایج نشان داد که فعالیت کاسپاز۳، ۲۴ ساعت پس از تیمار در تیمارهای ۲-۷ نسبت‌به گروه کنترل افزایش یافت (P<۰/۰۵). فعالیت کاسپاز ۳ در سلول‌های کنترل کمتر از سایر تیمارها بود (تیمارهای ۱-۷) (P>۰/۰۵). فعالیت کاسپاز ۳ در تیمارهای ۲-۷ به‌ترتیب کمتر از تیمار ۱ بود (P>۰/۰۵) (نمودار ۳).

میزان جذب RH-123 در تمامی تیمارها پس از ۲۴ ساعت نسبت‌به گروه کنترل کاهش یافت (P>۰/۰۵). جذب رودامین-۱۲۳ در سلول‌های شاهد بیشتر از سایر تیمارها بود (تیمارهای ۱-۷) (P>۰/۰۵). جذب رودامین-۱۲۳ در تیمارهای ۷-۲ به‌ترتیب بیشتر از تیمار ۱ بود (P>۰/۰۵) (نمودار ۴).



نمودار ۳- تأثیر تیمارهای مختلف پنتوکسی‌فیلین بر فعالیت آنزیم کاسپاز-۳ در سلول‌ها

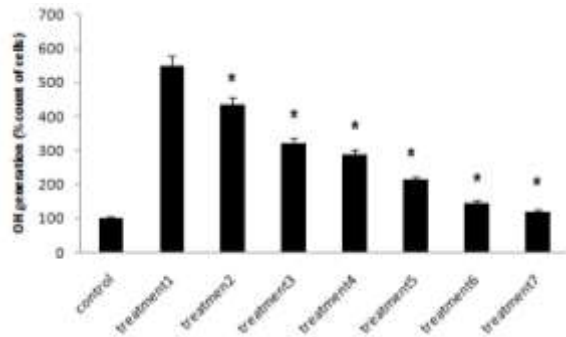
*: ستون‌ها با این نماد دارای اختلاف معنادار با تیمار ۱ و گروه کنترل هستند (P<۰/۰۵، ANOVA).



نمودار ٤- تأثیر تیمارهای مختلف پنتوکسی‌فیلین بر پتانسیل غشای میتوکندری (جذب رودامین-۱۲۳) در سلول‌ها

*: ستون‌ها با این نماد دارای اختلاف معنادار با تیمار ۱ و گروه کنترل هستند (P<۰/۰۵،ANOVA).

قرار گرفتن سلول‌های PC12 با محیط‌های مختلف تیمار تأثیر واضحی بر تولید OH (ROS) داشت. در تیمارهای ۲-۷، تولید OH در مقایسه با سلول‌های شاهد افزایش یافت (P>۰/۰۵). در تیمارهای ۲-۷، میزان OH در مقایسه با تیمار ۱ کاهش یافت (P>۰/۰۵) (نمودار ۵).



نمودار ۵- تأثیر تیمارهای مختلف پنتوکسی‌فیلین بر میزان تولید گونه‌های اکسیژن فعال درون‌زا (ROS) در سلول‌های تیمار شده

*: ستون‌ها با این نماد دارای اختلاف معنادار با تیمار ۱ و گروه کنترل هستند (P۰/۰۵، ANOVA).

بحث

بیان سیتوکاین‌های التهابی و تولید رادیکال‌های آزاد، منجر به التهاب عصبی در بیماری‌های نورودژنراتیو می‌شود. آسیب و التهاب سلول‌های میکروگلی، سلول‌های شبه ایمنی عصبی، را فعال می‌کند و این سلول‌ها به محل آسیب و التهاب مهاجرت کرده و سیتوکین‌های التهابی، پروستاگلاندین‌ها، NO و سوپراکسید را ترشح می‌کنند (۲۳). مت‌آمفتامین به‌عنوان یک محرک قوی سیستم عصبی مرکزی، با القای آزادسازی گسترده دوپامین از وزیکول‌های سیناپسی، موجب تولید گسترده ROS می‌شود (۲۴). تولید NO ناشی از مصرف مت‌آمفتامین در سیستم عصبی مرکزی موجب فعال سازی میکروگلی‌ها شده و می‌تواند موجب افزایش آسیب سلول‌های عصبی ناشی از استرس گردد. مطالعات قبلی نشان داده است که مت‌آمفتامین سلول‌های میکروگلی را فعال و بیان بسیاری از عوامل التهابی مانند IL-1b، IL-6، TNF-α، ROS و RNS را افزایش دهد (۲۵ و ۲۶).

پنتوکسی‌فیلین یا اوکس-پنتوکسی‌فیلین به‌عنوان یکی از مشتقات متیله گزانتین می‌تواند فسفودی استراز را به‌طور غیرانتخابی مهار و منجر به کاهش بیان ژن TNF-آلفا و لکوترین‌ها و افزایش cAMP داخل سلولی می‌شود که در نهایت فرآیندهای التهابی و ایمنی ذاتی را کاهش می‌دهد. فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF-α) به‌عنوان یک سیتوکین بر مسیرهای سیتوکین/کموکاین تأثیر می‌گذارد که بین سیستم عصبی مرکزی و سیستم ایمنی در تعامل است (۲۷). در یک مطالعه نشان داده شد که داروی متاپومورفین موجب تغییرات رفتاری و کاهش تعداد شدید در سلول‌های دوپامینرژیک در مغز می‌شود که داروی پنتوکسی‌فیلین می‌تواند مانع این تغییرات گردد (۲۸). در مطالعه حاضر، اثرات غلظت‌های مختلف پنتوکسی‌فیلین بر سمیت سلولی مت‌آمفتامین در سلول‌های PC12 به‌عنوان یک رده سلولی عصبی موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت و نقش محافظت عصبی پنتوکسی‌فیلین بررسی شد. در این راستا، نتایج حاصل از آزمون‌های LDH در سلول PC12 تیمار شده (در غلظت‌های مختلف) و تیمار نشده با متامفتامین ناشی از پنتوکسی‌فیلین به‌دست آمد و نتایج نقش محافظت عصبی پنتوکسی‌فیلین را تأیید کرد تأثیر گذاشت، زیرا هر چه غلظت این ماده بیشتر باشد، سمیت سلول‌ها کمتر می‌شود. نوری و همکاران نشان دادند که غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم داروی پنتوکسی‌فیلین موجب مهار اثرات تخریبی داروی اکستلزی یا MDMA در سلول‌های بیضه موش صحرایی می‌گردد که مؤید اثرات حفاظتی داروی پنتوکسی‌فیلین است (۲۹). در ادامه، میزان بقا سلول‌های PC12 القا شده با مت‌آمفتامین با دوزهای مختلف و گروه کنترل را با استفاده از آزمون MTT اندازه‌گیری کردیم. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت پنتوکسی‌فیلین، میزان بقا سلول‌ها نیز افزایش می‌یابد. موثقی و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان دادند که پنتوکسی‌فیالین موجب کاهش سلول‌های آپوپتوز شده در سلول‌های عصبی در مغز موش‌های صحرایی مصرف‌کننده داروی اکستازی یا MDMA می‌شود (۳۰). داده‌های ما در این تحقیق تأییدکننده مطالعات قبلی محققین است.

سوء مصرف مت‌آمفتامین موجب افزایش فعالیت کاسپاز-۳، در سلول‌های زایای بیضه موش صحرایی ویستار می‌شود و موجب افزایش مرگ سلولی و کاهش تکثیر سلولی می‌شود. بررسی‌های بعدی نشان داد که پیش‌درمان پنتوکسی‌فیلین در موش‌های ویستاری که در معرض مت‌آمفتامین با تزریق ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم قرار گرفتند، منجر به کاهش کاسپاز-۳ و پیشگیری مرگ سلولی آپوپتوزی می‌شود (۲۹). در این مطالعه، مت‌آمفتامین موجب تولید ROS بالا و پنتوکسی‌فیلین در غلظت‌های مختلف، با غلظت بهینه ۱۰۰ میکرومولار، موجب کاهش تولید ROS می‌شود. به‌نظر می‌رسد که ROS برای عملکردهای فیزیولوژیکی طبیعی سلولی مانند چرخه سلولی، تکثیر، تمایز، مهاجرت و مرگ سلولی ضروری است. افزایش ROS می‌تواند موجب اختلال عملکرد پروتئین‌ها، اسید نوکلئیک و اندامک‌ها شده که این مسأله می‌تواند منجر به فعال شدن آپوپتوز به‌عنوان یک فرآیند مرگ سلولی تنظیم‌شده در مسیر پاسخ التهابی گردد (۳۱ و ۳۲). در این مطالعه پنتوکسی‌فیلین تولید ROS را کاهش و نقش ضدآپوپتوز و ضدالتهابی دارد. پارک و همکاران نشان دادند که پنتوکسی فیلین در ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌های صحرایی که در معرض هیپوکسی-ایسکمی پری ناتال قرارگرفته بودند باعث افزایش cAMP و Bcl-2 و کاهش فعالیت کاسپاز-۳ و Bax می‌شود. این وقایع نشان‌دهنده خاصیت ضدآپوپتوتیک PTX در هیپوکامپ موش است (۳۳).

کاسپازها پروتئازهای اختصاصی آسپارتات وابسته‌به سیستئین هستند که در مسیرهای آپوپتوز دخالت دارند. کاسپازهای -۸، -۱۰، -۲ و -۹ آغازگرهای بالادستی و -۳، -۶ و -۷ آنزیم‌های عملکردی پایین دستی هستند (۳۴). کاسپاز-۳ یک عامل آپوپتوز ضروری برای تجزیه اسکلت سلولی، نابودی هسته و سایر تغییرات سلولی در فرآیند آپوپتوز است. شواهد نشان می‌دهد که مهار کاسپاز۳ می‌تواند به‌طور قابل توجهی آسیب‌ها را کاهش دهد (۳۵). مسیرهای سیگنال‌دهی درون سلولی که فرآیند آپوپتوز را فعال می‌کنند نیز می‌توانند منجر به التهاب شوند. به‌عنوان مثال، TNFα در سلول‌های اندوتلیال مغز، کاسپاز ۳ را فعال و با القای عوامل التهابی منجر به آپوپتوز می‌شود. نتایج ما نشان داد که مت‌آمفتامین می‌تواند فعالیت کاسپاز-۳ را در سلول‌های PC12 افزایش دهد و پنتوکسی‌فیلین می‌تواند فعالیت کاسپاز-۳ را از طریق

عملکرد ضدالتهابی کاهش دهد. رودامین ۱۲۳ یک رنگ فلورسانس است که برای نظارت بر پتانسیل غشایی میتوکندری استفاده می‌شود (۳۶). کاهش رودامین ۱۲۳ عدم تعادل پتانسیل غشا را در دو طرف غشای داخلی میتوکندری کاهش می‌دهد و مقدار ATP را که در حضور مت‌آمفتامین در سلول‌های PC12 رخ می‌دهد کاهش می‌دهد (۳۷ و ۳۸). افزایش وابسته به دوز پنتوکسی‌فیلین در رودامین ۱۲۳ نشان‌دهنده عملکرد مناسب میتوکندری است و نشان می‌دهد که اثر ضدآپوپتوز بر مرگ سلولی ناشی از مت‌آمفتامین دارد. در این مطالعه نشان دادیم که پنتوکسی‌فیلین در سلول PC12 تیمار شده با مت‌آمفتامین، فعالیت کاسپاز-۳ و تولید رادیکال هیدروکسیل (OH) را کاهش و پتانسیل غشا میتوکندری را تنظیم می‌کند. علاوه بر این، دوز بهینه برای عملکرد پنتوکسی‌فیلین ۱۰۰ میکرومولار بود. مطالعات قبلی نشان داده است پنتوکسی‌فیلین موجب کاهش فعالیت کاسپاز ۳ در ژربیل‌های ایسکمیک می‌شود (۳۹ و ۴۰).

موثقی و همکاران نشان دادند که داروی پنتوکسی‌فیلین موجب کاهش فعالیت آنزیم کاسپاز در سلول‌های عصبی در مغز موش‌های صحرایی تیمار شده با داروی اکستازی می‌شود. در این تحقیق نشان داده شد که پنتوکسی‌فیلین موجب مهار آپوپتوزیس در سلول‌های عصبی از طریق مهار مسیر کاسپازی و کاهش فعالیت اکسیدانی در سلول‌های عصبی می‌شود (۳۰). از طرفی وانگ و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان دادند که داروی پنتوکسی‌فیلین با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق تحریک مسیر داخل سلولی cAMP-CREB موجب کاهش روند پیری در موش‌های صحرایی می‌گردد (۴۱). داده‌های حاصل از نتایج مطالعه ما تأییدکننده مطالعات سایر محققان می‌باشد.

در این مطالعه، ما نشان دادیم که پنتوکسی‌فیلین به‌عنوان مهارکننده آنزیم فسفودی استراز و افزایش‌دهنده سطح cAMP در سلول‌ها، اثر محافظتی بر مرگ سلولی ناشی از مت‌آمفتامین در رده سلولی PC12 از طریق ویژگی‌های ضدالتهابی آن دارد و این نشان می‌دهد که PTX می‌تواند به‌عنوان داروی مکمل در درمان اعتیاد به مت‌آمفتامین مطرح باشد اما مطالعات بیشتری بر روی انواع رده‌های سلولی و مدل‌های حیوانی موردنیاز است.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی مصوب در دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله است که با کد اخلاق IR.BMSU.REC.1397.362 در کمیته اخلاق کشوری به تصویب رسیده است. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله برای حمایت‌های مادی و معنوی اعلام می‌دارند.

References

1. da Silva DD, Silva JP, Carmo H, Carvalho F. Neurotoxicity of psychoactive substances: A mechanistic overview. Curr Opin Toxicol 2021;28:76-83. doi: 10.1016/j.cotox.2021.10.002
2. Araki T, Ikegaya Y, Koyama R. The effects of microglia-and astrocyte-derived factors on neurogenesis in health and disease. Eur J Neurosci 2021;54:5880-901. doi: 10.1111/ejn.14969
3. Snyder JS, Drew MR. Functional neurogenesis over the years. Behav. Brain Res 2020;382:112470. doi: 10.1016/j.bbr.2020.112470
4. Cui Z, Bach P, Ti L, Hayashi K, Morgan J, Milloy M, et al. Opioid agonist therapy engagement and crystal methamphetamine use: The impact of unregulated opioid use in Vancouver, Canada. Int J Drug Policy 2022;110:103879. doi: 10.1016/j.drugpo.2022.103879
5. Wang X, Northcutt AL, Cochran TA, Zhang X, Fabisiak TJ, Haas ME, et al. Methamphetamine activates toll-like receptor 4 to induce central immune signaling within the ventral tegmental area and contributes to extracellular dopamine increase in the nucleus accumbens shell. ACS Chem Neurosci 2019;10:3622-34. doi: 10.1021/acschemneuro.9b00225
6. Sim HI, Kim DH, Kim M. Cellular messenger molecules mediating addictive drug-induced cognitive impairment: cannabinoids, ketamine, methamphetamine, and cocaine. FJPS 2022;8:1-8. doi: 10.1186/s43094-022-00408-6
7. Wang B, Chen T, Xue L, Wang J, Jia Y, Li G, et al. Methamphetamine exacerbates neuroinflammatory response to lipopolysaccharide by activating dopamine D1-like receptors. Int Immunopharmacol 2019;73:1-9. doi: 10.1016/j.intimp.2019.04.053
8. Xue Z, Siemian JN, Johnson BN, Zhang Y, Li J-X. Methamphetamine-induced impulsivity during chronic methamphetamine treatment in rats: effects of the TAAR 1 agonist RO5263397. Neuropharmacology 2018;129:36-46. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.11.012
9. Zoubková H, Tomášková A, Nohejlová K, Černá M, Šlamberová R. Prenatal exposure to methamphetamine: up-regulation of brain receptor genes. Front Neurosci 2019;13:771. doi: 10.3389/fnins.2019.00771
10. Sayin H. A schematic overview of addiction: molecular effects of cocaine, methamphetamine and morphine on limbic neurons. Forensic Sci Res 2019;4:1-11. doi: 10.1021/acschemneuro.9b00225
11. Hou H, Wang L, Fu T, Papasergi M, Yule DI, Xia H. Magnesium acts as a second messenger in the regulation of NMDA receptor-mediated CREB signaling in neurons. Mol Neurobiol 2020;57:2539-50. doi: 10.1007/s12035-020-01871-z
12. Guo L-H, Schluesener H. The innate immunity of the central nervous system in chronic pain: the role of Toll-like receptors. CMLS 2007;64:1128-36. doi: 10.1007/s00018-007-6494-3
13. Dugue R, Nath M, Dugue A, Barone FC. Roles of pro-and anti-inflammatory cytokines in traumatic brain injury and acute ischemic stroke. Mech Neuroinflamm 2017;211:4901. doi: 10.5772/intechopen.70099
14. Seo MH, Eo MY, Myoung H, Kim SM, Lee JH. The effects of pentoxifylline and tocopherol in jaw osteomyelitis. JKAOMS;46:19. doi: 10.5125/jkaoms.2020.46.1.19
15. El-Haggar SM, Eissa MA, Mostafa TM, El-Attar KS, Abdallah MS. The phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline as a novel adjunct to antidepressants in major depressive disorder patients: a proof-of-concept, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Psychother Psychosom 2018;87:331-9. doi: 10.1159/000492619
16. Kummari E, Gibbs A, Riggs C, Fellman C, Stokes J, Thomason J, et al. Effects of pentoxifylline on whole blood IL-2 and IFN-gamma gene expression in normal dogs. J Vet Med Sci 2020;6:19-24. doi: 10.1002/vms3.204
17. Zhang J, Späth SS, Marjani SL, Zhang W, Pan X. Characterization of cancer genomic heterogeneity by next-generation sequencing advances precision medicine in cancer treatment. Precis Clin Med 2018;1:29-48. doi: 10.1093/pcmedi/pby007

18. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. Int J Mol Sci 2021;22:12827.

19. Kirkik D, Hacimustafaoglu F, Altunkanat D. Cytotoxic effects of cetearеth-20 and paraffinium liquidum. Vitro 2022. doi: 10.23937/2572-4061.1510043

20. Rezaei S, Kashanian S, Bahrami Y, Zhaleh H, Cruz LJ. Enhanced intracellular delivery of curcumin by chitosan-lipoic acid as reduction-responsive nanoparticles. Curr Pharm Biotechnol 2021;22:622-35. doi: 10.2174/1389201021999200727153513

21. Zorova LD, Demchenko EA, Korshunova GA, Tashlitsky VN, Zorov SD, Andrianova NV, et al. Is the mitochondrial membrane potential (Δ Ψ) correctly assessed? Intracellular and intramitochondrial modifications of theΔ Ψ probe, Rhodamine 123. Int. J Mol Sci 2022;23:482. doi: 10.3390/ijms23010482

22. Sadler DG, Barlow J, Draijer R, Jones H, Thijssen DH, Stewart CE. (–)-Epicatechin alters reactive oxygen and nitrogen species production independent of mitochondrial respiration in human vascular endothelial cells. Oxid Med Cell Longev 2022;2022. doi: 10.1155/2022/4413191

23. Simpson DS, Oliver PL. ROS generation in microglia: understanding oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease. Antioxidants 2020;9:743. doi: 10.3390/antiox9080743

24. Zeng Y, Chen Y, Zhang S, Ren H, Xia J, Liu M, et al. Natural products in modulating methamphetamine-induced neuronal apoptosis. Front. Pharmacol 2021;12. doi: 10.3389/fphar.2021.805991

25. Kashani FL, Vaziri S, Vaziri A. Effects of Methamphetamine and narcotics on sexual high-risk behaviors. Int J High Risk Behav Addict 2022;11. doi: 10.5812/ijhrba-127007

26. Wang B, Chen T, Wang J, Jia Y, Ren H, Wu F, et al. Methamphetamine modulates the production of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha via the cAMP/PKA/CREB signaling pathway in lipopolysaccharide-activated microglia. Int Immunopharmacol 2018;56:168-78. doi: 10.1016/j.intimp.2018.01.024

27. Baratz R, Tweedie D, Wang J-Y, Rubovitch V, Luo W, Hoffer BJ, et al. Transiently lowering tumor necrosis factor-α synthesis ameliorates neuronal cell loss and cognitive impairments induced by minimal traumatic brain injury in mice. J Neuroinflammation 2015;12:1-14. doi: 10.1186/s12974-015-0237-4

28. Neves KRT, Nobre HV, Leal LKA, de Andrade GM, Brito GAdC, Viana GSdB. Pentoxifylline neuroprotective effects are possibly related to its anti-inflammatory and TNF-alpha inhibitory properties, in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. Parkinsons Dis 2015;2015. doi: 10.1155/2015/108179

29. Nouri M, Movassaghi S, Soleimani M, Sharifi ZN. Protective effect of pentoxifylline on male Wistar rat testicular germ cell apoptosis induced by 3, 4-methylenedioxymeth amphetamine. IJBMS 2016;19:646.

30. Movassaghi S, Koohpar ZK, Hashemi M, Semnani SJ, Sharifi ZN. Neuroprotective Effect of Pentoxifylline on 3, 4-Methylenedioxymethamphetamine-Induced Apoptosis in CA1 Cells of Wistar Rat Hippocampus. Galen Med 2019;8:e963. doi: 10.31661/gmj.v8i0.963

31. Kim SJ, Kim HS, Seo YR. Understanding of ROS-inducing strategy in anticancer therapy. Oxid Med Cell Longev 2019; doi: 10.1155/2019/5381692

32. Su L-J, Zhang J-H, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, et al. Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. Oxid. Med. Cell. Longev.2019;2019. doi: 10.1155/2019/5080843

33. Park JH, Kim SE, Jin JJ, Choi HS, Kim CJ, Ko IG. Pentoxifylline alleviates perinatal hypoxic-ischemia-induced short-term memory impairment by suppressing apoptosis in the hippocampus of rat pups. Int Neurourol J 2016;20:107. doi: 10.5213/inj.1632532.266

34. Green DR. Inflammasomes and other caspase-activation platforms. Cold Spring Harb. Perspect. Biol.2022;14:a041061. doi: 10.1101/cshperspect.a04

35. Mirkamali M, Momeni HR, Etemadi T, Mosayebi G, Komijani M. Involvement of caspase-3 in apoptosis of human lymphocytes exposed to cadmium chloride. Hum Exp Toxicol 2022;41:09603271221121796. doi: 10.1177/09603271221121796

36. Baracca A, Sgarbi G, Solaini G, Lenaz G. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F0 during ATP synthesis. Biochim Biophys Acta Bioenerg 2003;1606:137-46. doi: 10.1016/S0005-2728(03)00110-5

37. Esteras N, Adjobo-Hermans MJ, Abramov AY, Koopman WJ. Visualization of mitochondrial membrane potential in mammalian cells. Methods Cell Biol 2020;155:221-45. doi: 10.1016/bs.mcb.2019.10.003

38. Rashedinia M, Saberzadeh J, Khodaei F, Mashayekhi Sardoei N, Alimohammadi M, Arabsolghar R. Effect of sodium benzoate on apoptosis and mitochondrial membrane potential after aluminum toxicity in PC-12 cell line. Iran J Toxicol 2020;14:237-44. doi: 10.32598/IJT.10.4.677.1

39. Kim M, Shin MS, Lee JM, Cho HS, Kim CJ, Kim YJ, et al. Inhibitory effects of isoquinoline alkaloid berberine on ischemia-induced apoptosis via activation of phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway. Int Neurourol J 2014;18:115. doi: 10.5213/inj.2014.18.3.115

40. Seo T-B, Kim T-W, Shin M-S, Ji E-S, Cho H-S, Lee J-M, et al. Aerobic exercise alleviates ischemia-induced memory impairment by enhancing cell proliferation and suppressing neuronal apoptosis in hippocampus. Int Neurourol J 2014;18:187. doi: 10.5213/inj.2014.18.4.187

41. Wang Y, Zhang T, Zhao H, Qi C, Ji X, Yan H, et al. Pentoxifylline enhances antioxidative capability and promotes mitochondrial biogenesis in d-galactose-induced aging mice by increasing Nrf2 and PGC-1α through the cAMP-CREB pathway. Oxid Med Cell Longev 2021;2021. doi: 10.1155/2021/6695613

Journal of Knowledge & Health
in Basic Medical Sciences 2023; Vol 17, No 4

DOI: 10.22100/jkh.v18i1.3076

Case Report

Protective Effects of Pentoxifylline on Methamphetamine Induced Cell Death in PC12 Cells

Komail Amini (M.Sc.)[1], Hossein Zhaleh (Ph.D.)[2*], Mohammad Reza Neurani (Ph.D.)[3], Ramezan Ali Taheri (Ph.D.)[3]

1- Dept. of Biotechnology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
2- Substance Abuse Prevension Research Center, Kermanshah University Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
3- Nano Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 20 September 2022**, Accepted:** 16 January 2023

Abstract:

Introduction: *Methamphetamine abuse has been a global concern in the last few decades. An estimated 3.5 million people have been affected by methamphetamine abuse. Methamphetamine induces apoptosis in most cell lines. Pentoxyphilline, as a phosphodiesterase inhibitor, can reduce methamphetamine-induced cell death by inflammation reduction.*
Methods: *PC12 cells were grown in a DMEM culture medium. Assays used in this study are listed below: MTT test for cell viability detection, LDH test for cytotoxicity measurement, caspase activity colorimetric assay kit (Bio-techne) for caspase-3 activity diagnosis, Rhodamine 123 for detection of mitochondrial membrane potential, fluorescence microscope for measurement of antioxidant enzyme activities.*
Results: *Pentoxyphilline increased cell viability and the Rhodamine-123 absorbance. Besides, it reduced cell cytotoxicity, caspase-3 activity, and (OH) generation in all concentrations of 1 nM to 100 µM ($P<0.05$) by an optimal concentration of 100 µM.*
Conclusion: *In conclusion, Pentoxyphilline, as a phosphodiesterase inhibitor, can significantly reduce methamphetamine-induced cell death through its anti-inflammatory effects.*

Keywords: Methamphetamine, Pentoxyphilline, Apoptosis, Cell death.

Conflict of Interest: No
***Corresponding author**: H. Zhaleh, **Email:** hossain_jale@yahoo.com*

Citation: Amini K, Zhaleh H, Neurani MR, Taheri RA. Protective effects of pentoxifylline on methamphetamine induced cell death in PC12 cells. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2023;18(1):60-67.