جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

شناسایی و تعیین میزان بیان mRNA دو اسپلایس واریانت گیرنده μ اوپیوئیدی «hMORE-1A و hMORE-10» در لمفوسیت‌های خون محیطی معتادان ترک‌کرده

دکتر نسیم وثوقی*، دکتر فرشاد روشن ضمیر**، علی گودرزی***، تینا صداقتی****، دکتر محمدرضا زرین‌دست *****، دکتر محمدرضا نوری دلوئی******

* دستیار فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
** استاد فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
*** دستیار علوم اعصاب شناختی، پژوهشکده علوم شناختی، تهران، ایران.
**** دانشجوی بیولوژی، مرکز پژوهشی سلولی و مولکولی سینا، تهران، ایران.
***** استاد فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
****** استاد ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف

گیرنده μ اوپیوئیدی در بروز آثار سوء و نیز درمانی اوپیوئیدها مانند مرفین و هرویین نقشی اساسی دارد. این گیرنده در مسیرهای عصبی مربوط به اعتیاد در مغز به میزان زیادی بیان می‌شود. هدف این مطالعه، یافتن یک بیومارکر محیطی در مطالعات مربوط به اعتیاد از طریق بررسی میزان بیان mRNA مربوط به دو اسپلایس واریانت گیرنده μ اوپیوئیدی، یعنی «hMORE-1A و hMORE-10» در لمفوسیت‌های خون محیطی معتادان ترک کرده، می‌باشد.

روش بررسی

این پژوهش از نوع مطالعات مورد شاهدی و جامعه مورد بررسی، مذکر و شامل ۲ گروه بودند: گروه مورد را افرادی تشکیل می‌دهند با میانگین سنی ۳۳/۵±۶/۱ سال که قبلا به اوپیوئیدها اعتیاد داشته و سپس مصرف این مواد را ترک کرده و مدت زمان زیادی از ترک اعتیاد آنها گذشته است. گروه شاهد شامل افراد سالم داوطلب با میانگین سنی۳۱±۷/۵۳ سال بود که سابقه اعتیاد به هیچ نوع ماده مخدری را نداشتند. برای ارزیابی میزان بیان mRNA در لمفوسیت‌های خون گروه‌های مورد مطالعه، از روش RCP emiT-laeR و رنگ SYBR Green استفاده گردید.

یافته‌ها

میزان بیان mRNA مربوط به hMOR-1A در لمفوسیت‌های معتادان ترک‌کرده نسبت به گروه شاهد با کاهش معنادار به ۰/۳۳ میزان گروه شاهد رسید (P<۰/۰۰۱). در مورد اسپلایس واریانت hMOR-1O نیز نتایج مشابهی به دست آمد و میزان بیان mRNA آن در لمفوسیت‌های معتادان ترک‌کرده به ۰/۳۸ میزان آن در گروه شاهد کاهش یافت (P>۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری

کمبود میزان بیان mRNA دو اسپلایس واریانت گیرنده μ اوپیوئیدی، یعنی hMOR-1A و hMOR-1O، می‌تواند به عنوان یکی از عوامل احتمالی مستعدکننده‌ای در جهت گرایش افراد به اعتیاد مورد بررسی‌های بعدی قرار گیرد. اندازه‌گیری این میزان با استفاده از لمفوسیت‌های خون ممکن است به عنوان یک بیومارکر محیطی در شناسایی این افراد مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: لمفوسیت، بیان mRNA، اوپیوئیدها، اعتیاد، اسپلایس واریانت‌های گیرنده μ اوپیوئیدی.

نویسنده مسئول مکاتبات: گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران؛
تلفن: ۸۸۹۵۳۰۰۵-۲۱-۹۸+ آدرس پست الکترونیکی: nooridaloii@sina.tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۶/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۶/۲۷

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

وابستگی به اوپیوئیدها اختلالی مزمن و عودکننده است که منجر به مصرف اجباری دارو و بروز علایم محرومیت در صورت قطع دارو می‌شود (۱). گیرنده μ اوپیوئیدی در بروز آثار سوء و نیز درمانی اوپیوئیدها مانند مرفین و هرویین نقشی اساسی دارد (۲). این گیرنده در مسیرهای عصبی مربوط به اعتیاد در مغز به میزان زیادی بیان می‌شود. مهم‌ترین این مسیرها، مسیر مزولیمبیک است که از ناحیه تگمنتوم شکمی (VTA) منشأ گرفته، به هسته اکومبنس (NAc) ختم می‌شود (۳). با وجود این که شواهد بالینی و مطالعات فارماکولوژیک همه دلالت بر وجود چندین نوع زیرگونه متنوع گیرنده μ اوپیوئیدی دارند، ولی تاکنون تنها یک ژن برای این گیرنده شناسایی شده است (۵،۴). یکی از راه‌های محتمل برای تولید زیرگونه‌های مختلف یک گیرنده از یک ژن واحد، پدیده Alternative Splicing می‌باشد (۶). بر همین مبنا تاکنون انواع متعددی از اسپلایس واریانت‌های گیرنده μ اوپیوئیدی در انسان شناسایی شده‌اند. این واریانت‌ها در دارا بودن اگزون‌های ۲،۱ و ۳ مشترک بوده، تفاوت آن‌ها در اگزون‌های بعدی می‌باشد (شکل شماره ۱) که موجب می‌شود بخش انتهایی پایانه کربوکسیلی گیرنده در واریانت‌های مختلف متفاوت باشد. در این بخش گیرنده محل‌های مختلفی برای فسفریلاسیون توسط کینازهای مختلف، مانند پروتئین کیناز A ، پروتئین کیناز C و کازئین کیناز II وجود دارد (۷،۶). اطلاعات موجود درباره تفاوت‌های عملکردی و پراکندگی واریانت‌های گوناگون بسیار محدود بوده و نقش این گوناگونی در ایجاد آثار زیستی آن‌ها مشخص نیست (۸).

بیان گیرنده μ اوپیوئیدی در بافت‌های دیگری غیر از سیستم عصبی، مانند سلول‌های ایمنی نیز به اثبات رسیده (۹)، که توجیه‌کننده آثار تنظیمی اوپیوئیدهای آندوژن و اگزوژن در پدیده ایمنی است. برخی دانشمندان عقیده دارند که بیان گیرنده‌های مربوط به نوروترانسمیترها در سلول‌های ایمنی و به ویژه لمفوسیت‌های خون محیطی، ممکن است تا حدودی منعکس‌کننده و به موازات بیان این گیرنده‌ها در مغز باشد. به عنوان مثال در اسکیزوفرنی افزایش میزان بیان گیرنده دوپامینی در لمفوسیت‌های خون به اثبات رسیده (۱۲-۱۰) و مشخص شده است که این افزایش با شدت علایم بالینی بیماری ارتباط مستقیمی دارد (۱۳). هدف مطالعه حاضر در ابتدا شناسایی mRNA دو اسپلایس واریانت گیرنده μ اوپیوئیدی، یعنی hMOR-1A و hMOR-1O، در لمفوسیت‌های خون محیطی و سپس مقایسه میزان بیان mRNA این دو واریانت در لمفوسیت‌های خون گروه شاهد با گروهی است که سابقاً به اوپیوئیدها معتاد بوده و اینک مدت زمان زیادی از ترک آن‌ها می‌گذرد تا بتوان احتمال به کارگیری لمفوسیت‌ها را به عنوان بیومارکری محیطی در مطالعات مربوط به اعتیاد بررسی نمود.

روش بررسی

این پژوهش از نوع مطالعات مورد شاهدی و جامعه مورد بررسی همگی مذکر و شامل ۲ گروه بودند: گروه مورد را افرادی تشکیل می‌دهند با میانگین سنی ۶/۱ ± ۳۳/۵ سال که سابقاً به اوپیوئیدها اعتیاد داشته (به مدت ۴/۹۳ ± ۱۰/۵۵ سال)، سپس مصرف این مواد را ترک کرده و مدت زمان زیادی (۲/۳۵ ± ۴/۱۸ سال) از ترک اعتیاد آن‌ها گذشته است. گروه شاهد شامل افراد سالم داوطلب با میانگین سنی۷/۵۳ ± ۳۱ سال بود که سابقه اعتیاد به هیچ نوع ماده مخدری را نداشتند. نمونه‌های گروه افراد با سابقه اعتیاد از انجمن معتادان گمنام و نمونه‌های گروه شاهد از دانشجویان و همکاران دانشگاه علوم پزشکی تهران و پرسنل مرکز ملی مطالعات اعتیاد جمع‌آوری شد. زمان جمع‌آوری نمونه‌ها، ۶ ماهه اول سال ۱۳۸۶، مکان آن شهر تهران، و تعداد نمونه‌ها در هر دو گروه ۳۰ نفر است. به منظور تأیید اعتیاد قبلی در گروه با سابقه اعتیاد، از معیارهای دستورالعمل تشخیصی و آماری بیماری‌های روانی-ویراست چهارم (DSM-IV) استفاده شد. معیارهای خروج از مطالعه در هر دو گروه عبارتند از: ابتلا به بیماری‌های عفونی و التهابی مانند هپاتیت B، هپاتیت C و ایدز، استفاده از هر نوع داروی مؤثر بر عملکرد سیستم عصبی، ابتلا به بیماری‌های نورولوژیک، اختلالات عمده روانپزشکی و بیماری‌های مزمن هورمونی و قلبی عروقی، بود. مشخصات کلیه افراد شرکت‌کننده در مطالعه مخفی مانده و از همگی آنان رضایت‌نامه کتبی گرفته شد. شایان ذکر است که پس از جمع‌آوری نمونه‌ها، سایر مراحل عملی پژوهش به طور مشترک در گروه ژنتیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز پژوهشی ملکولی و سلولی سینا انجام گرفت.

تهیه لمفوسیت‌های خون محیطی: از هر یک از شرکت‌کنندگان در مطالعه، نمونه خون محیطی به مقدار ۱۲ سی‌سی از ورید قدامیفوقانی ساعد گرفته شده، به لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA, مرک، آلمان) منتقل شد. سپس با استفاده از محلول مخصوص جداسازی سلول‌ها به‌نام هیستوپرپ (Histoprep، بگ، آلمان) و نیز دستگاه سانتریفوژ، طبق پروتکل پیشنهادی سازنده محلول، لایه محتوی سلول‌های لمفوسیت از خون حاوی EDTA جدا گردید. پس از جمع‌آوری این لایه‌ها، سلول‌های لمفوسیت ۳ بار با محلول استریل PBS (مرک، آلمان) شسته شدند. فاصله زمانی بین تهیه نمونه خون و جداسازی لمفوسیت‌ها در هیچ یک از آزمایش‌ها بیش از ۴ ساعت نبود.

استخراج RNA و ساختن cDNA: پس از آماده سازی لمفوسیت‌ها، RNA آن‌ها با استفاده از کیت"Total RNA Isolation System RNAgents®" (پرومگا، آمریکا) استخراج شد. مقدار و خلوص RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲٪ تعیین گردید. سپس با استفاده از کیت سنتز cDNA تک رشته‌ای با نام Quantitect (کیاژن، آمریکا)، از هر ۱ ماکروگرم RNA استخراج شده، با توجه به پروتکل شرکت سازنده، مقدار ۲۰ ماکرولیتر cDNA ساخته شد.

پرایمرهای مورد استفاده جهت Real-Time PCR: از ژن بتا اکتین به عنوان استاندارد داخلی به منظور تصحیح میزان بیان ژن‌های هدف استفاده گردید. پرایمرهای مربوط به hMOR-1A و hMOR-1O با استفاده از بانک اطلاعاتی INCB (National Center for Biotechnology Information) و نرم‌افزار Beacon Designer طراحی شدند. پرایمرهای ژن بتا اکتین از بانک پرایمر شرکت کیاژن (آمریکا) تهیه گردید. جزییات پرایمرهای مورد استفاده و طول قطعه تکثیر شده توسط آن‌ها در جدول آمده است.

جدول پرایمرهای مورد استفاده در Real-time PCR

mRNA	توالی پرایمرها	طول قطعه تکثیر شده (bp)
hMOR-1A	Sense: TTC TGT ATC CCA ACC TCT TCC Antisense: CTC CTA GTT TAG CAC AAA GCC	۱۸۶
hMOR-1O	Sense: AAC TAA TCA TCA GCC ACC CTT G Antisense: GCC TTT CAC TCT GTC ACA TAA ATC	۱۷۰
Beta-actin	از بانک پرایمر شرکت کیاژن (آمریکا) شماره کاتالوگ: QT00095431	۱۴۶

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

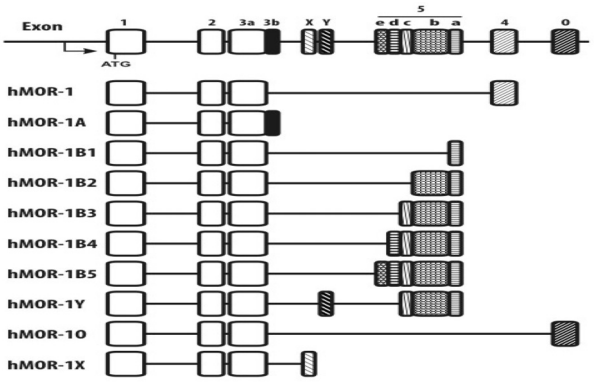
واکنش زنجیره پلی‌مراز (Real- Time PCR): واکنش‌های زنجیره پلی‌مراز (Real-Time PCR) با استفاده از I Master Mix Quantifast ìBí|öH SYBR Green (کیاژن، آمریکا) و دستگاه Rotorgene ۶۰۰۰ (کربت، استرالیا) انجام شد. در همه واکنش‌ها مقدار یکسانی از cDNA ساخته شده (۲ ماکرولیتر) مورد استفاده قرار گرفت. دمای بهینه اتصال پرایمر یا آنیلینگ، برای هر ژن که با انجام واکنش‌های متعدد به دست آمد، از ۵۳ تا ۶۱ درجه سانتی‌گراد متغیر بود. اختصاصی بودن محصول واکنش زنجیره پلی‌مراز هر ژن، با مشاهده قله‌ای واحد در منحنی ذوب (Melting Curve) آن مورد تأیید قرار گرفت. به منظور تأیید توالی و طول محصول PCR به دست آمده برای هر ژن، از روش تعیین توالی یا Sequencing و ژل آگارز ۲/۵٪ استاندارد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید (مرک، آلمان) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: به منظور تجزیه و تحلیل داده‌های PCR Real-Time، از روش منحنی استاندارد استفاده شد. منحنی استاندارد با استفاده از رقت‌های متوالی یک نمونه خاص cDNA در هر بار انجام واکنش به دست آمد. به منظور تعیین میزان بیان ژن هدف در هر نمونه ابتدا سیکلی که فلورسانس نمونه در آن به حد آستانه متمایزی از زمینه می‌رسید، تعیین گردید. سپس این سیکل به منحنی استاندارد ارجاع شد تا با استفاده از آن، عدد مربوط به میزان نسبی بیان ژن نمونه به دست آید. همه اندازه‌گیری‌ها نسبت به ژن استاندارد داخلی، یعنی بتا اکتین تصحیح شدند. هر نمونه ۲ بار وارد واکنش شده، میانگین اعداد به دست آمده برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. تحلیل آماری به منظور تعیین افزایش و یا کاهش معنادار بیان ژن‌های هدف در گروه با سابقه اعتیاد نسبت به گروه شاهد با استفاده از نسخه دوم نرم‌افزار REST-XL انجام شد (۱۴). در این نرم‌افزار تعیین کمیت ژن و تصحیح آن نسبت به استاندارد داخلی به طور همزمان صورت می‌گیرد. نتایج به صورت نسبت میانگین میزان بیان تصحیح شده ژن ±خطای استاندارد میانگین (S.E.M) نمایش داده شده است.

یافته‌ها

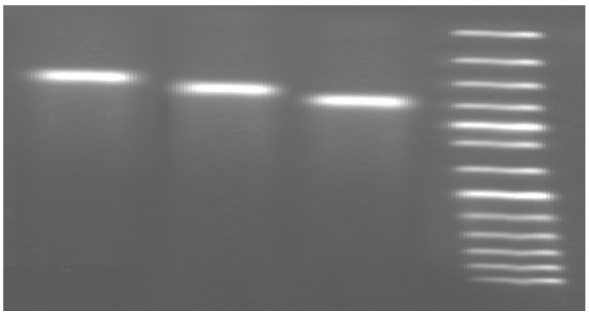
شکل شماره ۱ نمای شماتیک ژن گیرنده μ اوپیوئیدی و برخی از اسپلایس واریانت‌های مشهور آن را در انسان نشان می‌دهد. ساختار ژن در قسمت بالای شکل واسپلایس واریانت‌ها در پایین نمای ژن نشان داده شده‌اند. اگزون‌ها با مستطیل و اینترون‌ها با خطوط افقی مشخص شده‌اند. (بر اساس داده‌های ارایه شده در منبع شماره ۶).

در واریانت hMOR-1O اگزون O و در واریانت hMOR-1A قسمت 3b اختصاصی و عامل افتراق این واریانت‌ها با سایر انواع می‌باشند.



شکل شماره ۱: نمای شماتیک ژن گیرنده μ اوپیوئیدی

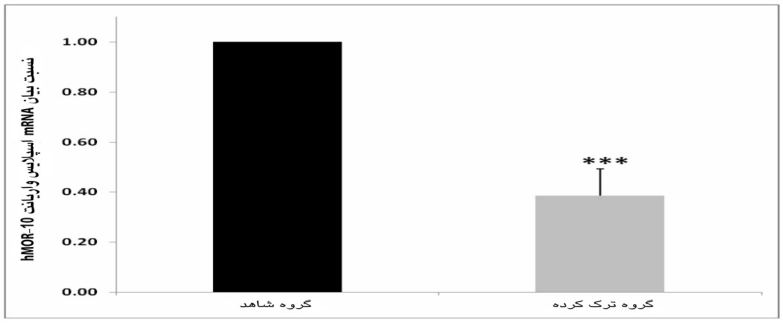
شکل شماره ۲ مربوط به الکتروفورز محصول Real-Time PCR ژن بتا–اکتین و اسپلایس واریانت‌های hMOR-1O و hMOR-1A لمفوسیت‌های خون محیطی بر روی ژل آگارز ۲/۵٪ می‌باشد. باندهای اسپلایس واریانت‌ها پس از ۵۰ سیکل و باند بتا اکتین پس از ۳۰ سیکل Real-Time PCR به خوبی نمایان می‌باشند.



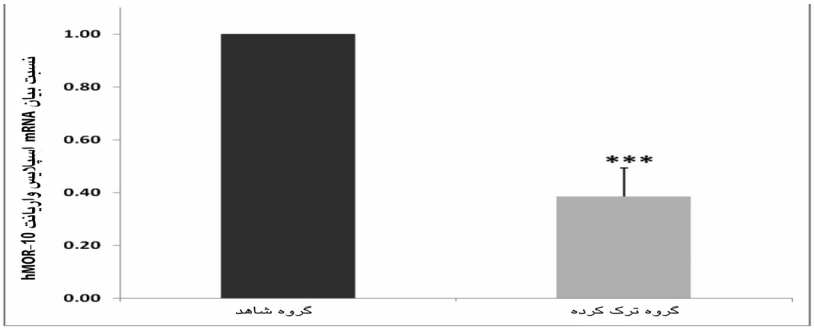
شکل شماره۲: تصویر ژل الکتروفورز محصولات Real-time PCR ژن‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر بر روی لمفوسیت‌ها. از چپ به راست به ترتیب بتا–اکتین ، hMOR-1O ، hMOR-1A و سایز مارکر ۵۰ جفت بازی (فرمنتاز، سیناژن)

شکل شماره ۳ نشان‌دهنده میزان بیان نسبی mRNA اسپلایس واریانت hMOR-1A در لمفوسیت‌های خون محیطی معتادان ترک کرده در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد. بیان اسپلایس واریانت فوق در گروه معتادان ترک کرده به طور معناداری نسبت به گروه شاهد کمتر بوده و ۰/۳۳ مقدار گروه شاهد می‌باشد (P۰/۰۰۱).

شکل شماره ۳: نمودار نسبت بیان mRNA مربوط به hMOR-1A در لمفوسیت‌های خون محیطی گروه شاهد و گروه معتادان ترک کرده. P<۰/۰۰۱ ✱✱✱ در مقایسه با گروه شاهد



بیان نسبی mRNA اسپلایس واریانت hMOR-1O در لمفوسیت‌های خون محیطی معتادان ترک کرده در مقایسه با گروه شاهد در شکل شماره ۴ نشان داده شده است. بیان این اسپلایس واریانت نیز در گروه معتادان ترک کرده تفاوتی معنادار با گروه شاهد داشته و ۰/۳۸ میزان گروه شاهد می‌باشد (P۰/۰۰۱).



شکل شماره ۴: نمودار نسبت بیان mRNA مربوط به hMOR-1O در لمفوسیت‌های خون محیطی گروه شاهد و گروه معتادان ترک کرده. P<۰/۰۰۱ * در مقایسه با گروه شاهد**

بحث

اعتیاد به اوپیوئیدها پدیده‌ای پیچیده است که عوامل متعدد محیطی و ژنتیکی در آن دخالت دارند (۱۵). کشف اسپلایس واریانت‌های گیرنده μ اوپیوئیدی ضمن پیچیده‌تر کردن موضوع، دیدگاه جدیدی را در مطالعات اعتیاد گشوده است؛ زیرا داشتن تنوع در پایانه کربوکسیلی گیرنده μ اوپیوئیدی، موجب می‌شود که اسپلایس واریانت‌های مختلف در اتصال به پروتئین‌های G اختصاصی، فعال کردن آدنیلیل سیکلاز، حساسیت‌زدایی (Desensitization) گیرنده‌ای و اندوسیتوز با هم متفاوت باشند (۱۷،۱۶). هم‌چنین بیان این واریانت‌ها برای هر سلول و یا بافت اختصاصی است (۱۸). یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که hMOR-1A و hMOR-1O در لمفوسیت‌های خون محیطی بیان می‌شوند و شاید مطالعه اخیر اولین گزارش مبنی بر شناسایی اسپلایس واریانت‌های گیرنده μ اوپیوئیدی در این سلول‌ها باشد. محققین بسیاری گزارش کرده‌اند که بیان گیرنده‌های مربوط به سیستم عصبی در لمفوسیت‌ها ممکن است تا حدودی به موازات وضعیت این گیرنده‌ها در مغز باشد. کاهش بیان گیرنده‌های دوپامینی در لمفوسیت‌های بیماران مبتلا به پارکینسون (۱۹) و کاهش گیرنده‌های کولینرژیک موسکارینی در بیماران مبتلا به آلزایمر (۲۰) نمونه‌هایی از شواهد به دست آمده برای اثبات این فرضیه هستند. از آن جایی که اسپلایس واریانت‌های انسانی با استفاده از رده‌های سلولی نوروبلاستومای انسانی مانند BE(2)-C و یا SHSY-5Y کشف شده‌اند (۶)، بنابراین در حال حاضر اطلاعات چندانی درباره نحوه توزیع این واریانت‌ها در قسمت‌های مختلف سیستم عصبی انسان در دست نیست و نمی‌دانیم آیا الگوهای Splicing مشاهده شده در مغز جوندگان به سیستم عصبی انسان نیز قابل تعمیم است یا خیر. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که بیان mRNA -hMOR1A و hMOR-1O در لمفوسیت‌های افراد با سابقه اعتیاد به اوپیوئیدها در مقایسه با گروه شاهد به میزان معناداری کمتر است. از آن جایی که میانگین مدت زمان ترک این افراد نسبتاً طولانی است، به نظر می‌رسد که تفاوت‌های مشاهده شده بین این گروه و گروه شاهد در نتیجه اعتیاد آن‌ها نبوده و پیامد زمینه‌ای ژنتیکی باشد؛ هر چند که احتمال مؤثر بودن هر دو عامل را نیز نمی‌توان نادیده گرفت. با این فرض که نتایج حاصل از لمفوسیت‌ها منعکس‌کننده وضعیت مغزی باشد، یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهند که در سیستم اعصاب مرکزی معتادان ترک کرده، نقصی در گیرنده‌های μ اوپیوئیدی وجود دارد. علی‌رغم نبود اطلاعات کافی درباره نحوه توزیع hMOR-1A و hMOR- 1O در نواحی مختلف مغز انسان، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که این دو اسپلایس واریانت و یا همولوگ‌های آن‌ها در قسمت‌هایی از مغز موش صحرایی که در پدیده پاداش دخالت دارند، به میزان زیادی بیان می‌شوند (۱۸،۸). اگر الگوی مشابهی در مغز انسان وجود داشته باشد، کمبود بیان این اسپلایس واریانت‌ها می‌تواند در نهایت به کاهش رهایش دوپامین در سیستم دوپامینرژیک مزولیمبیک منجر شده، سندرم نقص پاداش (Reward Deficiency Syndrome) را ایجاد کند که سبب کاهش احساس لذت ناشی از پاداش‌های طبیعی مانند غذا، ارتباط جنسی و غیره شده و فرد مبتلا را به سمت مصرف مواد اعتیادآور سوق می‌دهد (۲۱). از سوی دیگر مطالعات انجام شده نشان داده‌اند که محور هیپوتالاموس هیپوفیز-آدرنال یکی از اجزای اصلی سیستم پاسخ به استرس بوده و اوپیوئیدهای آندوژن از طریق تأثیر بر گیرنده‌های μ و نیز K باعث مهار این محور می‌شوند. هم‌چنین فعالیت بیش از حد و افزایش پاسخ‌دهی این محور نسبت به عوامل استرس‌زا می‌تواند باعث مصرف خود سرانه مواد اپیوئیدی شود. مشاهده شده است که در افراد با سابقه اعتیاد به هرویین، افزایش پاسخ‌دهی محور استرس تا مدت‌ها پس از ترک و گاهی اوقات تا آخر عمر ادامه داشته و می‌تواند سبب بازگشت به سوی مصرف مواد اوپیوئیدی باشد (۲۲). بر اساس نتایج مطالعه حاضر این فرضیه مطرح می‌شود که احتمالاً نقص مشاهده شده در بیان mRNA گیرنده μ اوپیوئیدی در معتادان ترک کرده، می‌تواند به افزایش پاسخ‌دهی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال منجر شده، افراد را به سوی مصرف اوپیوئیدها سوق دهد. تأیید این فرضیه در آینده به انجام آزمایشات و مطالعات بیشتری نیازمند است.

نتیجه‌گیری

تا فهم کامل مکانیسم‌های نوروبیولوژیکی اعتیاد به عنوان یک اختلال مزمن هنوز راه زیادی باقی مانده است. یافته‌های این مطالعه نشان دادند که mRNA اسپلایس واریانت‌های hMOR-1A و hMOR-1O در لمفوسیت‌های خون محیطی انسان بیان می‌شوند و چنان‌چه بیان mRNA این گیرنده‌ها در لمفوسیت‌ها، منعکس کننده وضعیت بیان آن‌ها در مغز باشد، به نظر می‌رسد که کاهش بیان این دو اسپلایس واریانت می‌تواند به عنوان یک عامل خطر، سبب متمایل شدن افراد به سمت مصرف داروهای اوپیوئیدی شود و اندازه‌گیری این میزان در لمفوسیت‌ها به عنوان یک مارکر محیطی می‌تواند به شناسایی این افراد کمک کند. البته باید مدنظر داشت که تولید mRNA لزوماً به ترجمه و بیان پروتئین منجر نمی‌شود. تأیید نتایج حاصل از این مطالعه در سطح بیان پروتئین، نیازمند انجام مطالعات و تحقیقات وسیع‌تری در آینده است.

References:

1. Koob GF, Sanna PP, Bloom FE. Neuroscience of Addiction. Neuron 1998;21:467-76.
2. Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, et al. Loss of Morphine-Induced Analgesia, Reward Effect and Withdrawal Symptoms in Mice Lacking the Mu-Opioid-Receptor Gene. Nature 1996;383:819-23.
3. Contet C, Kieffer BL, Befort K. Mu Opioid Receptor: A Gateway to Drug Addiction. Curr Opin Neurobiol 2004;14:370-8.
4. Giros B, Pohl M, Rochelle JM, Seldin MF. Chromosomal Localization of Opioid Peptide and Receptor Genes in the Mouse. Life Sci 1995;56:369-75.
5. Wendel B, Hoehe MR. The Human Mu Opioid Receptor Gene: 5 Regulatory and Iintronic Sequences. J Mol Med 1998;76:525-32.
6. Pan L, Xu J, Yu R, Xu MM, Pan YX, Pasternak GW. Identification and Characterization of Six New Alternatively Spliced Variants of the Human Mu Opioid Receptor Gene, Oprm. Neuroscience 2005;133:209-20.
7. Pan YX. Diversity and Complexity of the Mu Opioid Receptor Gene: Alternative Pre-MRNA Splicing and Promoters. DNA Cell Biol 2005;24:736-50.
8. Oldfield S, Braksator E, Rodriguez-Martin I, Bailey CP, Donaldson LF, Henderson G, et al. C-Terminal Splice Variants of the Mu-Opioid Receptor: Existence, Distribution and Functional Characteristics. J Neurochem 2008;104:937-45.
9. Sedqi M, Roy S, Ramakrishnan S, Elde R, Loh HH. Complementary DNA Cloning of a Mu-Opioid Receptor From Rat Peritoneal Macrophages. Biochem Biophys Res Commun 1995;209:563-74.
10. Bondy B, Ackenheil M, Birzle W, Elbers R, Frohler M. Catecholamines and Their Receptors in Blood: Evidence for Alterations in Schizophrenia. Biol Psychiatry 1984;19:1377-93.
11. Bondy B, Ackenheil M, Elbers R, Frohler M. Binding of 3H-Spiperone to Human Lymphocytes: A Biological Marker in Schizophrenia? Psychiatry Res 1985;15:41-8.
12. Ilani T, Ben-Shachar D, Strous RD, Mazor M, Sheinkman A, Kotler M, et al. A Peripheral Marker for Schizophrenia: Increased Levels of D3 Dopamine Receptor mRNA in Blood Lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:625-8.
13. Kwak YT, Koo MS, Choi CH, Sunwoo I. Change of Dopamine Receptor Mrna Expression in Lymphocyte of Schizophrenic Patients. BMC Med Genet 2001;2:3.
14. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative Expression Software Tool (REST) for Group-wise Comparison and Statistical Analysis of Relative Expression Results in Real-Time PCR. Nucleic Acids Res 2002;30:e36.
15. Duaux E, Krebs MO, Loo H, Poirier MF. Genetic Vulnerability to Drug Abuse. Eur Psychiatry 2000;15:109-14.
16. Koch T, Schulz S, Schroder H, Wolf R, Raulf E, Hollt H. Carboxyl-Terminal Splicing of the Rat Mu Opioid Receptor Modulates Agonist-Mediated Internalization and Receptor Resensitization. J Biol Chem 1998;273:13652-7.
17. Wolf R, Koch T, Schulz S, Klutzny M, Schröder H, Raulf E, et al. Replacement of Threonine 394 by Alanine Facilitates Internalization and Resensitization of the Rat Mu Opioid Receptor. Mol Pharmacol 1999;55:263-8.
18. Abbadie C, Pan YX, Pasternak GW. Differential Distribution in Rat Brain of Mu Opioid Receptor Carboxy Terminal Splice Variants MOR-1C-Like and MOR-1-Like Immunoreactivity: Evidence for Region-Specific Processing. J Comp Neurol 2000;419:244-56.
19. Nagai Y, Ueno S, Saeki Y, Soga F, Hirano M, Yanagihara T. Decrease of the D3 Dopamine Receptor mRNA Expression in Lymphocytes From Patients with Parkinson's Disease. Neurology 1996;46:791-5.
20. Ferrero P, Rocca P, Eva C, Benna P, Rebaudengo N, Ravizza L, et al. An Analysis of Lymphocyte 3H-N-Methyl-Scopolamine Binding in Neurological Patients. Evidence of Altered Binding in Alzheimer's Disease. Brain 1991;114:1759-70.
21. Comings DE, Blum K. Reward Deficiency Syndrome: Genetic Aspects of Behavioral Disorders. Prog Brain Res 2000;126:325-41.
22. Kreek MJ. Methadone-Related Opioid Agonist Pharmacotherapy for Heroin Addiction. History, Recent Molecular and Neurochemical Research and Future in Mainstream Medicine. Ann N Y Acad Sci 2000;909:186-216.

Detection and Quantization of the Expression of Two mu-Opioid Receptor Splice Variants mRNA (hMOR-1A and hMOR-1O) in Peripheral Blood Lymphocytes of Long-Term Abstinent Former Opioid Addicts

N. Vousooghi, Pharm D*; F. Roushanzamir, PhD; A. Goodarzi, MD***; T. Sedaghati, MD****; M.R. Zarrindast, PhD*****; M.R. Noori Daloii, PhD******

*Resident of Pharmacology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti Medical University, Tehran, Iran.
**Professor of Pharmacology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti Medical University, Tehran, Iran.
***Resident of Neurology, Sina Cellular and Molecular, Tehran, Iran.
****Student of Medical, Sina Cellular and Molecular, Tehran, Iran.
*****Professor of Medical Pharmacology, Faculty of Medicine, Shahied Beheshti Medical University, Tehran, Iran.
******Professor of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Background and Objectives

The mu-Opioid receptor (MOR) exerts a critical role on effects of opiodis. The objective of this study is to find a peripheral bio-marker in addiction studies through quantization of the expression of two MOR splice variants mRNA (hMOR-1A and hMOR-1O) in peripheral blood lymphocytes (PBLs) of long-term abstinent former opioids addicts.

Methods

In this case-control study, case and control people were male and divided in two groups: people who gave up addiction to opioids (case) and healthy individuals without history of addiction (control). The mRNA expression in PBLs of participants was detected and measured by real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) using SYBR Green Dye.

Results

The hMOR-1A mRNA expression in PBLs of abstinent group was significantly reduced and reached to 0.33 of the control group ($p<0.001$). Similar results were obtained for the other splice variant with the mRNA expression of hMOR-1O in PBLs of abstinent group reaching to 0.38 of that of the control group ($p < 0.001$).

Conclusion

mRNA expression deficiency of two mu-opioid receptor splice variants, hMOR-1A and nMOR-1O, seams to be a risk factor making individuals vulnerable to drug addiction. Based on this analysis measuring the amount of mRNA expression of these two splice variants in PBLs can serve as a peripheral bio-marker for detecting people at risk.

Keywords: Lymphocytes; mRNA Expression Profiling; Analgesis, Opioids; addiction; mu-Opioid Receptor Splice Variants.

Corresponding Author: Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Phone No.: (+98)21-88 95 30 05; Email: nooridaloii@sina.tum.ac.ir
Received: 3/Sep, 2008 Accepted: 18/Sep, 2008