

اثر تزریق درون صفاقی بوپره‌نورفین بر تغییر در بیان ژن‌های اختصاصی در قطعه‌ی کمری نخاع رت‌های نر

حمیرا حاتمی نعمتی^۱، Ph.D.، حاتم احمدی^{۲*}، Ph.D.، رضا شهبازی ایلخچی^۳، M.Sc.، حافظ حسینی^۱، M.Sc.

۱- دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه زیست‌شناسی جانوری، تبریز، ایران
 ۲- دانشگاه فرهنگیان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: hahmadi@cfu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۶

چکیده

هدف: بوپره‌نورفین به‌عنوان مشتقات کالوئیدی مورفینی در درمان وابستگی به اوپیوئیدها اثربخش است. گزارش‌های متعددی در مورد اثرات مفید و غیرمفید بوپره‌نورفین در مطالعات قبلی آمده است.

مواد و روش‌ها: تغییرات در بیان ژن‌های اختصاصی پروتئین کیناز B (AKT)، آنزیم گلیکوژن سنتاز کیناز ۳ (GSK3)، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) و پروتئین اتصال‌ی عنصر پاسخی (CREB) CAMP، در نتیجه تزریق درون صفاقی دوزهای ۱۰ و ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوپره‌نورفین در طی دوره‌ی ۱۴ روزه در قطعه‌ی کمری نخاع موش‌های صحرایی نر بررسی شده است.

نتایج: تزریق درون صفاقی دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوپره‌نورفین در طی دوره ۱۴ روزه، موجب افزایش بیان ژن‌های AKT و CREB در قطعه‌ی کمری نخاع موش‌های صحرایی نر شد ($p < 0.05$)، در صورتی که دوزهای اعمال شده این دارو، تغییری معنی‌دار در بیان ژن‌های GSK3 و BDNF در این ناحیه ایجاد نکرد.

نتیجه‌گیری: با بررسی نتایج حاصل از این مطالعه با مکانیسم‌های پیشنهادی ارائه شده توسط محققین قبلی، احتمال می‌رود که تجویز دوز بالای بوپره‌نورفین در دوره‌ی ۱۴ روزه، از مسیر سیگنالینگ PI3/Akt/CREB/BDNF، موجب افزایش بیان ژن‌های AKT و CREB در قطعه‌ی کمری نخاع موش صحرایی شده و از افزایش بیان ژن نامطلوب GSK3 جلوگیری کرده است. هم‌چنین دوزهای به‌کار رفته دارو قادر به تغییر در بیان ژن BDNF نشد.

واژگان کلیدی: بوپره‌نورفین، بیان ژن‌های اختصاصی، نخاع

مقدمه

اعتیاد به مواد مخدر نوعی اختلال مزمن عود کننده است که منجر به بی‌اختیاری در جست‌وجو و مصرف دارو، ازدست دادن کنترل در مصرف محدود آن و ظهور حالت‌های عاطفی منفی مانند بی‌نظمی، اضطراب و تحریک‌پذیری که انعکاسی از سندرم ترک به‌هنگام عدم دسترسی به دارو است می‌شود (۱). از علل مهم اعتیاد روانی افراد به مواد مخدر مانند کوکائین و آمفتامین-ها، افزایش دوپامین در هسته‌ی اکومینس و تحریک مسیر پاداش مغزی می‌باشد (۲).

بوپره‌نورفین پودر سفیدرنگ از مشتقات الکلوئیدی مورفینی بوده و به‌عنوان آگونیست نسبی گیرنده‌ی مو و آنتاگونیست قوی گیرنده‌ی کاپا مطرح است (۳). این دارو در درمان وابستگی به اویپوئیدها اثربخش است (۴). قطع مصرف بوپره‌نورفین، به‌مراتب خطر و وابستگی به داروی کمتری نسبت به متادون ایجاد می‌کند (۵). پس از مصرف این ماده، برای مدتی و به‌میزان کم، علائم ترک در حیوانات آزمایشگاهی مانند پریمات‌ها، موش صحرایی و سگ گزارش شده است که نشان دهنده‌ی اعتیاد خفیف نسبت به این دارو است (۶). بوپره‌نورفین در کنترل درد از مورفین بهتر عمل می‌کند که نشان‌دهنده‌ی اثر مطلوب ضد درد این دارو است (۳). با این وجود، مصرف مزمن بوپره‌نورفین در طول دوره‌ی بارداری، ناهنجاری عصبی رفتاری مانند علائم افسردگی را در مادران و فرزندان آن‌ها ایجاد می‌کند (۷).

آنزیم پروتئین کیناز بی (PKB) که کیناز سرین-ترئونین بوده و به‌نام AKT نیز شناخته می‌شود، ۲۵ سال پیش کشف شد و مورد توجه ده‌ها هزار مطالعه در زمینه‌های مختلف زیست‌شناسی و پزشکی بوده است (۸). این آنزیم در جریان سیگنالینگ فسفواینوزیتید ۳-کیناز (PI3K) ایجاد می‌شود (۸). مطالعات ژنتیکی بیان‌گر نقش فیزیولوژیکی AKT، تقریباً در تمام دستگاه‌های بدن موش و انسان است (۸). AKT دارای سوبستراهای متعددی است و از مسیرهای مختلف معروف به‌بقای سلولی، مانع از آپوپتوزیس سلولی می‌شود (۹). این آنزیم نقش مرکزی و متنوع در پاسخ انواع سلول‌ها و بافت‌ها به هورمون‌ها، فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها و عوامل نوروتروفیک ایفا می‌کند (۱۰).

آنزیم گلیکوژن سنتاز کیناز ۳ (GSK3) که به‌دو فرم GSK3a و GSK3b وجود دارد، نقش اصلی در غیرفعال کردن گلیکوژن سنتاز دارد (۱۱). این آنزیم اولین سوبسترای شناسایی شده AKT است. فسفوریلاسیون GSK3 توسط آنزیم AKT، فعالیت آن را مهار می‌کند (۱۲). GSK3 تحت تاثیر دوپامین قرار دارد و از طریق فاکتورهای مختلف، در مهار رشد اکسونی، پیش‌برد آپوپتوزیس سلولی و بروز بیماری‌هایی هم‌چون دیابت نوع ۲، آلزایمر، سرطان و بیماری دوقطبی نقش دارد (۱۳). به‌دلیل نقشی که آنزیم‌های AKT و GSK3 در مسیر پاسخ سلولی به داروهای مورد استفاده در اختلالات روانی و نیز داروهای اعتیادآور، به‌ویژه در هسته اکومینس دارند، تداخل برهم‌کنش این آنزیم‌ها توجه محققین را به‌خود جلب کرده‌است (۱۴، ۱۵).

فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) در بقا و محافظت از نورون‌ها و نیز انعطاف‌پذیری سیناپسی نقش دارد (۱۶). مطالعات نشان داده که در میان نوروتروفین‌های مختلف، BDNF از اهمیت خاصی برخوردار است. BDNF موجب تعدیل فعالیت سیستم دوپامینی می‌شود (۱۷). این فاکتور در اختلالات روانپزشکی از جمله افسردگی و نیز تعدیل اثر داروهای اعتیادآور نقش دارد (۱۷، ۱۸). بعد از ترک اپیات‌ها، به‌تدریج سطح سرمی BDNF افزایش می‌یابد و رشد شاخه‌های دندریتی نورون‌ها افزایش می‌یابد (۱۹).

پروتئین اتصال‌ی عنصر پاسخی (CREB) CAMP، فاکتور رونویسی است که از طریق تنظیم بیان ژن‌هایی مانند BDNF، موجب بقا، محافظت و انعطاف‌پذیری نورونی می‌شود (۲۰). BDNF و سروتونین از عوامل موثر در سیگنالینگ پایین دست CREB هستند (۲۱). هم‌چنین CREB می‌تواند از طریق فسفوریلاسیون PKA، موجب تنظیم آغاز رونویسی ژن‌های نوروتروفین‌ها و انتقال‌دهنده‌های عصبی شود (۲۲).

آسیب‌های نخاعی غالباً منجر به اختلال در عمل‌کرد احساس و حرکات و از بین رفتن دایمی عمل‌کرد اسفنکترها در پایین‌تر از سطح آسیب می‌شود (۲۳). تمرکز اولیه بیش‌تر مطالعات، بر روی درک مکانیسم‌های عصبی داروهای اعتیادآور بر بخش‌های مختلف مغز است، درحالی‌که نخاع نیز به دلیل ارتباط آناتومیک و عمل‌کردی با مغز، می‌تواند آسیب‌های متعددی را در سو مصرف داروها داشته باشد (۲۴). مهارکننده‌های GSK3 می‌توانند موجب بازسازی سلول‌ها و بهبود عمل‌کرد، در رت‌های با آسیب قطعه کم‌ری نخاع می‌شود (۲۵).

یکی از مسیرهای سیگنالینگ اصلی در اثرات محافظتی برخی داروها بر سلول‌های مغزی، مسیر PI3/Akt/CREB/BDNF است (۲۶). فعال‌سازی یا فسفوریلاسیون PI3K و به دنبال آن فسفوریلاسیون Akt، باعث فعال شدن یا فسفوریلاسیون CREB می‌شود که منجر به سنتز BDNF می‌شود (۲۷). با توجه به ضرورت مکانیسم‌های سلولی درگیر در اعتیاد به منظور درمان آن، در این مطالعه تغییرات میزان بیان ژن‌های AKT، GSK3b، BDNF و CREB طی سو مصرف بوپره‌نورفین به مدت ۱۴ روز در قطعه‌ی کم‌ری نخاع رت‌های نر بررسی شده است. به این امید که نتایج حاصل از مطالعه کنونی اطلاعات مفیدی در مورد سمیت بوپره‌نورفین و مکانیسم‌های تاثیر آن بر دستگاه عصبی مرکزی در اختیار محققین قرار دهد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۲۸ رت نر نژاد ویستار در محدوده وزنی 200 ± 50 گرم استفاده شد. به منظور کاهش استرس و عادت به شرایط آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری در دانشکده طبیعی دانشگاه تبریز، جانوران به مدت دو هفته در شرایط دمای ثابت محیطی (22 ± 2 °C درجه سانتی‌گراد) و تنظیم نور با دوره‌ی تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته (روشنایی از ساعت ۷ صبح) نگهداری می‌شدند. هنگام کار با رت‌ها، موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت می‌شد. علت انتخاب موش‌های نر، ساده‌تر بودن سیستم هورمونی و نیز تداخل کمتر هورمون‌های جنسی با داروها بود. در این تحقیق از رهنمودهای مربوط به استانداردهای اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی پیروی شده است (۲۸).

دستگاه‌های مورد استفاده در این پژوهش عبارت بودند از: گرایندر، سانتریفیوژ یخچال‌دار، حمام خشک (Dry Bath) ساخت شرکت زیگما، نانودراپ (Nano drop) ساخت شرکت Terno و ترموسایکلر (Thermal cycler). مواد مورد استفاده در پژوهش عبارت بود از: بوپره‌نورفین، محلول ترایزول، کلروفرم، ایزوپروپانول، اتانول ۷۰-۷۵ درصد، ژل آگارز ۱ درصد.

مقدار ۱۰ و ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم از ماده‌ی بوپره‌نورفین به صورت درون صفاقی به مدت ۱۴ روز تزریق می‌شد. الگوی حجم و مدت زمان تزریق بر پایه تحقیقات قبلی بوده است (۲۹).

۴ گروه آزمایشی ۷ تایی انتخاب شد. گروه کنترل که به این گروه هیچ‌گونه تیماری اعمال نشد. گروه شاهد (sham) که ۱ میکرولیتر سالین را در هر نوبت ۱ دقیقه‌ای به مدت ۱۴ روز دریافت کردند. دو گروه بوپره‌نورفین، که بوپره‌نورفین با دوزهای ۶ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به مدت ۱۴ روز متوالی دریافت کردند.

سنجش آنزیمی: بعد از اتمام دوره ۱۴ روزه‌ی تزریق دارو و معدوم کردن رت‌ها با استفاده از کلروفرم، نمونه قطعه کم‌ری نخاع رت‌ها در حفاصل ۶-۸ میلی‌متر بالاتر و پایین‌تر از قطعه کم‌ری جدا و در تیوب‌های استریل ۱/۵ میلی‌لیتری DEPC قرار داده شد (۳۰). نمونه‌ها جهت استخراج RNA به سرعت در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ریز شد. برای استخراج RNA، حدود ۵۰۰ میلی‌گرم از بافت نخاع جدا شد و با ۷۰۰ میکرولیتر از محلول ترایزول در دستگاه گرانیدر هموژنیزه شد. بعد از اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم، بافت هموژنیزه شده به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه روی یخ انکوباته شد. میکروتیوب چند بار و هربار

به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در دور ۱۲۰۰۰ rpm با دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار سانتریفیوژ شد. در نهایت، رسوب حاوی RNA با استفاده از دستگاه حمام خشک در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت، تا در آب حل شود. سپس غلظت نمونه با استفاده از دستگاه نانو دراپ (Nano drop) خوانده شد. برای بررسی کیفیت و غلظت RNA استخراج شده از دو روش اسپکتروفتومتری با دستگاه نانودراپ و ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. بعد از مشخص شدن غلظت و خلوص RNAهای استخراج شده، اقدام به ساخت cDNA با استفاده از کیت شرکت تاکارا (TAKARA) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شد (۳۱). سنتز رشته cDNA به کمک پرایمر اختصاصی ژن‌ها انجام شد که به صورت اختصاصی در نقاط مختلفی به رشته RNA اتصال می‌یابد. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم‌افزار oligo7 طراحی شده و توسط شرکت Roche سنتز شد (۳۲). لیست پرایمرها و توالی آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است. در تکنیک Real time PCR به منظور بررسی سطح بیان ژن‌های AKT، GSK3b، BDNF و CREB و هم‌چنین ارتباط سطح بیان این ژن‌ها با مصرف بوپره‌نورفین، ارزیابی نمونه‌های بافتی مورد آزمایش با استفاده از دستگاه Light Cycler 96 و رنگ SYBR Green I مورد بررسی قرار می‌گرفت (۳۳). برای حصول اطمینان از کارایی پرایمرها برای ژن‌های مورد نظر با استفاده از cDNA، واکنش Real time PCR با دو تکرار انجام گرفت. سیکل‌های زمانی Real-time برای ژن‌های مورد نظر براساس جدول ۲ انجام شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده ژن‌های AKT، GSK3b، BDNF و CREB

طول قطعه تکثیر	توالی پرایمر	نوع پرایمر	نام ژن
85bp	GGCCACGGATACCATGAACGA TGAGGCCGTTCCCTGTAGCCA	Forward Reverse	AKT
85bp	GTGCAGCAGCCTTCAGCTTTT TCAGGACCCTGTCCAGGAGTT	Forward Reverse	GSK3
85bp	AAACCATAACCCCGCACACTC AGCCTTCATGCAACCGAAGTA	Forward Reverse	BDNF
85bp	ATGGA CTCTGGAGCAGACAAC ATCTGTGGCTGGGCTTGA ACT	Forward Reverse	CREB

جدول ۲: شرایط دمایی و زمانی Real-Time PCR ژن‌های مورد مطالعه AKT، GSK3b، BDNF و CREB

مرحله	زمان	دما
Denaturation	۱۰ دقیقه	۹۵ درجه سانتی‌گراد
Annealing & Extension	۱۰ ثانیه	۹۵ درجه سانتی‌گراد
	۶۰ ثانیه	۶۰ درجه سانتی‌گراد به تعداد ۴۵ چرخه

آنالیز تغییرات میزان بیان ژن‌های مورد بررسی در نمونه‌های مورد نظر، بین گروه‌های مختلف به کمک آزمون ANOVA یک‌طرفه با استفاده از نرم‌افزار SPSS-16 صورت گرفت. برای معنی‌دار بودن تفاوت گروه‌ها، مقدار معنی‌دار $p < 0.05$ مورد ملاک قرار گرفت. نمودارها از طریق نرم افزار Excel ۲۰۱۰ رسم شد.

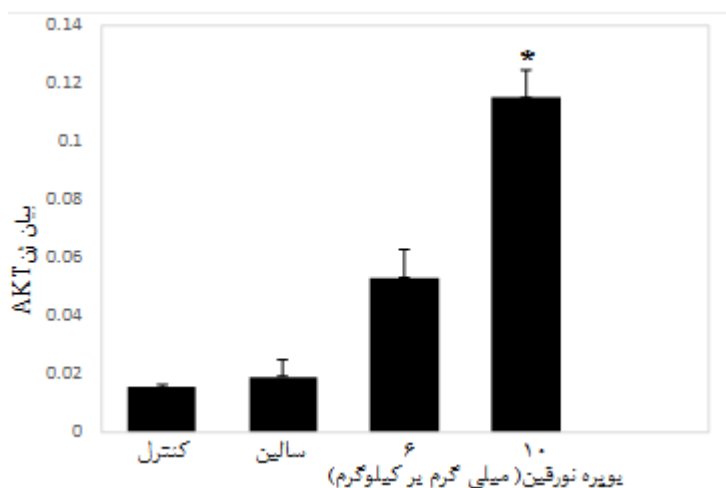
نتایج

تاثیر دوزهای ۱۰ و ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوپره‌نورفین در دوره‌ی مصرفی ۱۴ روزه بر بیان ژن AKT در قطعه‌ی کمری نخاع موش‌های صحرائی نر

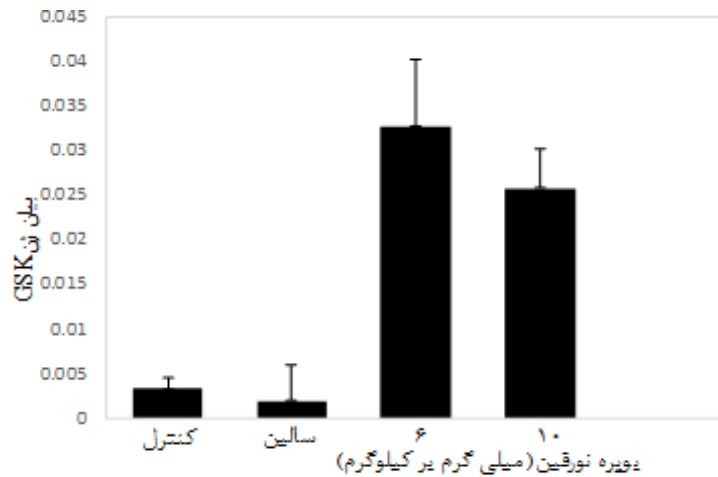
تحلیل واریانس یک‌طرفه و post hoc Tukey نشان داد که تزریق درون صفاقی دوز بالای بوپره‌نورفین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به مدت ۱۴ روز متوالی، موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن AKT در قطعه‌ی کمری نخاع رت‌ها نسبت به گروه کنترل شد (نمودار ۱، $p < 0.05$)، در صورتی‌که دوز ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم آن به مدت ۱۴ روز، اثری بر بیان ژن مربوطه نداشت. نتیجه مطالعه بیان گر اثر افزایشی تجویز بوپره‌نورفین بر بیان ژن مفید AKT است.

تاثیر دوزهای ۱۰ و ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوپره‌نورفین در دوره‌ی مصرفی ۱۴ روزه بر بیان ژن GSK3 در قطعه‌ی کمری نخاع موش‌های صحرائی نر

تحلیل واریانس یک‌طرفه و post hoc Tukey نشان داد که تزریق درون صفاقی دوزهای ۱۰ و ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوپره‌نورفین به مدت ۱۴ روز متوالی تغییری معنی‌دار بر بیان ژن GSK3 در قطعه‌ی کمری نخاع رت‌ها نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرد (نمودار ۲، $p > 0.05$). این بخش از نتایج مطالعه، بیان‌گر عدم تاثیر دوزهای مصرفی بوپره‌نورفین در مدت مصرف شده بر بیان ژن نامناسب GSK3 در قطعه کمری نخاع رت‌ها است.



نمودار ۱: تاثیر درون صفاقی دوزهای ۱۰ و ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوپره‌نورفین به مدت ۱۴ روز متوالی بر بیان ژن AKT در قطعه‌ی کمری نخاع، با سطح تکرار دو واکنش Real time PCR. داده‌ها به صورت میانگین \pm SEM بیان شده‌اند. (علامت * بیانگر $p < 0.05$ است).



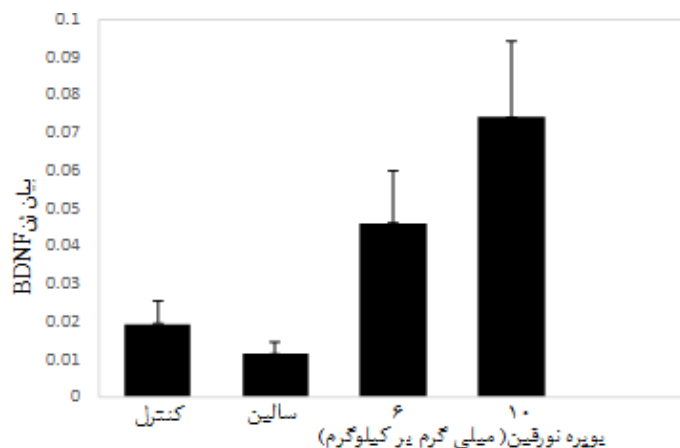
نمودار ۲: بررسی اثر تزریق درون صفاقی دوزهای ۱۰ و ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوپره‌نورفین به مدت ۱۴ روز متوالی بر میزان بیان ژن GSK3 در ناحیه کمری نخاع موش‌های صحرائی نر ($p > 0.05$)، با سطح تکرار دو واکنش Real time PCR. داده‌ها به صورت میانگین \pm SEM بیان شده‌اند.

تاثیر دوزهای ۱۰ و ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوپره‌نورفین به مدت ۱۴ روز بر بیان ژن BDNF در قطعه‌ی کمری نخاع موش‌های صحرائی نر

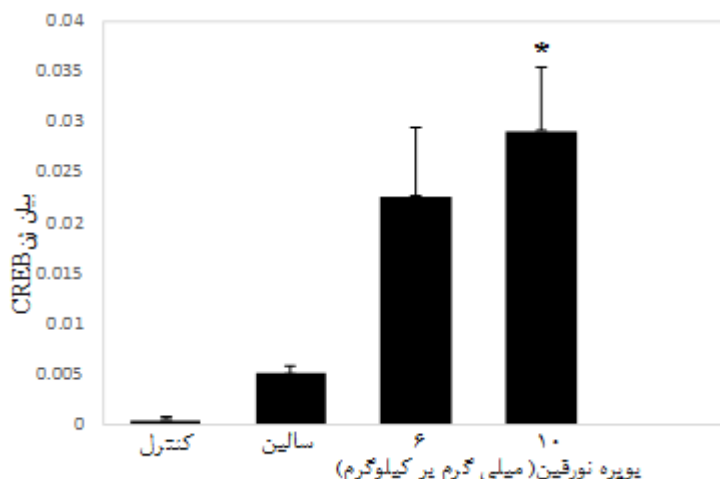
تحلیل واریانس یک‌طرفه و post hoc Tukey نشان داد که تزریق درون صفاقی دوزهای ۱۰ و ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوپره‌نورفین به مدت ۱۴ روز متوالی اثری معنی‌دار بر بیان ژن BDNF در قطعه‌ی کمری نخاع رت‌ها نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرد (نمودار ۳، $p > 0.05$). این بخش از نتایج مطالعه نشان داد که دوزهای بوپره‌نورفین اعمال شده به مدت ۱۴ روز متوالی قادر به تغییر در بیان ژن مفید BDNF در قطعه کمری نخاع نیست.

تاثیر دوزهای ۱۰ و ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوپره‌نورفین به مدت ۱۴ روز بر بیان ژن CREB در قطعه‌ی کمری نخاع موش‌های صحرائی نر

تحلیل واریانس یک‌طرفه و post hoc Tukey نشان داد که تزریق درون صفاقی دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوپره‌نورفین به مدت ۱۴ روز متوالی، موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن CREB (نمودار ۴، $p < 0.05$) در قطعه‌ی کمری نخاع رت‌ها نسبت به گروه کنترل شد، در صورتی‌که دوز ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم آن به مدت ۱۴ روز اثری بر بیان ژن مربوطه نداشت. نتیجه مطالعه بیان‌گر اثر افزایشی تجویز بوپره‌نورفین بر بیان ژن مفید CREB است.



نمودار ۳: تاثیر دوزهای ۱۰ و ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوپره‌نورفین به مدت ۱۴ روز متوالی بر بیان ژن BDNF در قطعه‌ی کمری نخاع ($p > 0.05$)، با سطح تکرار دو واکنش Real time PCR. داده‌ها به صورت میانگین \pm SEM بیان شده‌اند.



نمودار ۴: تاثیر دوزهای ۱۰ و ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوپره‌نورفین به مدت ۱۴ روز متوالی بر میزان بیان ژن CREB در ناحیه کمری نخاع موش‌های صحرایی نر، با سطح تکرار دو واکنش Real time PCR. داده‌ها به صورت میانگین \pm SEM بیان شده‌اند. (علامت * بیان گر $p < 0.05$ است).

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تزریق درون صفاقی بوپره‌نورفین در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۱۴ روز متوالی، قادر به تغییر در بیان ژن‌های AKT و CREB بوده، در صورتی که دوزهای مصرفی این دارو در مدت ۱۴ روز متوالی قادر به تغییر معنی‌دار در بیان ژن‌های BDNF و GSK3 در قطعه‌ی کمری نخاع موش‌های صحرایی نر نیست.

تزریق مواد افیونی می‌تواند ترشح دوپامین در هسته‌ی اکومبیس و جسم مخطط را افزایش دهد (۳۴). بوپره‌نورفین غلظت خارج سلولی دوپامین را در هسته اکومبیس افزایش می‌دهد (۳۵). ممکن است فعال‌سازی گیرنده D1 دوپامینی در مراکز مغزی، از مسیر سیگنالینگ AKT/GSK3، موجب افزایش بیان ژن AKT شود (۳۶). هم‌چنین برخی محققین، مکانیسم فعال‌سازی AKT توسط بوپره‌نورفین را به تحریک گیرنده‌های شبه‌افیونی نسبت داده‌اند (۳۷).

ممکن است تزریق درون صفاقی دوز بالای بوپره‌نورفین در این مطالعه، با افزایش بیان ژن AKT و CREB در قطعه‌ی کمری نخاع رت‌ها، از بروز بیان ژن GSK3 در این ناحیه جلوگیری کرده باشد. گزارش‌های متناقضی در مورد اثر داروهای اعتیادآور بر بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه آمده است. گزارش شده که فعال‌سازی ژن GSK3 می‌تواند موجب بروز برخی از وقایع عصبی مانند تخریب عصبی و اختلالات شناختی شود (۱۱). بیان ژن GSK3 در مصرف داروهای اعتیادآور افزایش می‌یابد (۳۸). هم‌چنین گزارش شده که تزریق درون صفاقی دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم متامفتامین به‌عنوان داروی اعتیادآور به مدت ۲۸ روز، موجب کاهش مقدار آنزیم GSK3 هیپوکامپ شده، در صورتی که میزان آنزیم AKT و نیز مقدار BDNF در این بخش از مغز را افزایش می‌دهد (۳۹). از طرفی فعال‌سازی AKT در سلول‌های مغزی، می‌تواند فعالیت GSK3 را مهار کرده و از تخریب سلول‌های عصبی محافظت کند و در بازسازی این سلول‌ها نقش دارد (۱۱). فعال‌سازی آنزیم AKT در سلول‌های مغزی با مهار آنزیم GSK3، می‌تواند از تخریب نورونی محافظت کند (۱۱). احتمال می‌رود که دوز بالای مصرفی بوپره‌نورفین در این مطالعه موجب افزایش بیان ژن AKT در قطعه‌ی کمری نخاع شده که افزایش بیان ژن AKT در این ناحیه از دستگاه عصبی مرکزی، از افزایش بیان ژن نامناسب GSK3 جلوگیری کرده است.

هم‌چنین در مطالعات قبلی، نتایج متناقضی در مورد اثر داروهای اعتیادآور بر بیان ژن‌های BDNF و CREB گزارش شده است. در برخی مطالعات، اثر مصرف داروهای اعتیادآور بر کاهش بیان ژن مفید BDNF آمده است. مصرف هیروئین موجب

کاهش سطح سرمی BDNF می‌شود (۱۹). بعد از ترک کوکائین، مقدار این آنزیم در هسته اکومبسنس، آمیگدال و تگمنتوم شکمی افزایش می‌یابد (۴۰). علاوه بر این، گزارش شده که قرار گرفتن موش‌های صحرایی باردار در معرض بوپرنورفین، از روز ۷ حاملگی به بعد و به مدت ۱۴ روز، باعث ایجاد علائم شبه‌افسردگی، القا استرس اکسیداتیو و کاهش بیان BDNF و سروتونین و نیز کاهش سیگنالینگ CREB در زاده‌های آن‌ها بعد از تولد می‌شود (۷، ۱۷). در مغز رت‌هایی که بوپرنورفین به آن‌ها تزریق شده بود، میزان BDNF و CREB و فعالیت PKA کاهش می‌یابد (۷). عدم تاثیر دوزهای اعمال شده بوپرنورفین در این مطالعه، بر افزایش بیان ژن BDNF در قطعه‌ی کمری نخاع رت‌ها ممکن است ناشی از تحریک کم‌تر گیرنده‌های شبه افیونی توسط دوزهای تجویز شده بوپرنورفین در طی ۱۴ روز مصرفی باشد، که این نتیجه‌گیری در توسط محققین قبلی هم بیان شده است (۳۷). هم‌سویی بخشی از نتایج این مطالعه با نتایج برخی از محققین قبلی و در عین حال، ناهم‌سویی نتایج مطالعه حاضر با برخی از گزارش‌های قبلی، ممکن است به نوع تیمار دارو، مدت زمان تجویز آن، حیوان مورد مطالعه و بافت مورد بررسی این فاکتورها بستگی داشته باشد. به نظر می‌رسد شیوه تجویز بوپرنورفین در طی ۱۴ روز متوالی در این مطالعه با تاثیر مثبت بر مکانیسم سلولی واسطه شده با BDNF، موجب فعال شدن PI3K و آن هم موجب فعال شدن AKT می‌شود (۴۱). فعال‌سازی یا فسفوریلاسیون PI3K و به دنبال آن فسفوریلاسیون Akt، باعث فعال شدن یا فسفوریلاسیون CREB می‌شود که منجر به سنتز BDNF می‌شود (۲۷). بررسی نتایج حاصل از این مطالعه با مکانیسم‌های پیشنهادی ارائه شده توسط محققین قبلی، احتمال می‌رود که دوز مصرفی بوپرنورفین در این مطالعه در دوره‌ی ۱۴ روزه‌ی مصرفی آن، از مسیر سیگنالینگ PI3/Akt/CREB/BDNF (۲۶)، موجب افزایش بیان ژن‌های AKT و CREB شده و از افزایش بیان ژن نامطلوب GSK3 در قطعه‌ی کمری نخاع موش صحرایی جلوگیری کرده است، اگرچه افزایشی در بیان ژن‌های BDNF در این تحقیق مشاهده نشد؟ در مجموع نتایج این مطالعه موید گزارش‌های محققین قبلی مبنی بر این موضوع کلیدی است که مسیرهای سیگنالینگ CREB/BDNF و نیز AKT/GSK3 نقشی کلیدی در تعدیل سمیت عصبی بوپرنورفین ایفا می‌کند (۴۲).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که دوز بالای این دارو موجب افزایش بیان ژن‌های مناسب AKT و CREB در قطعه‌ی کمری نخاع موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار شد و از افزایش بیان ژن نامناسب GSK3 جلوگیری کرد. اگرچه بر پایه مکانیسم‌های پیشنهادی توسط محققین قبلی، می‌بایستی افزایش در بیان ژن‌های AKT و CREB، موجب افزایش بیان ژن BDNF در این ناحیه نیز می‌شد. عدم تغییر در بیان ژن BDNF در این مطالعه، ممکن است ناشی از دوز به کار رفته دارو یا قطعه کمری نخاع مورد بررسی آنزیم‌ها در این مطالعه باشد. از جمله محدودیت‌های مطالعه حاضر، عدم سنجش خود آنزیم‌های مذکور است، که بررسی و سنجش این آنزیم‌ها در مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز بابت تامین اعتبار لازم قدردانی می‌شد.

منابع

1. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology*. 2010; 35(1): 217–238.

2. Sabrini S, Russell B, Wang G, Lin J, et al. Methamphetamine induces neuronal death: Evidence from rodent studies. *Neurotoxicity*. 2020; 77:20-28.
3. Gowing L, Ali R, White JM, Mbewe D. Buprenorphine for managing opioid withdrawal. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017(2): 1-95.
4. Hong YP, Lee HC, Kim HT. Treadmill exercise after social isolation increases the levels of NGF, BDNF, and synapsin I to induce survival of neurons in the hippocampus, and improves depression-like behavior. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*. 2015; 19(1): 11–18.
5. Whelan PJ, Remski K. Buprenorphine vs methadone treatment: A review of evidence in both developed and developing worlds. *Journal of Neurosciences in Rural Practice*. 2012; 3(1): 45–50.
6. Kletter GB, Padmanabhan V, Beitins IZ, Marshall JC, et al. Acute effects of estradiol infusion and naloxone on luteinizing hormone secretion in pubertal boys. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1997; 82(12): 4010–4014.
7. Wu C, Hung C, Lin S, Wang Y, et al. Treadmill exercise alleviated prenatal buprenorphine exposure- induced depression in rats. *Neurochemistry International*. 2017; 110: 91-100.
8. Brendan DM, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*. 2017 20; 169 (3): 381–405.
9. Ahmadi J, Razeghian Jahromi L. Comparing the effect of buprenorphine and methadone in the reduction of methamphetamine craving: a randomized clinical trial. *Journal of Molecular Histology*. 2017;18(1):1-8.
10. Dummler B, Hemmings BA. Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochemical Society Transactions*. 2007; 35(Pt 2):231–235.
11. Endo H, Nito C, Kamada H, Yu F, et al. Akt/GSK3beta survival signaling is involved in acute brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke*. 2006; 37(8): 2140-46.
12. Miller JS, Barr JL, Harper LJ, Poole RL, et al. The GSK3 signaling pathway is activated by cocaine and is critical for cocaine conditioned reward in mice. *PIOS ONE*. 2014; 9(2): 10-26.
13. Motaghinejad M, Motevalian M, Fatima S, Beiranvand T, et al. Topiramate via NMDA, AMPA/kainate, GABAA and Alpha2 receptors and by modulation of CREB/BDNF and Akt/GSK3 signaling pathway exerts neuroprotective effects against methylphenidate-induced neurotoxicity in rats. *Journal of Neural Transplantation*. 2017; 124(3): 1369-1387.
14. Hermida MA, Dinesh Kumar J, Leslie Nick R. GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. *Advances in biological regulation*. 2017; 65: 5-15.
15. Mehrafza S, Kermanshahi S, Mostafidi S, Motaghinejad M, et al. Pharmacological evidence for lithium-induced neuroprotection against methamphetamine-induced neurodegeneration via Akt-1/GSK3 and CREB-BDNF signaling pathways. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2019; 22(8): 856-865.
16. Di Carlo P, Punzi G, Ursini G. Brain-derived neurotrophic factor and schizophrenia. *Psychiatric genetics*. 2019; 29 (5) :200-210.
17. Crist RC, Reiner BC, Berrettini WH. A review of opioid addiction genetics. *Current opinion in psychology*. 2019; 27:31-35.
18. Hung CJ, Wu CC, Chen WY, Chang CY, et al. Depression-like effect of prenatal buprenorphine exposure in rats. *PLOS ONE*. 2013; 8(12): 1-11.
19. Angelucci F, Ricci V, Pomponi M. Chronic heroin and cocaine abuse is associated with decreased serum concentrations of the nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *International Journal of Neuro-psychopharmacology*. 2007; 21(8): 820-825.

20. Charna D, Ueli S, Urs A. The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. *Annual review of physiology*. 2010; 72(1): 517-549.
21. Liu X, Guo H, Sayed M.D, Lu Y, et al. cAMP/PKA/CREB/GLT1 signaling involved in the antidepressant-like effects of phosphodiesterase 4D inhibitor (GEBR-7b) in rats. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2016; 12: 219-227.
22. Réus GZ, Stringari RB, Ribeiro KF, Ferraro AK, et al. Ketamine plus imipramine treatment induces antidepressant-like behavior and increases CREB and BDNF protein levels and PKA and PKC phosphorylation in rat brain. *Behavioral brain*. 2011; 221(1):166-171.
23. Ohtake Y, Li S. Molecular mechanisms of scar-sourced axon growth inhibitors. *Brain Research*. 2015; 1619: 22-35.
24. Asser A, Taba P. Psychostimulants and movement disorders. *Frontiers in neurology*. 2015; 6(75):1-13.
25. Lei F, He W, Tian X, Zhou O, et al. GSK-3 Inhibitor Promotes Neuronal Cell Regeneration and Functional Recovery in a Rat Model of Spinal Cord Injury. *Biomed Research International*. 2019; 4: 1-9.
26. Srivastava P, Dhuriya YK, Kumar V, Srivastava A, et al. PI3K/Akt/GSK3beta induced CREB activation ameliorates arsenic mediated alterations in NMDA receptors and associated signaling in rat hippocampus: Neuroprotective role of curcumin. *Neuro-toxicology*. 2018; 67:190-205.
27. Meffre D, Massaad C, Grenier J. Lithium chloride stimulates PLP and MBP expression in oligodendrocytes via Wnt/beta-catenin and Akt/CREB pathways. *Neuroscience*. 2015; 284: 962-71.
28. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983; 16(2):109-110.
29. Gihson AE, Doran CM, Bell JR, Ryan A, et al. Comparison of buprenorphine treatment in clinic and primary care Settings: a randomized trial. *The Medical Journal of Australasia*. 2003; 179 (10): 558-564.
30. Ferrucci M, Pasquali L, Paparelli A, Ruggieri S, et al. Pathways of Methamphetamine Toxicity. *Annals of The New York Academy of Science*. 2008; 1139: 177-85.
31. Kuba Y, Kyan H, Arakaki E, Takara T, et al. Molecular Epidemiological Study of Mumps Epidemics of 2015 in Okinawa. *The Journal of Infectious Diseases*. 2017; 70(3):329-332.
32. Nolan T, Hands R.E, Bustin S.A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*. 2006; 1(3): 1559-1582.
33. Safdar M, Junejo Y. Development and validation of fast duplex real-time PCR assays based on SYBER Green fluorescence for detection of bovine and poultry origins in feedstuffs. *Food Chemistry*. 2015; 15(173): 660-4.
34. Yorgason JT, Hedges DM, Obray JD, Jang EY, et al. Methamphetamine increases dopamine release in the nucleus accumbens through calcium-dependent processes. *Psychopharmacology*. 2020; 237(5): 1317-1330.
35. Nantwi KD, Hicks S, Bradley D, Schoener EP. Interactions of buprenorphine and selective dopamine receptor antagonists in the rat nucleus accumbens. *General Pharmacology*. 1998; 31(3): 425-429.
36. Thrash B, Karuppagounder SS, Uthayathas S, Suppiramaniam V, et al. Neurotoxic effects of methamphetamine. *Neurochemistry Research*. 2010; 35:171-9.
37. Lutfy K, Eitan S, Bryant CD, Yang YC, et al. Buprenorphine-induced antinociception is mediated by mu-opioid receptors and compromised by concomitant activation of opioid receptor-like receptors. *Journal of Neuroscience*. 2003; 23(32): 10331-7.

38. Etaee F, Rezvani-Kamran A, Taheri M, Omidi G, et al. Comparing the Antinociceptive Effects of Methamphetamine, Buprenorphine, or Both After Chronic Treatment and Withdrawal in Male Rats. *Basic and Clinical Neuroscience*. 2019; 10(4), 313-322.
39. Xu C, wang J, Wu P, Xue Y, et al. glycogen synthase kinase 3 b in the nucleous accumbens core is critical for methamphetamine-induced behavioral sensitization. *Journal of Neurochemistry*. 2011; 118 (1): 126-39.
40. Grimm JW, Lu L, Hayashi T, Hope BT, et al. Time dependent increases in brain-derived neurotrophic factor protein levels within the mesolimbic dopamine system after withdrawal from cocaine: implications for incubation of cocaine craving. *The Journal of Neuroscience*. 2003; 23(3): 742-747.
41. Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacological Reviews*. 2011; 63(1): 182-217.
42. Keshavarzi S, Kermanshahi S, Karami L, Motaghinejad M, et al. Protective role of metformin against methamphetamine induced anxiety, depression, cognition impairment and neurodegeneration in rat: The role of CREB/BDNF and Akt/GSK3 signaling pathways. *Neurotoxicology*. 2019; 72:74-84.

The effect of intraperitoneal injection of buprenorphine on alterations in the expression of specific genes in the lumbar spinal cord of male rats

Hatami Nemati H¹ Ph.D., Ahmadi H² Ph.D., Shahbazi Iekchi R¹ M.Sc., Hosieni H¹ M.Sc.

1. Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2. Department of Basic Sciences, Faculty of Basic science, University of Farhangian, Tehran, Iran

* Email corresponding author: hahmadi@cfu.ac.ir

Received: 25 Jan. 2021

Accepted: 11 Jul. 2021

Abstract

Aim: Buprenorphine as an alkaloid derivative of morphine is effective in the treatment of opioid dependence. Numerous reports on the beneficial and non-beneficial effects of buprenorphine have been reported in previous studies.

Material and Methods: Alterations in the specific genes of protein kinase B (AKT), glycogen synthase kinase 3 (GSK3), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and binding protein CAMP (CREB) due to intraperitoneal injection doses of 10 and 6 mg/kg buprenorphine were evaluated during the 14-day period in the lumbar spinal cord of male rats.

Results: Intraperitoneal injection of 10 mg/kg buprenorphine during the 14-day period increased the expression genes AKT and CREB genes in the lumbar spinal cord of male rats ($P < 0.05$), while the applied doses of the drug did not significantly alter the expression of GSK3 and BDNF genes in this region.

Conclusion: By investigating the results of this study with the mechanisms proposed by previous researchers, it's probable that administration of high-dose of buprenorphine over a 14-day period, via the PI3 / Akt / CREB / BDNF signaling pathway, increased the expression genes of AKT and CREB in the lumbar spinal cord of rats and prevented from increasing the expression of adverse GSK3 gene. Also, the applied doses of the drug could not change the expression of the BDNF gene.

Keywords: Buprenorphine, Expression of specific genes, Spinal cord