

Analysis of long-term treatment of Mu opioid receptors agonists effect on *Dnm1L* and *Rab22a* expression in HEK293 Flp-In MOP YFP

Sheyda Ilkhanizadeh¹, Roohollah Nakhaei Sistani², Majid Sadeghizadeh³,
Ghasem Ahangari^{4*}

- 1- Ph.D. Candidate, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Assistant Professor, Department of Genetics, Kashan University, Kashan, Iran
- 3- Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 4- Professor, Department of Medical Genetics, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

*Corresponding Address: Postal Code: 1437716316, Department of Medical Genetics, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
Email: ghah@nigeb.ac.ir

Received: 01/Aug/2017, Accepted: 04/Oct/2017

Abstract

Objective: Morphine and its derivatives are well-known for their strong analgesic effects in medicine. However, their medical long-term administration is severely restricted because of tolerance and dependence. Morphine fails to induce endocytosis of Mu opioid receptors whereas other enkephalin analogues such as DAMGO induce rapid endocytosis of these receptors. Repeated use of opioid drugs alters gene expressions. In current study, we analyze the effects of long-term opioid treatment on *Dnm1L* and *Rab22a* genes.

Methods: HEK293 cell lines that expressed MOP receptors were treated separately with morphine, methadone, and DAMGO. mRNAs were extracted from the cell suspension and we amplified the cDNA. Next, we analyzed *Dnm1L* and *Rab22a* gene expressions compared to control samples by qRT-PCR. Results were statistically validated by Graph Pad software.

Results: Amplification graphs from qRT-PCR showed that *Dnm1L* gene expression was induced by 2.37-fold, whereas *Rab22a* gene expression decreased by 0.39-fold in response to long-term treatment of cells with morphine compared to control samples. *Dnm1L* gene expression was not significantly affected by treatment with methadone and DAMGO. *Rab22a* gene expression decreased by 0.41-fold with methadone treatment and by 0.45-fold in response to DAMGO treatment.

Conclusion: The *Dnm1L* gene could be involved in cellular pathways of morphine-induced tolerance which would indicate the difference between morphine and other similar Mu opioid receptor agonists.

Keywords: Morphine, *Dnm1L*, *Rab22a*, Tolerance, Dependence

بررسی اثر تیمار طولانی مدت آگونیست‌های گیرنده افیونی مو (Mu) بر بیان ژن‌های *Rab22a* و *Dnm1L*

شیدا ایلخانی زاده^۱، روح الله نخعی^۲، مجید صادقی زاده^۳، قاسم آهنگری^{۴*}

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه ژنتیک، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

۳- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- استاد، گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۳۷۷۱۶۳۱۶، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده بیوتکنولوژی پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی
Email: ghah@nigeb.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۶/۰۷/۱۲

دریافت مقاله: ۹۶/۰۵/۱۰

چکیده

هدف: مرفین و مشتقات آن به دلیل ویژگی‌های قوی ضد دردشان در مصارف پزشکی بسیار شناخته شده هستند. اما استفاده پزشکی از آن‌ها به دلیل ایجاد مقاومت و وابستگی پس از استفاده طولانی به شدت محدود است. گیرنده‌های افیونی مو در سلول‌ها بر اثر مرفین دچار اندوسیتوز نمی‌شوند اما مشابه‌های انکفالین مانند DAMGO باعث اندوسیتوز سریع گیرنده‌ها می‌شوند. استفاده مکرر از داروهای مخدر باعث تغییر بیان ژن‌ها می‌شود. مطالعه کنونی به بررسی اثر تیمار طولانی مدت افیون‌ها بر میزان بیان ژن‌های *Rab22a* و *Dnm1L* پرداخته است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های HEK293 که گیرنده افیونی Mu را بیان می‌نمایند، با مرفین، DAMGO و متادون به‌طور جداگانه و طولانی مدت تیمار شد. mRNA از عصاره سلولی استخراج شد و پس از ساخت cDNA، میزان بیان ژن‌های *Rab22a* و *Dnm1L* نسبت به نمونه کنترل به روش Q-RT-PCR مقایسه شد. نتایج با نرم‌افزار Graph Pad تجزیه و تحلیل آماری شد.

نتایج: بررسی منحنی‌های به‌دست آمده از Q-RT-PCR نشان داد در اثر تیمار طولانی مدت با مرفین در مقایسه با نمونه کنترل بیان ژن *Dnm1L* ۲/۳۷ برابر افزایش یافته و بیان ژن *Rab22a* ۰/۳۹ برابر کاهش یافته است. در حالی که میزان بیان *Dnm1L* در اثر تیمار با متادون و DAMGO تغییر معنی‌داری نشان نداده است، بیان ژن *Rab22a* به‌ترتیب ۰/۴۱ و ۰/۴۵ درصد کاهش نشان داده است.

نتیجه‌گیری: ژن *Dnm1L* می‌تواند در مسیرهای مقاومت سلولی ایجاد شده در اثر مرفین که باعث تفاوت آن نسبت به سایر آگونیست‌ها می‌شود دخالت داشته باشد.

کلیدواژگان: مرفین، *Rab22a*، *Dnm1L*، مقاومت، وابستگی

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۲۰، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۶، صفحات: ۲۱-۳۵

مقدمه

شبه افیون‌ها موادی هستند که با تأثیر روی گیرنده‌های افیونی (Opioid receptors) تأثیرات شبه مرفینی اعمال می‌کنند و

تهدید سلامتی اش ادامه می‌دهد [۵].

شبه افیون‌ها و نوروپتیدهای درون‌زاد انکفالین (Enkephalin) فعالیت فیزیولوژیکی خود را از طریق برهمکنش با زیر گونه‌های مختلف گیرنده‌های مربوط به خود شامل گیرنده Mu، دلتا (delta)، کاپا (kappa) و نوسیسپتین (Nociception) که عضو ابر خانواده گیرنده‌های وابسته به G پروتئین هستند انجام می‌دهند. گیرنده‌های وابسته به G پروتئین یا GPCRs (G-protein-coupled receptors) پروتئین‌هایی است که عرض دولایه لیپیدی غشای پلاسمایی را با هفت دومن تراغشایی که از نظر تعداد آمینواسیدهای آب‌دوست (Hydrophobic amino acids) غنی است طی می‌کند. عملکرد اصلی GPCRها انتقال اطلاعات از سمت برون سلولی غشا به درون سلول با استفاده از جفت شدن با G پروتئین‌های هتروترایمریک (Heterotrimeric) است. G پروتئین‌های هتروترایمریک خانواده دیگری از پروتئین‌های غشای سلولی است. برهمکنش بین گیرنده و G پروتئین به وسیله ترکیبات شیمیایی به نام آگونیست‌ها که باعث ایجاد تغییرات فضایی خاص در گیرنده می‌شود القا می‌شود. پس از جفت شدن با یک GPCR زیر واحد $G\alpha$ از G پروتئین یک GDP را با GTP عوض می‌کند و احتمالاً از کمپلکس $G\beta\gamma$ جدا می‌شود و هر کدام از این دو بخش باعث ایجاد آشارهای پیام‌رسانی درون سلولی مختلفی می‌شود که از طریق فعال‌سازی مولکول‌های تاثیرگذار متنوعی شامل ادنیلیل سیکلاز (Adenylyl cyclase)، فسفولیپازها و گیرنده‌های کانال‌های یونی دریچه‌دار انجام می‌شود [۶].

با ایجاد حیوانات آزمایشگاهی با ویژگی‌های فنوتیپی طراحی شده که در بیان گیرنده Mu نارسایی دارند مشخص شده که مرفین خواص ضد درد و مخدر خود را از طریق این گیرنده اعمال می‌کند [۶]. با اینکه مرفین به‌عنوان یکی از قوی‌ترین داروهای ضد درد به خصوص برای درمان دردهای مزمن و حاد شناخته می‌شود، استفاده پزشکی از آن به دلیل ایجاد مقاومت (Tolerance) و وابستگی (Dependence) پس از استفاده طولانی به شدت محدود است [۷]. مقاومت به‌عنوان

شامل افیون‌ها که اصطلاح قدیمی برای داروهای مشتق از تریاک مانند مرفین هستند می‌شوند. شبه افیون‌های دیگر شامل صنایعی (Synthetic) و نیمه صنایعی هستند مانند فنتالین (Phentalene)، اکسی کدون (Oxycodone) و شبه افیون‌های درون‌زاد مانند اندورفین‌ها. داروهای شبه افیون مربوط به سیستم عصبی مرکزی هستند و معمولاً برای تسکین درد استفاده می‌شوند. واژه افیون و مسکن گاهی به‌عنوان مترادف برای شبه افیون‌ها به کار می‌روند [۱].

شبه افیون‌ها برای تسکین دردهای خفیف تا شدید مورد استفاده دارند هرچند استفاده از آن‌ها ترجیحاً برای دردهای نسبتاً شدید تا شدید محدود می‌شود [۲]. شبه افیون‌ها برای درمان دردهای حاد مانند دردهای پس از جراحی به دلیل سرعت عمل، تأثیرگذاری بالا و خطر پایین وابستگی استفاده می‌شوند. همچنین برای دردهای مزمن بسیار شدید که منجر به ناتوانی بیمار می‌شود مانند درد ناشی از سرطان و شرایط تحلیل برنده مانند رماتیسم نیز از این داروها استفاده می‌شود [۳].

مقاومت به دارو پدیده‌ای است که با سازگاری‌های نورونی که باعث کاهش اثر دارو می‌شود شناخته می‌شود. در حالی که کاهش گیرنده‌های شبه افیونی نقش مهمی در این امر دارد مکانیسم‌های دیگری هم شناخته شده‌اند [۴]. وابستگی فیزیکی یک سازگاری فیزیولوژیکی است که بدن را در مقابل دارویی که به‌طور متداوم حضور دارد سازگار می‌کند. وابستگی با ایجاد نشانه‌های خماری در صورت قطع مصرف دارو معنی می‌شود. وابستگی فیزیکی یک پدیده طبیعی قابل پیش‌بینی درباره مصرف بعضی از داروهاست و الزاماً به معنای معتاد بودن بیمار نیست. نشانگان خماری برای شبه افیون‌ها می‌تواند شامل کسل بودن، تمایل به مقادیر دیگر شبه افیون، نامتعادل بودن، تعریق، تهوع، آبریزش بینی، لرزش، استفراغ و درد عضله است. اعتیاد به دارو یک فرآیند پیچیده ناشی از رفتارهای معمول وابسته به سو مصرف یک داروی خاص است که در طول زمان و با مقادیر بالاتر دارو ایجاد می‌شود. اعتیاد شامل اجبار روانی است در حدی که بیمار به رفتار خود حتی در صورت ایجاد خطر و

کاهش اثر یک دارو که در نتیجه آن مقادیر بالاتری برای ایجاد اثر اولیه لازم است معنی می‌شود. این افزایش مقدار دارو که برای ایجاد اثر انجام می‌شود می‌تواند باعث پیدایش آثار جانبی ناخواسته شود که در مورد مرفین می‌تواند بی‌بوست یا تنزل تنفسی باشد. وابستگی مربوط است به تغییرات نورونی در سطح سلولی و سازماندهی سیناپسی که نشانه‌های فیزیولوژیکی به دنبال بازگیری دارو ایجاد می‌کند. این حقیقت که تمام داروهای افیونی میزان یکسانی از وابستگی و مقاومت در حیوانات آزمایشگاهی در صورت مصرف مزمن (Chronic)، در مقادیری که از نظر ضد درد بودن همسان هستند، ایجاد نمی‌کنند این نتیجه‌گیری را ایجاد می‌کند که پس از اتصال این آگونیست‌ها به گیرنده Mu تأثیرات متفاوتی در سطح سلولی و مولکولی ایجاد می‌شود که هر کدام با دیگری متفاوت است [۸، ۹].

مرفین در مقایسه با بسیاری از آگونیست‌های مشابه که به گیرنده افیونی Mu متصل می‌شوند به دلیل توان ایجاد بسیار بالاتر مقاومت و وابستگی متفاوت است. اساس سلولی و مولکولی این ویژگی باعث ایجاد انبوهی از تئوری‌ها و دیدگاه‌ها شده است [۱۰].

کلون‌سازی cDNA گیرنده Mu و سایر گیرنده‌های افیونی در اوایل دهه ۱۹۹۰ این امکان را ایجاد کرد که گیرنده‌ها را به طور دائمی یا قابل القا در سیستم‌های برونزاد شامل رده‌های سلولی پستانداران بیان نماییم [۱۱]. چنین مدل‌های سلولی آزمایشگاهی به شدت برای تشخیص خصوصیات فارماکولوژیکی مانند اختصاصیت دارو، کارایی و قدرت برای هر نوع گیرنده که به تنهایی بیان می‌شود استفاده دارند. به علاوه با چنین مدل‌هایی امکان ایجاد گیرنده‌هایی که از نظر ژنتیکی تغییر داده شده‌اند مثلاً دارای یک توالی کوتاه اپیتوپ که توسط آنتی‌بادی خاصی شناخته می‌شود فراهم شده است. با استفاده از چنین مدلی اولین بار نشان داده شد که گیرنده افیونی Mu در سلول‌های HEK293 بر اثر مرفین دچار اندوسیتوز نمی‌شوند اما با آنالوگ‌های انکفالین مانند DAMGO (D-Ala², N-)] (MePhe⁴, Gly-ol]-enkephalin)، باعث اندوسیتوز سریع

گیرنده‌ها می‌شوند [۱۲]. همچنین نشان داده شد که آلکالوئید اتورفین (Etorphine) و پپتیدهای انکفالین باعث اندوسیتوز سریع گیرنده‌های Mu و دلتای موشی در رده سلولی HEK293 شده در حالی که مرفین چنین تأثیری حتی در غلظت‌های بسیار بالا که به شدت آدنیلیل سیکلاز را مهار می‌کند ندارد. این‌ها اولین گزارش‌هایی بودند که نشان دادند گیرنده‌های افیونی Mu مانند بتا آدرنوسپتور (beta Adrenoceptor) دچار درون‌بری می‌شود. با این حال اشغال و فعال شدن گیرنده با برخی آگونیست‌ها مانند مرفین برای ایجاد اندوسیتوز کافی نیست. این ویژگی مرفین به ظاهر با ویژگی‌های شیمیایی سایر آلکالوئیدهای همان گروه افیونی مانند اتورفین و متادون (Methadone) که باعث اندوسیتوز گیرنده می‌شوند مغایرت دارد [۱۳]. درون‌بری وابسته به آگونیست گیرنده افیونی Mu تنها به سیستم‌های برونزاد محدود نمی‌شود بلکه تحقیقات نشان داده‌است که در نورون‌های موتور میتریک (Myenteric) خوکی و همچنین در سلول‌های HEK293 در گیرنده‌های درون‌زاد هم مشاهده شده است [۱۴].

استفاده مکرر از داروهای مخدر باعث تغییر بیان ژن‌ها در نواحی مختلف مغز می‌شود که تغییری در راستای تغییرات متنوعی است که به رفتارهای اعتیادی ارتباط دارد [۱۵]. شواهد متنوعی وجود دارد که عوامل رونویسی مختلفی در مقاومت به مرفین، حساسیت زدایی و آشفتگی ذهنی و جسمی ناشی از ترک (Withdrawal) مرفین فعال می‌شود. با اینکه تیمار با مرفین تغییر چندانی در میزان بیان گیرنده‌های MOP (Mu Opiate) ایجاد نمی‌کند تنظیمات رونویسی پروتئین‌های دخیل در ترافیک گیرنده‌های افیونی مانند GRK2 (-G protein coupled receptor kinase 2) یا بتا ارسستین II (Arrestin 2) و همچنین بیان گیرنده‌های دیگر مانند دوپامین (Dopamine) و گیرنده‌های NMDA، گیرنده‌های GABA (Gamma-Aminobutyric Acid) و آلفا آدرنوسپتورها (Alpha-adrenoreceptors) تغییر می‌کند. بررسی نمایه بیان ژنی که اخیراً انجام شده است باعث شناسایی دسته‌های

انتقالات سلولی به‌ویژه میتوکندری و پراکسی زوم نقش دارد. این پروتئین باعث ادغام شدن غشا طی عمل الیگومریزاسیون (Oligomerization) به‌صورت یک ساختار حلقه مانند می‌شود که دور قسمتی از غشا که قرار است جدا شود قرار می‌گیرد. این پروتئین برای رشد و تکامل عصبی ضروری است. ژن آن روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۲ قرار دارد و طول ژن آن ۷۳۵۶۷ نوکلئوتید است (NC-000012.11). این پروتئین ۷۳۶ اسید آمینه و ۸۱۸۷۷ دالتون وزن دارد و به‌صورت هموترامر سازمان می‌یابد. این پروتئین نیز در نورون‌های اکثر نواحی مغز بیان می‌شود. این ژن ۱۹ ایترون داشته و توالی mRNA آن در NM005690.3 قابل دسترسی است [۲۱].

مواد و روش‌ها

کشت سلول

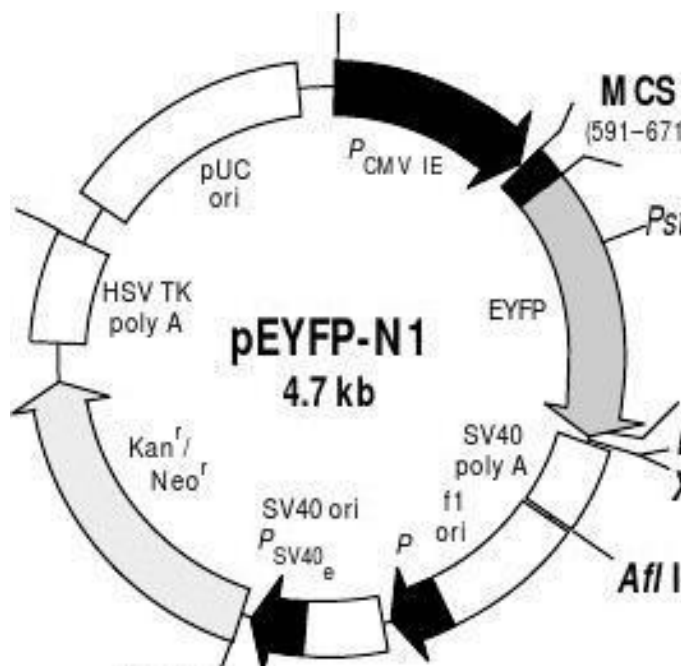
در این تحقیق از رده سلولی HEK293 استفاده شد که از Sigma-Aldrich (آمریکا) خریداری شده استفاده شد. این رده سلولی به دلیل دارا بودن خصوصیات سلول‌های نورونی نابالغ به‌طور گسترده‌ای برای تحقیقات عصب شناختی استفاده می‌شود و فاقد بیان درونزاد گیرنده‌های افیونی است که آن را برای بیان برون‌زاد این گیرنده به‌طور دلخواه و قابل تنظیم مناسب می‌نماید.

رده سلولی HEK293 Flp-In MOP YFP پس از تکثیر گیرنده افیونی Mu (MOP) انسانی با استفاده از آغازگرهای (Primers) حاوی جایگاه اندونوکلاز SacI در انتهای ۵' و جایگاه اندونوکلاز ApaI در انتهای 3' و حذف کدون خاتمه ایجاد شد. محصول PCR سپس وارد ناقل peYFP-N1 شد (شکل ۱) که حاصل کار ایجاد یک قالب روخوانی از گیرنده MOP با eYFP در انتهای کربوکسیل است [۲۲].

جدیدی از ژن‌های تحت تأثیر مرفین شده است. با اینکه ثابت شده که استفاده محدود از مرفین (یک بار) بیشتر روی ژن‌های عملکرد متابولیکی تأثیر دارد و دوزهای بالا رونده مرفین بیشتر روی ژن‌هایی که الگوی اتصالات سیناپسی را تغییر می‌دهد، مانند arc یا ania-3 تأثیر دارد [۱۶]. بیان این ژن‌ها همچنان پس از آشفته‌گی ذهنی و جسمی ناشی از ترک هم در سطح بالایی باقی می‌ماند که باعث آغاز بیان فعال‌کننده‌های رونویسی و گیرنده‌ها می‌شود. همچنین ثابت شده که مرفین یک کاهنده قوی بیان ژن شوک حرارتی ۷۰، یک پروتئین محافظت سلولی است که احتمالاً تا حدی مسمومیت نورونی (Neurotoxicity) حاصل از افیون‌ها را تنظیم می‌کند [۱۵]. نمایه‌های بیانی وابسته به زمان (Temporal) نشان‌دهنده تغییراتی در بیان خوشه‌های ژنی مانند عوامل رونویسی، گیرنده‌های وابسته به G پروتئین‌ها و نوروپپتیدها است [۱۶].

ژن‌های Rab22a و Dnm1L از ژن‌های شناخته شده در مسیرهای اندوسیتوز و ترافیک سلولی هستند [۱۷، ۱۸]. پروتئین کدشونده توسط ژن Rab22a عضو خانواده بزرگ RAB از GTPase‌های کوچک است. ثابت شده در حالت متصل به GTP این پروتئین به اندوزوم اولیه متصل می‌شود و احتمالاً در ترافیک و بر همکنش ساختمان‌های اندوزومی نقش دارد. این ژن روی بازوی بلند کروموزوم ۲۰ قرار دارد و طول توالی ژن آن ۸۱۲۵۷ جفت باز است و روی رشته مثبت قرار دارد (NC_000020.120) [۱۹]. پروتئین این ژن در نواحی مختلفی از سیستم عصبی در نورون‌ها بیان می‌شود و ۱۹۴ آمینو اسید دارد. از این ژن ۲ رونوشت به‌وجود می‌آید که تنها یکی بیان می‌شود. این ژن ۶ ایترون داشته و طول mRNA آن ۸۷۰۲ نوکلئوتید است [۲۰].

پروتئین کدشونده توسط DNM1L عضو ابرخانواده داینامین (Dynamin) از G پروتئین‌ها است و در نقل و



شکل ۱ تصویر ناقل pEYFP-N1

اضافه شد. فلاسک حاوی سلول به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و غلظت CO_2 ۵ درصد منتقل شد. ۲۴ ساعت بعد پس از اتصال سلول‌ها به سطح فلاسک، محیط کشت برای حذف DMSO تعویض شد. تمام مراحل کار زیر هود لامینار (Laminar hood)، توسط وسایل آزمایشگاهی کاملاً استریل و در اتاق استریل مخصوص کشت بافت و سلول انجام شد.

تیمار طولانی مدت سلول‌ها

تمام داروهای مورد استفاده مطابق با مولاریته مطلوب وزن‌کشی شده در آب مقطر اتوکلاو شده، حل و به تیوب‌های کوچک در مقادیر کم مطابق با نیاز به هر دارو منتقل شد. استوک داروها که حداقل در غلظت ۱۰۰ برابر بیشتر غلظت‌های مورد نیاز بود در دمای ۲۰-درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. هیچ دارویی پس از یک بار یخ‌زدایی مجدداً ذخیره استفاده نشد.

سلول‌های کشت داده شده در پلیت ۶ خانه پس از پوشاندن ۵۰-۷۰ درصد در صد سطح، تیمار شد. به این ترتیب

سلول‌ها از ذخیره ۱۳۵-درجه سلسیوس به‌طور مستقیم به محیط کشت منتقل شدند و پس از ۲۴ ساعت محیط کشت برای حذف DMSO (Dimethyl sulfoxide) تعویض شد. محیط کشت سلول‌ها شامل مواد زیر است:

۱x DMEM (Dulbecos Modified Eagles Medium) + GlutaMAX-I (Gibco، آمریکا)، جنیتسین G-418 سولفات (Geniticine G-418 Sulphate) ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر قدرت ۷۳۲ میکروگرم/میلی‌گرم (Gibco by life technologies، آمریکا)، پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Penicillin/streptomycin) ۱۰ میلی‌لیتر/لیتر (CLINOR، اسپانیا) و FBS دیالیز شده (Dialysed Fetal Bovine Serum) ۱۰ درصد (Gibco، آمریکا)

۱ میلی‌لیتر از ذخیره منجمد که در دمای ۱۳۵-درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بود و از ابتدا دارای حداقل 2×10^6 سلول در هر میلی‌لیتر بود به‌دلیل حساس بودن سلول‌ها به سانتریفوژ به‌طور مستقیم به ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک و سرم در فلاسک فیلتردار ۷۵ سانتی‌متر مربع

اثر آگونیست‌های گیرنده افیونی مو (Mu) بر بیان Rab22a و Dnm1L

از RNA هر دو نمونه یعنی ۱ میکروگرم در ۲۰ میکرولیتر از هر کدام در آب DEPC (Diethyl pyrocarbonate) رقیق شد به طوری که مقدار نهایی ۱ میکروگرم به دست بیاید. برای انجام RT-PCR از iScript™ cDNA Synthesis Kit استفاده شد. در این کیت از RNase H⁺ و مخلوط OligodT و هگزامر تصادفی (Random hexamer) برای تولید cDNA استفاده می‌شود. به هر نمونه ۴ میکرولیتر از مخلوط واکنش iScript 5x (iScript reaction mix)، ۱ میکرولیتر ترانسکریپتاز معکوس iScript (iScript reverse transcriptase) و ۱ میکروگرم RNA اضافه شد و حجم واکنش با آب بدون نوکلئاز به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. شرایط واکنش RT-PCR به صورت زیر است:

۵ دقیقه ۲۵ درجه سلسیوس، ۳۰ دقیقه ۴۲ درجه سلسیوس، ۵ دقیقه ۸۵ درجه سلسیوس، پایان ۴ درجه سلسیوس.

طراحی آغازگرها و Q-RT-PCR

توالی آغازگرهای ژن‌های *Rab22a* و *Dnm1L* و همچنین ژن خانه‌دار مورد استفاده، *GapdH1* به گونه‌ای انتخاب شد که تمام واریانت‌های شناخته شده را پوشش دهد. توالی آغازگرهای جلویی (Forward) و برگشتی (Reverse) مطابق جدول ۱ در نظر گرفته شد:

جدول ۱ توالی آغازگرهای مورد استفاده در Q-RT-PCR

آغازگر	توالی	دمای ذوب (درجه سلسیوس)
<i>GapdH1</i> جلویی	ACAGTTGCCATGTAGACC	۵۵/۷
<i>GapdH1</i> برگشتی	TTTTTGGTTGAGCACAGG	۵۹/۹
<i>Dnm1L</i> جلویی	GACTTTTGGGCGAACCTTAGAATCTG	۶۱/۲
<i>Dnm1L</i> برگشتی	CAGGACGAGGACCACTAGCATTTTC	۵۹/۹
<i>Rab22a</i> جلویی	CGATGT AAGAGAAGTCATGGAGAGAG	۵۶/۵
<i>Rab22a</i> برگشتی	AGGTTGGCGTCAGTGGATGG	۵۹/۲

که محیط کشت سلول‌ها به وسیله مکش از فلاسک حذف شد و محیط کشت کامل و تازه اضافه شد. سپس آگونیست‌های مرفین، متادون و DAMGO با غلظت‌های نهایی ۱۰^{-۵} به طور مستقیم به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد. پیشاپیش قدرت و کارایی بهینه این آگونیست‌های مورد استفاده در غلظت‌های مورد نظر در رده سلولی یکسان و توسط گروه تحقیقاتی که این آزمایش در آنجا انجام شده توسط لویز (Lopez) و همکاران اندازه گیری شده است [۲۲]. برای مخلوط شدن دارو با محیط کشت، فلاسک چندین بار از بالا به پایین و چپ به راست حرکت داده شد. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط حاوی دارو کشت شدند.

استخراج RNA و ساخت cDNA

برای بررسی تغییرات بیان ژن‌های *Rab22a* و *Dnm1L* محیط کشت حاوی دارو تخلیه شده و RNA تام سلولی به وسیله کیت RNeasy mini kit (Qiagen، آلمان) استخراج شد. از هر نمونه ۲ میکرولیتر برای خواندن غلظت توسط دستگاه نانودراپ (Thermoscientific، آمریکا) جدا شد و مابقی در ۲۰-درجه سانتی گراد نگهداری شد. همچنین برای اطمینان از سالم بودن قطعات RNA از ژل آگارز با غلظت ۱ درصد در محلول ۱x TAE (Tris-acetate-EDTA) و ولتاژ ۱۰ ولت بر سانتی متر برای الکتروفورز RNA کل استفاده شد. پس از تعیین غلظت RNA در هر نمونه، مقدار میزان یکسانی

StepOnePlus Real-Time PCR و دستگاه Green Supermix

برای انجام Q-RT-PCR از iTaq™ Universal SYBR®

System از AB Applied Biosystem (آمریکا) استفاده شد.

تیمارهای ۲۴ ساعته مرفین، متادون و DAMGO به همراه کنترل بدون تیمار هر کدام سه بار تکرار شد. هر نمونه به صورت سه گانه

(Triplicate) در پلیت Q-RT-PCR آزمایش شد. نتایج به صورت میانگین حاصل از هر تکرار سه تایی بررسی شد. چرخه گرمایشی Q-RT-PCR که در این آزمایش استفاده شد به قرار زیر است:

جدول ۲ چرخه گرمایی Q-RT-PCR

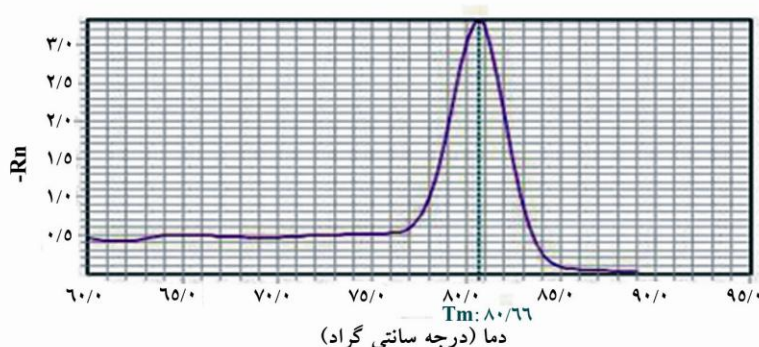
مرحله سکون	۹۵ درجه سانتی گراد	۱۰ دقیقه
مرحله چرخشی	۹۵ درجه سانتی گراد	۱۵ ثانیه
مرحله ذوب	۹۵ درجه سانتی گراد	۱۵ ثانیه
	۶۰ درجه سانتی گراد	۱ دقیقه
	۴۰ چرخه	

نتایج

تیمار طولانی مدت سلول‌های بیان کننده برونزاد (Exogenous) گیرنده MOP، شامل کشت سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت حاوی داروهای آگونیست گیرنده MOP، مرفین، DAMGO و متادون با غلظت‌های فارماکولوژیکی یکسان صورت گرفت. RNA از سلول‌ها که از نظر ریخت شناختی با میکروسکوپ چک شده بودند طبق روش ذکر شده استخراج شد و جذب RNA استخراج شده از هر نمونه با دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. نمونه‌هایی که نسبت جذب آن‌ها در طول موج ۲۶۰A به ۲۸۰A در حدود 1 ± 2 و نسبت جذب آن‌ها در طول موج ۲۶۰A به ۲۳۰A بین ۲ و ۴ است از نظر خلوص RNA قابل قبول هستند.

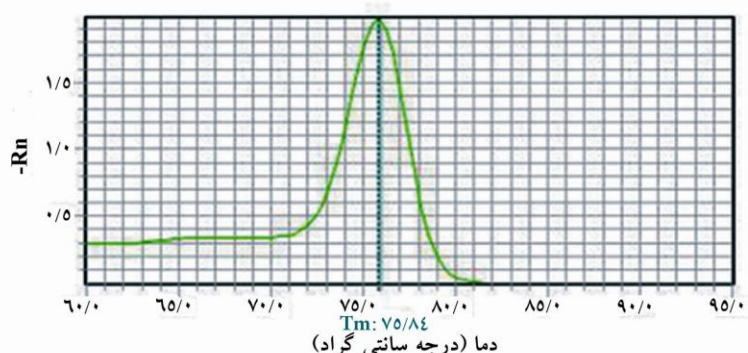
برای حصول اطمینان از کامل بودن مولکول‌های RNA استخراج شده و عدم شکسته شدن آن‌ها با RNase از ژل الکتروفورز آگارز با غلظت ۰/۵ استفاده شد.

با استفاده از برنامه حرارتی و زمانی مناسب و آغازگرهای سنس و آنتی سنس بیان ژن‌های *Dnm1L* و *Rab22a* طی عمل PCR-RT سنجیده شد و به منظور اثبات بروز تغییرات ذکر شده در بیان از ژن خانه دار *Gapdh1* به عنوان استاندارد استفاده شد. به عنوان نمونه کنترل از کشت رده سلولی یکسان با به طور همزمان و با شرایط کاملاً یکسان و بدون تیمار دارو استفاده شد تا بیان ژن‌ها نسبت به کنترل تیمار نشده سنجیده شود. برای تعیین غلظت آغازگرها در مخلوط واکنش از غلظت بهینه مورد استفاده در آزمایشگاه یعنی ۳۰۰ نانومولار استفاده شد. RT-PCR به روش سایبر گرین (Cyber green) انجام شد و به عنوان فلوروفور زمینه از Rox استفاده شد. نمودارهای به دست آمده از انجام PCR-RT برای ژن‌های *Dnm1L* و *Rab22a* و *Gapdh1* نمایانگر منحنی‌های ذوب (Melt curve) مناسب و قابل قبولی برای این دو ژن بود (شکل ۲ و ۳) و نمودار مربوط به دمای ذوب آن‌ها خلوص ژن و عدم وجود آلودگی را اثبات کرد.



شکل ۲ منحنی ذوب ژن *Rab22a1*

اثر آگونیست‌های گیرنده افیونی مو (Mu) بر بیان *Rab22a* و *Dnm1L*



شکل ۳ منحنی ذوب ژن *Dnm1L*

هدف است که در آن میزان محصول به حدی می‌رسد که میزان فلورسانس از مقدار آستانه بیشتر می‌شود. در فرمول زیر نرمال‌کننده نمونه با آغازگر ژن خانه‌دار و تنظیم‌کننده نمونه کنترل است. میزان *Ct* برای هر نمونه در جدول ۳ آمده است.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{نرمال‌کننده}} - \Delta Ct_{\text{نمونه}}$$

$$s = \Delta Ct_{\text{نرمال‌کننده}} - Ct_{\text{نمونه}}$$

$$c = \Delta Ct_{\text{نرمال‌کننده}} - Ct_{\text{نمونه}}$$

میانگین *Ct* از هر سه تکرار برای هر نمونه با *Ct* ژن خانه‌دار *GapdH1* استاندارد شد و سپس میزان بیان ژن در هر نمونه تیمار نسبت به میزان بیان در نمونه کنترل مقایسه شد. تحلیل نتایج پس از مرتب کردن داده‌ها طبق فرمول زیر صورت گرفت:

نسبت تفاوت بیان برابر $Ct\Delta - 2\Delta$ است که در این فرمول میزان *Ct* یا همان چرخه آستانه، شماره چرخه‌ای از تکثیر توالی

جدول ۳ مقادیر محاسبه شده $2^{\Delta Ct}$ برای هر نمونه تیمار و کنترل در سه تکرار

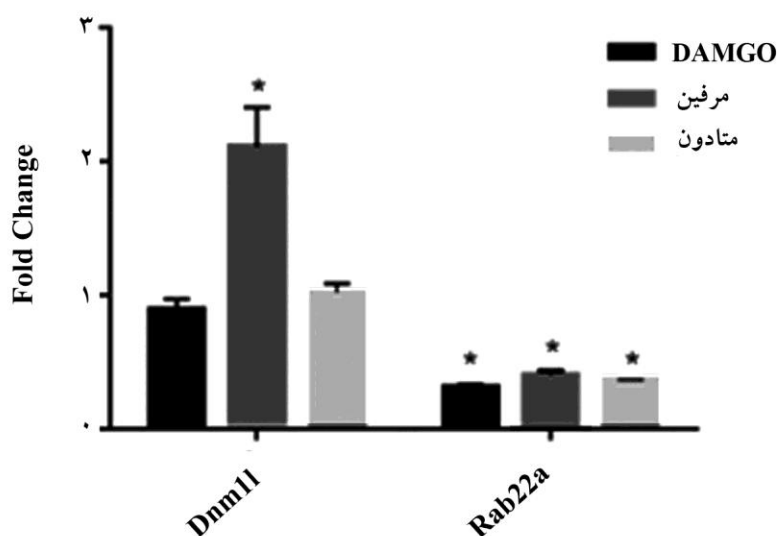
<i>Dnm1L</i>	نسبت به <i>GapdH1</i>	آزمایش/کنترل	<i>Rab22a</i>	نسبت به <i>GapdH1</i>	آزمایش/کنترل
کنترل ۱	۰/۴۰۴۱۳۵	-	کنترل ۱	۰/۶۶۳۱۷۲	-
کنترل ۲	۰/۳۲۰۲۸۷	-	کنترل ۲	۰/۶۶۴۸۹۱	-
کنترل ۳	۰/۴۰۲۴۲۳	-	کنترل ۳	۰/۶۶۲۸۳۷	-
۱ DAMGO	۰/۳۱۳۹۶۵	۰/۷۷۶۸۸۲	۱ DAMGO	۰/۱۸۲۹۴۰	۰/۲۷۵۸۵۵
۲ DAMGO	۰/۳۳۷۱۲۳	۱/۰۵۳۱۸۳	۲ DAMGO	۰/۲۲۳۵۷۹	۰/۳۳۶۲۶۴
۳ DAMGO	۰/۳۳۸۸۸۰	۰/۸۴۲۰۹۹	۳ DAMGO	۰/۲۲۲۴۳۱	۰/۳۳۵۵۷۵
۱ مرفین	۰/۶۶۸۴۶۳	۱/۶۵۴۰۶۱	۱ مرفین	۰/۲۴۸۵۴۲	۰/۳۷۱۷۵۷
۲ مرفین	۰/۶۴۸۱۹۵	۲/۰۲۳۷۹۲	۲ مرفین	۰/۳۱۲۱۰۲	۰/۴۶۹۴۰۲
۳ مرفین	۱/۰۷۲۳۷۷	۲/۶۶۴۸۰۰	۳ مرفین	۰/۲۴۶۴۱۵	۰/۳۷۱۷۵۷
۱ متادون	۰/۳۶۱۱۶۸	۰/۸۹۳۶۸۲	۱ متادون	۰/۲۴۴۹۳۴	۰/۳۶۹۳۳۸
۲ متادون	۰/۳۵۸۷۲۲	۱/۱۲۰۰۰۲	۲ متادون	۰/۲۴۶۳۲۴	۰/۳۷۰۴۷۳
۳ متادون	۰/۴۲۲۳۴۶	۱/۰۴۹۵۰۰۷	۳ متادون	۰/۲۴۶۴۱۵	۰/۳۷۱۷۵۷

با نمونه کنترل بیان ژن *Dnm1L* به‌طور معنی‌داری و با $P \text{ Value} < 0.05$ برابر افزایش یافته و بیان ژن

بررسی منحنی‌های به‌دست آمده نشان داد در اثر تیمار طولانی مدت با مرفین با غلظت نهایی 10^{-5} در مقایسه

برای ژن *Dnm1L* ۰/۹۳ برای ژن *Rab22a1* ۰/۸۹ و برای ژن خانه‌دار *GapDH1* میزان ۰/۹۱ به‌دست آمد. از میانگین نتایج سه تکرار و محاسبه مقدار انحراف از معیار برای هر میانگین، با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad نمودار شکل ۴ به‌دست آمد.

Rab22a ۰/۳۹ برابر کاهش یافته است. در حالی که میزان بیان *Dnm1L* در اثر تیمار با متادون و DAMGO تغییر معنی‌داری نشان نداده است، بیان ژن *Rab22a* به‌ترتیب ۰/۴۱ و ۰/۴۵ درصد کاهش نشان داده است. میزان کارایی تکثیر نیز از روش LinReg استفاده شد. میزان کارایی تکثیر



شکل ۴ میزان بیان ژن‌های *Dnm1L* و *Rab22a* پس از تیمار طولانی مدت با آگونیست‌های مرفین، DAMGO و متادون، پس از نرمال‌سازی نسبت به بیان ژن خانه‌دار *GapDH1*؛ نمونه کنترل به عنوان مرجع واحد در این نمودار استفاده شده است و مقادیر نسبت به آن در نظر گرفته شد. در هر گروه سه تایی در شکل میزان تأثیر آگونیست‌های مختلف در بیان یک ژن با هم مقایسه شده‌اند. در این شکل محور افقی نشان‌دهنده نوع تیمارهای سلولی در مورد دو ژن *Dnm1L* و *Rab22a* و محور عمودی بیان ژن در نمونه تیمار نسبت به نمونه کنترل است.

باعث پیشرفت در توانایی درمان و پیشگیری از اعتیاد شود [۷]. شبه افیون‌ها قدرتمندترین درمان برای درد هستند که متأسفانه استفاده از آن‌ها به‌دلیل آثار جانبی شدید شامل مهار سیستم تنفسی، بی‌حسی و خشکی مزاج محدود است. ایجاد تحمل، وابستگی و اعتیاد باعث کاهش استفاده درمانی از این داروها می‌شود [۲۳]. بیش از یک قرن تلاش برای مهار آثار سو شبه مخدرها نتیجه‌چندانی در بر نداشته و تمام آن‌ها باعث ایجاد اعتیاد، تحمل و آشفتگی ذهنی و جسمی ناشی از ترک مرفین می‌شود [۲۴]. روش‌های کنونی برای رفع اعتیاد شدیداً وابسته به جایگزینی آگونیست‌هایی که تأثیر کوتاه مدت دارد

بحث

قرن‌هاست که انسان با مشکل اعتیاد روبه‌روست اما هنوز مکانیسم‌های ایجاد اعتیاد توسط برخی مواد مخدر و عوامل ژنتیکی مستعدکننده افراد برای ابتلا به اعتیاد چندان شناخته شده نیست. از نظر بالینی سو مصرف مواد مخدر باعث خسارات مالی و جانی فراوانی شده و هنوز درمان‌های مؤثری برای آن وجود ندارد. تحقیق برای درک بهتر مکانیسم‌های عصب شناختی مسئول عملکرد مواد مخدر و عوامل ژنتیکی که در اعتیاد نقش دارند اهمیت به‌سزایی دارد چراکه می‌تواند

کنار گذاشتن مواد مخدر و گذراندن دوران ترک، حتی پس از گذشت زمان‌های بسیار طولانی، باز مصرف مواد را آغاز می‌کنند. جالب است که بسیاری از بیماران معتاد در دوره ترک خود بازگشت نمی‌کنند، بلکه مدت‌ها پس از اینکه عوارض ترک آن‌ها فروکش کرد به مصرف مجدد مواد روی می‌آورند [۳۰]. واضح است که تغییرات پایدار و حتی برگشت ناپذیری در سیستم‌های نورونی ایجاد شده است که مسئول این گونه رفتارهای معتادانه است. در حقیقت چنین به نظر می‌رسد که ممکن است اختلالات سیناپسی در سطح مولکولی یا ساختاری مبنای اعتیاد باشد. به طور کلی سه عامل برای عود اعتیاد مطرح است که عبارتند از: مصرف آغازگرانه، بازگشت به واسطه نشانه و در نهایت شروع دوباره مصرف به واسطه فشارهای محیطی [۳۱]. ماندگاری اعتیاد و پدیده بازگشت با واسطه نشانه اعتیاد، احتمالاً ناشی از فرآیندهای مولکولی است که در نهایت به تغییر وضعیت دادن سیناپس‌ها و مدارهای عصبی می‌انجامد و بر این امر دلالت دارد که تغییرات بیان ژن در امر اعتیاد مؤثر است [۷].

دو دسته از تغییرات می‌توانند مسئول پایداری اعتیاد باشند: الف-تنظیم طولانی مدت یا دایمی افزایشی یا کاهش مولکول‌های مهم و به بیان ژن یا ترجمه پروتئین به صورت ناگهانی و در زمان کوتاه که از طریق بازآرایی مولکولی سیناپس‌ها و مدارها باعث این اختلالات بلند مدت رفتاری می‌شود [۳۲]. درباره سطح بیان برخی از mRNAها و پروتئین‌ها تغییرات تقریباً طولانی مدت، اما نه پایداری، گزارش شده است [۳۳].

شواهد متنوعی وجود دارد که عوامل رونویسی مختلفی در مقاومت به مرفین، حساسیت زدایی و آشفتگی ذهنی و جسمی ناشی از ترک مرفین فعال می‌شود. با اینکه تیمار با مرفین تغییر چندانی در میزان بیان گیرنده‌های MOP ایجاد نمی‌کند، تنظیمات رونویسی پروتئین‌های دخیل در ترافیک گیرنده‌های افیونی مانند GRK2 یا بتا ارسستین II و همچنین بیان گیرنده‌های دیگر مانند دوپامین و گیرنده‌های NMDA،

(هرویین) با آگونیست‌هایی با تأثیر طولانی‌تر (مثل متادون) یا آگونیست‌های جزئی (Buprenaphine) است [۲۵]. شبه افیون‌هایی که آگونیست‌های اختصاصی تری برای گیرنده‌های μ ، δ و κ هستند از نظر درمان اعتیاد مشکلات بیشتری ایجاد می‌کنند [۲۶].

GPCRها در مغز بیشتر به عنوان تنظیم‌کننده‌های عصبی کند عمل می‌کند. کاهش یا افزایش فعالیت بسیاری از آن‌ها در مغز به شرایط آسیب شناختی مانند افسردگی و جنون ارتباط دارد [۲۷]. یکی از ویژگی‌های مهم سیستم پیام‌رسانی G-پروتئین این است که ثابت نیست و نسبت به فعالیت یا پیام‌رسانی قبلی نوعی حافظه از خود نشان می‌دهد [۲۸]؛ بنابراین فعالیت زیاد یک گیرنده باعث کاهش توانایی تحریک‌پذیری آن در آینده می‌شود (حساسیت زدایی) و بالعکس (حساسیت زایی). این مکانیسم مانع از حساسیت بیش از حد شده و همان مکانیسمی است که باعث حساسیت گیرنده نوری وابسته به G-پروتئین [رودوپسین (Rhodopsin)] به نور و تاریکی در زمان کمتر از یک دقیقه می‌شود. توانایی پیام‌رسانی گیرنده در دو سطح کنترل می‌شود: با کنترل تعداد گیرنده‌های سطح سلول و با تنظیم قابلیت پیام‌رسانی گیرنده‌هایی که در سطح سلول وجود دارد. گیرنده‌ها در یک حالت تعادل بین سطح سلول و ذخیره اندوزومی بین سستز و تجزیه وجود دارند. معمولاً فعال‌سازی گیرنده‌ها باعث حذف آن‌ها از سطح سلول و در موارد کمتری هم باعث وارد شدن گیرنده‌های جدیدی به سطح سلول می‌شود. گیرنده‌هایی که وارد شدند می‌توانند وارد مسیر بازیافت شده یا برای تجزیه به لیزوزوم بروند [۲۹].

توضیحات تئوری اصلی درباره اعتیاد، همه بر پایه این دیدگاه هستند که داروها تغییراتی در مغز ایجاد می‌کنند که باعث تغییر در عملکردهای روانشناختی مغز می‌شود. پس باید تعیین شود که چه تغییراتی در مغز و در داخل نورون‌ها اتفاق می‌افتد که در نهایت به اعتیاد منجر می‌شود. سؤال مهم دیگری که در مورد اعتیاد مطرح است این است که چرا افراد پس از

گیرنده‌های GABA و آلفا آدنورسپتورها به وجود می‌آید.

بررسی نمایه بیان ژنی که اخیراً انجام شده است باعث شناسایی دسته‌های جدیدی از ژن‌های تحت تأثیر مرفین شده است. همان‌طور که در مقدمه اشاره شد با این که ثابت شده که استفاده محدود از مرفین (یک بار) بیشتر روی ژن‌های عملکرد متابولیکی تأثیر دارد، مقادیر بالا رونده مرفین بیشتر روی ژن‌هایی که الگوی اتصالات سیناپسی را تغییر می‌دهند مانند arc یا ania-3 تأثیر دارد [۱۶].

از آنجا که مصرف افیون‌ها از جمله مرفین باعث تغییر در مکانیسم تحریکی نورون‌ها می‌شود و همان‌طور که گفته شد این تغییرات ناشی از تغییر در سیستم تنظیمی گیرنده‌های نورونی است بخشی از این مسیرها در این تحقیق مطالعه شد. یکی از مسیرهای اصلی در تنظیم تحریک نورونی، میزان اندوسیتوز یا درونی‌ری (internalization) گیرنده‌ها است. از آنجا که ژن‌های *Rab22a* و *Dnm1L* از ژن‌های شناخته شده در مسیرهای اندوسیتوز و ترافیک سلولی هستند [۱۷، ۱۸]. در این تحقیق میزان بیان آن‌ها در پاسخ به مرفین و آگونیست‌های مشابه مرفین به عنوان نوعی کنترل مطالعه شد.

از آنجایی که بیان ژن *Rab22a* در اثر تیمار با مرفین نسبت به نمونه کنترل کاهش می‌یابد و پروتئین کدشونده توسط این ژن در تشکیل اندوزوم‌های اولیه دخالت دارد می‌توان به این نتیجه رسید که احتمالاً این ژن در مسیری از ترافیک سلولی و احتمالاً ترافیک گیرنده‌های افیونی Mu که مورد هدف مرفین است دخالت دارد که پس از تیمار مزمن مرفین به نوعی دچار سرکوب می‌شود. اما از آنجایی که طی این تحقیق و مقایسه بیان ژن *Rab22a* در اثر تیمار آگونیست‌های گیرنده افیونی Mu شامل متادون و DAMGO که عملکرد مشابهی با مرفین دارند اما به میزان کمتری باعث ایجاد مقاومت سلول می‌شوند و از آن مهم‌تر برای اهداف این تحقیق، مانند مرفین باعث سرکوب اندوسیتوز گیرنده‌ها نمی‌شوند، نتایج مشابهی با نتایج تیمار مرفین نشان داده است می‌توان چنین استنباط کرد که پروتئین حاصل از ژن *Rab22a* احتمالاً در مسیر سرکوب

اندوسیتوز که خاص مرفین است دخالت مستقیم ندارد.

از طرفی طی این مطالعه نشان داده شد که بیان ژن *Dnm1L* در اثر تیمار مزمن مرفین به میزان ۲/۳۷ برابر افزایش یافته است. چنین نتیجه‌ای از آن جهت که پروتئین حاصل از این ژن یک G پروتئین حرکتی از خانواده داینامین است و بیشتر در نقل و انتقالات میتوکندری و پر اکسی زوم نقش دارد جالب توجه است خصوصاً که طی این تحقیق نشان داده شد که بیان این ژن در اثر تیمار با متادون و DAMGO تغییر معنی داری نشان نمی‌دهد. چنین به نظر می‌رسد که مرفین با اینکه باعث سرکوب اندوسیتوز (Endocytosis) گیرنده افیونی Mu می‌شود فرآیندهای وابسته به ترافیک سلولی دیگری را متفاوت با آگونیست‌های مشابه خود فعال می‌نماید. این مسیرها می‌تواند شامل ترافیک گیرنده‌های سلولی دیگری که تحت تأثیر تیمار مرفین هستند باشد. چنانچه که در مورد گیرنده سروتونین چنین تداخل عملکردی ثابت شده است [۳۴]. همچنین می‌توان چنین استنباط کرد که افزایش بیان این ژن در اثر تیمار مرفین در نتیجه تغییراتی در متابولیسم سلول که توسط مرفین القا می‌شود باشد.

این تحقیق نشان می‌دهد که ژن *Rab22a* برای بررسی اثر آگونیست‌های گیرنده افیونی Mu بر ترافیک سلولی یا مسیرهای سلولی احتمالی دیگری که پروتئین حاصل از این ژن در آن‌ها دخالت دارد کاندید مناسبی محسوب می‌شود. اما ژن *Dnm1L* علاوه بر این ویژگی می‌تواند برای بررسی اثر متفاوت مرفین بر اندوسیتوز گیرنده‌های Mu و همچنین القای بیشتر مقاومت سلولی به کار گرفته شود. همچنین برای ادامه مطالعات در این زمینه، بررسی تغییرات میزان پروتئین ژن‌های مورد نظر در اثر تیمار دارو می‌تواند نتایج مفیدی به دست آورد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشی از رساله دکتری رشته ژنتیک مولکولی است که با پشتیبانی مالی دانشگاه تربیت مدرس و

کلیه همکاران و کارکنان گروه علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس برای اجرای این تحقیق اعلام می‌دارند.

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری انجام شده است. نویسندگان مراتب احترام و قدردانی خود را نسبت به

منابع

- [1] Offermanns S, Rosenthal W. Encyclopedia of Molecular Pharmacology. Volume 1, 2nd ed. Germany: Springer Science & Business Media, 2008; p: 903.
- [2] Moore RA, Wiffen PJ, Derry S, Maguire T, Roy YM, Tyrrell L. Non-prescription (OTC) oral analgesics for acute pain - an overview of Cochrane reviews. Cochrane Database Syst Rev 2015; (11): CD010794.
- [3] Alexander GC, Kruszewski SP, Webster DW. Rethinking opioid prescribing to protect patient safety and public health. JAMA 2012; 308(18): 1865-6.
- [4] Pradhan AA, Walwyn W, Nozaki C, Filliol D, Erbs E, Matifas A, Evans C, Kieffer BL. Ligand-directed trafficking of the δ -opioid receptor in vivo: two paths toward analgesic tolerance. J Neurosci 2010; 30(49): 16459-68.
- [5] Cherny NI, Christakis NA. Oxford textbook of palliative medicine. 3rd ed. London: Oxford University Press, 2011; p: 305.
- [6] Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dollé P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. Nature 1996; 383(6603): 819-23.
- [7] Nestler EJ. Under siege: the brain on opiates. Neuron 1996; 16(5): 897-900.
- [8] Christie MJ. Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. Br J Pharmacol 2008; 154(2): 384-96.
- [9] Williams JT, Christie MJ, Manzoni O. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. Physiol Rev 2001; 81(1): 299-343.
- [10] Martini L, Whistler JL. The role of mu opioid receptor desensitization and endocytosis in morphine tolerance and dependence. Curr Opin Neurobiol 2007; 17(5): 556-64.
- [11] Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. Opioid receptors. Annu Rev Biochem 2004; 73: 953-90.
- [12] Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Mathiesen JM, Sunahara RK, Pardo L, Weis WI, Kobilka BK, Granier S. Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. Nature 2012; 485(7398): 321-6.
- [13] Wu H, Wacker D, Mileni M, Katritch V, Han GW, Vardy E, Liu W, Thompson AA, Huang XP, Carroll FI, Mascarella SW, Westkaemper RB, Mosier PD, Roth BL, Cherezov V, Stevens RC. Structure of the human κ -opioid receptor in complex with JDTic. Nature 2012; 485(7398): 327-32.
- [14] Stermini C, Spann M, Anton B, Keith DE Jr, Bunnnett NW, von Zastrow M, Evans C, Brecha NC. Agonist-selective endocytosis of mu opioid receptor by neurons in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(17): 9241-6.
- [15] Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of

- addiction. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35(1): 217-38.
- [16] Ammon-Treiber S, Höllt V. Morphine-induced changes of gene expression in the brain. *Addict Biol* 2005; 10(1): 81-9.
- [17] English JA, Harauma A, Föcking M, Wynne K, Scaife C, Cagney G, Moriguchi T, Cotter DR. Omega-3 fatty acid deficiency disrupts endocytosis, neuritogenesis, and mitochondrial protein pathways in the mouse hippocampus. *Front Genet* 2013; 4: 208.
- [18] Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 857-902.
- [19] Bao S, Zhu J, Garvey WT. Cloning of Rab GTPases expressed in human skeletal muscle: studies in insulin-resistant subjects. *Horm Metab Res* 1998; 30(11): 656-62.
- [20] Gerhard DS, Wagner L, Feingold EA, Shenmen CM, Grouse LH, Schuler G, Klein SL, Old S, Rasooly R, Good P, Guyer M, Peck AM, Derge JG, Lipman D, Collins FS, Jang W, Sherry S, Feolo M, Misquitta L, Lee E, Rotmistrovsky K, Greenhut SF, Schaefer CF, Buetow K, Bonner TI, Haussler D, Kent J, Kiekhaus M, Furey T, Brent M, Prange C, Schreiber K, Shapiro N, Bhat NK, Hopkins RF, Hsie F, Driscoll T, Soares MB, Casavant TL, Scheetz TE, Brownstein MJ, Usdin TB, Toshiyuki S, Caminci P, Piao Y, Dudekula DB, Ko MS, Kawakami K, Suzuki Y, Sugano S, Gruber CE, Smith MR, Simmons B, Moore T, Waterman R, Johnson SL, Ruan Y, Wei CL, Mathavan S, Gunaratne PH, Wu J, Garcia AM, Hulyk SW, Fuh E, Yuan Y, Sneed A, Kowis C, Hodgson A, Muzny DM, McPherson J, Gibbs RA, Fahey J, Helton E, Kettelman M, Madan A, Rodrigues S, Sanchez A, Whiting M, Madari A, Young AC, Wetherby KD, Granite SJ, Kwong PN, Brinkley CP, Pearson RL, Bouffard GG, Blakesly RW, Green ED, Dickson MC, Rodriguez AC, Grimwood J, Schmutz J, Myers RM, Butterfield YS, Griffith M, Griffith OL, Krzywinski MI, Liao N, Morin R, Palmquist D, Petrescu AS, Skalska U, Smailus DE, Stott JM, Schnerch A, Schein JE, Jones SJ, Holt RA, Baross A, Marra MA, Clifton S, Makowski KA, Bosak S, Malek J; MGC Project Team. The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC). *Genome Res* 2004; 14(10B): 2121-7.
- [21] Smimova E, Griparic L, Shurland DL, van der Blik AM. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 2001; 12(8): 2245-56.
- [22] Carrillo JJ, Lopez-Gimenez JF, Milligan G. Multiple interactions between transmembrane helices generate the oligomeric $\alpha 1b$ -adrenoceptor. *Mol Pharmacol* 2004; 66(5): 1123-37.
- [23] Buntin-Mushock C, Phillip L, Moriyama K, Palmer PP. Age-dependent opioid escalation in chronic pain patients. *Anesth Analg* 2005; 100(6): 1740-5.
- [24] Hernandez SH, Nelson LS. Prescription drug abuse: insight into the epidemic. *Clin Pharmacol Ther* 2010; 88(3): 307-17.
- [25] Lobmaier P, Gossop M, Waal H, Bramness J. The pharmacological treatment of opioid

- addiction--a clinical perspective. *Eur J Clin Pharmacol* 2010; 66(6): 537-45.
- [26] Kieffer BL, Gavériaux-Ruff C. Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol* 2002; 66(5): 285-306.
- [27] Wise A, Jupe SC, Rees S. The identification of ligands at orphan G-protein coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 43-66.
- [28] Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 2011; 63(1): 182-217.
- [29] Böhm SK, Grady EF, Bunnett NW. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 1997 Feb 15; 322(Pt 1): 1-8.
- [30] Spanagel R, Heilig M. Addiction and its brain science. *Addiction* 2005; 100(12): 1813-22.
- [31] Le Moal M, Koob GF. Drug addiction: pathways to the disease and pathophysiological perspectives. *Eur Neuropsychopharmacol* 2007; 17(6-7): 377-93.
- [32] Hyman SE, Malenka RC. Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2(10): 695-703.
- [33] Graybiel AM. Habits, rituals, and the evaluative brain. *Annu Rev Neurosci* 2008; 31: 359-87.
- [34] Lopez-Gimenez JF, Vilaró MT, Milligan G. Morphine desensitization, internalization, and down-regulation of the mu opioid receptor is facilitated by serotonin 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor coactivation. *Mol Pharmacol* 2008; 74(5): 1278-91.