

بررسی بیان ژن زیر واحد آلفای مهاری (*Gαi/o*) و زیر واحد بتا (*Gβ*) پروتئین‌های G در ایجاد تحمل به اثر ضد درد مصرف مزمن مرفین در قطعه کمربندی نخاع موش صحرایی

محمد جوان ^{Ph.D.*}، ابوالحسن احمدیانی ^{Ph.D.*}، فرشته معتمدی ^{Ph.D.*}، بهرام کاظمی ^{Ph.D.*}

* دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب

* دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی

* دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی

آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۱۹۸۳۵-۳۵۵، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب

چکیده

هدف: تبیین مکانیزم‌های دخیل در تکوین تحمل به مواد اپیوئیدی، با بررسی تغییرات احتمالی بیان ژن پروتئین‌های *Gαi/o* و *Gβ* در ایجاد تحمل به اثر ضد درد اپیوئیدها هنگام مصرف مزمن مرفین

مواد و روشها: از دوز ۲۰ mg/kg مرفین به مدت ۴ روز برای ایجاد تحمل استفاده شد. RNA کل با کمک محلول RNase⁺، به روش کلروفوم - الکل استخراج، و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای سنتز cDNA از پرایمر Oligo-dT و آنزیم نسخه برداری معکوس M-MuLV استفاده شد. بخشی از cDNA مربوط به پروتئین‌های بتا - اکسین *Gαi/o* و *Gβ* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی توسط PCR تکثیر شدند (Semi-quantitative PCR). دانسیته باند حاصل از الکتروفورز مربوط به پروتئین‌های *Gαi/o* و *Gβ* نسبت به بتا-اکسین برای هر نمونه محاسبه و با گروه کنترل مقایسه شد.

یافته‌ها: ایجاد تحمل با مصرف مزمن مرفین به مدت ۴ روز، اثر بارزی بر میزان بیان ژن پروتئین *Gαi/o* نداشت ولی باعث افزایش معنی دار میزان بیان ژن پروتئین *Gβ* گردید ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: یافته‌ها نشان داد که مصرف مزمن مرفین با دوز مذکور که قادر به ایجاد تحمل اثر ضد درد اپیوئیدها می‌باشد، اثری بر میزان بیان ژن پروتئین‌های *Gαi/o* ندارد، اما احتمالاً بخشی از روند ایجاد تحمل را با افزایش بیان پروتئین *Gβ* باعث می‌شود و احتمالاً این پروتئین از طریق افزایش فعالیت آدنیلیل سیکلاز این عمل را موجب می‌شود.

کل واژگان: اپیوئیدها، تحمل به مرفین، *Gαi/o*، *Gβ*، بیان ژن و موش صحرایی

مقدمه

فعال شدن گیرنده‌های اپیویدی در سلولها عادی (naive) منجر به مهار نورونی می‌گردد که این مهار به واسطه عوامل مختلف از جمله آدنیلیل سیکلاز (AC)، مهار کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ و فعال سازی انواعی از کانالهای پتاسیمی است. جفت شدن گیرنده‌های اپیویدی با این فاکتورها با فعالیت پروتئینهای G حساس به سم پرتوزیس (PTX) یعنی Gi و Go همراه است. اپیوئیدها معمولترین مسکنها هستند، لیکن استفاده از آنها با پدیده‌های تحمل و وابستگی فیزیکی و روانی ناشی از مصرف مکرر و طولانی مدت محدود شده است. مکانیزم‌های مسئول تکوین تحمل و وابستگی هنوز دقیقاً روشن نیست. در مدل‌های سلولی، قرار گرفتن مزمن در معرض آگونیست‌های اپیویدی باعث چندین تغییر سازشی مانند تنظیم کاهش گیرنده‌های اپیویدی، فرار رسپتور به درون سلول و جفت نشدن گیرنده‌ها با پروتئین‌های G می‌شود که این وقایع با غیر حساس شدن گیرنده‌های اپیویدی در ارتباط است (۱، ۲). پاسخ سازشی دیگر به حضور مزمن اپیوئیدها، تنظیم افزایشی یا حساس شدن سیستم نشانه‌پردازی (Signaling) cAMP است (۳).

گزارشات موجود نشان می‌دهند که پروتئین‌های G از دو نظر در روند تکوین تحمل اهمیت دارند. اول اینکه اختلال در جفت شدن یا کاهش کارایی و کفایت جفت شدن گیرنده‌های اپیویدی و پروتئین‌های G می‌تواند در بروز تحمل دخیل باشد، دوم اینکه رسپتور گیرنده کینازهای فعال شده توسط پروتئین‌های G نیز در ایجاد تغییرات سازشی مسئول تحمل، نقش دارند (۴، ۵، ۶).

پروتئین‌های G هتروترایمر، غیر فعال دارای سه زیر واحد α و β و γ با ترکیب و ساختار متفاوتند و پروتئین کامل $\alpha\beta\gamma$ (Gaqby) نامیده می‌شود. زیر واحد α می‌تواند از زیر واحد $\beta\gamma$ جدا شود اما زیر واحدهای $\beta\gamma$ یک دایمر عملی با اتصال غیر کووالانس را شکل می‌دهند که در شرایط معمولی از هم جدا نمی‌شوند (۷). بر اساس خصوصیات اسیدهای آمینه، زیر واحدهای آلفای پروتئین‌های G به چهار خانواده α_1/α_2 ، α_3 ، α_4 و α_5 تقسیم می‌شوند.

خانواده α_1/α_2 که دارای زیر واحدهای نوع α_1 می‌باشد به نظر می‌رسد که در تمام بدن پراکنده‌اند و با آدنیلیل سیکلاز جفت شده‌اند و سنتز CAMP را مهار می‌کنند. پروتئین‌های G دارای اجزای α_4 به نظر می‌رسد که با کانالهای K^+ نیز کوپل شده‌اند. نقش α_0 هنوز به خوبی مشخص نیست.

زیر واحدهای β و γ کمتر از زیر واحدهای α بررسی شده‌اند. دایمرهای $\beta\gamma$ مستقیماً مولکولهای افکتور مختلفی از جمله کانالهای یونی، فسفولیپاز C β و فسفولیپاز A $_2$ را فعال می‌سازند. امروزه چگونگی عملکرد زیر واحدهای $\beta\psi$ به عنوان اجزاء اساسی در نشانه‌پردازی متابوتروپیک مورد توجه‌اند (۷، ۸). گزارشاتی نیز مبنی بر تغییر، در نورونهای استریاتوم حیوانات تزریق شده با مرفین تعداد پروتئین‌های Gs و Gi وجود دارد (۹). گزارش دیگری نیز حاکی است که مصرف مزمن مرفین فعالیت ایمپورتا کتیوبیتی زیر واحد α پروتئین‌های Gi/o در هسته لوکوس سرولئوس (LC) مغز را افزایش می‌دهد (۱۰). مرفین بسته

به مصرف می‌تواند در نقاط مختلف سیستم عصبی مرکزی باعث افزایش یا کاهش میزان پروتئین‌های G گردد. در این پژوهش اثر مصرف مزمن مرفین بر میزان بیان ژنهای پروتئین‌های Gi/o و G β مورد بررسی قرار گرفت تا مشخص شود، آیا تغییرات القاء شده توسط مصرف مزمن مرفین در سطح بیان ژن پروتئین‌های G می‌تواند یکی از مکانیزم‌های تحمل به اثر ضد دردی اپیوئیدها باشد یا خیر؟ با توجه به نقش اساسی نخاع در انتقال پیامهای درد و اعمال اثرات ضد درد اپیوئیدها، در این مطالعه بیان ژنهای پروتئین‌های Gi/o و G β در قطعه کمربطن نخاعی بررسی شد.

مواد و روشها

* حیوانات

جامعه مورد بررسی رتهای نر نژاد NMRI با محدوده وزنی ۲۴۰-۲۵۰ گرم بود که به طور تصادفی در گروههای حداقل ۶ تایی قرار گرفتند. برای ایجاد تحمل به مرفین از تزریق داخل صفاقی روزانه ۲۰ mg/kg برای مدت ۴ روز استفاده شد. حیوانات محدودیتی در دسترسی به آب نداشتند و در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی/۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

* اندازه‌گیری میزان بیان ژنهای Gi/o در بخش کمربطن نخاع

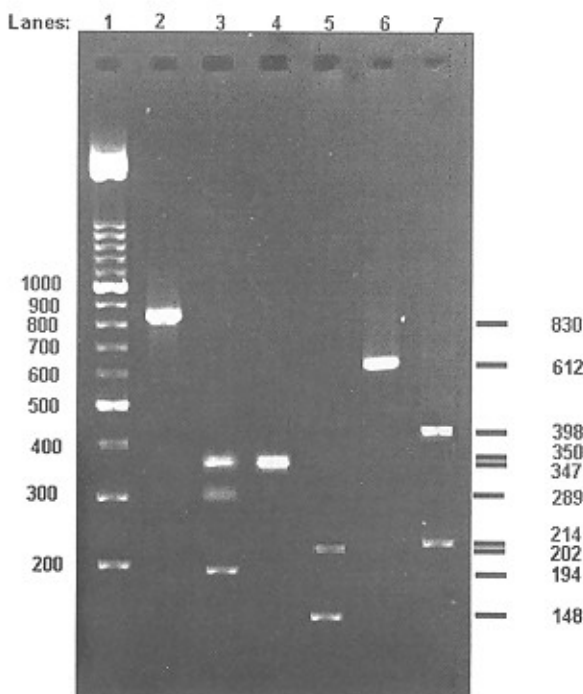
۱- استخراج قطعه کمربطن نخاع: حیوانات پس از دریافت تزریقات مورد نظر به مدت ۴ روز، در روز پنجم یعنی ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق، برای استخراج نخاع مورد استفاده قرار گرفتند. بدین ترتیب که سر حیوان توسط گیوتین قطع شد و پس از باز کردن پوست حیوان از ناحیه پشت، ابتدا و انتهای ستون فقرات بریده شد سپس با تزریق سالین تحت فشار از بخش ساکراک سوراخ مهره‌های، نخاع حیوان خارج شد و پس از جدا کردن رشته‌های عصبی ناحیه کمربطن و پرده‌های اطراف، قطعه کمربطن نخاع بریده شده و به میکروتیوپ استریل منتقل شد. نمونه‌ها پس از استخراج در نیپتروژن سابع ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲- استخراج RNA: کل RNA موجود در بافت با کمک RNase-free RNX+ (شرکت سیناژن) و بر اساس پروتکل کلروفوم - الکل استخراج گردید (۱۱). تمامی روندهای استخراج RNA، بجز مواردی که نیاز به انکوبه کردن در دمای آزمایشگاه داشت، روی یخ انجام گرفت. سانتریفوژها تماماً در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شدند. بخشی از RNA استخراج شده بلافاصله برای سنتز cDNA به کار رفت و بقیه نیز در دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۳- واکنش Reverse Transcriptase: در این مرحله از روی تمام mRNAهای موجود در نمونه استخراج شده، cDNA سنتز شد. سنتز cDNA، با کمک آنزیم نسخه برداری معکوس M-MuLV و پرایمر Oligo-dt انجام شد. برای مهار آنزیم مداخله گر RNase، به واکنش RNasin (مهارگر RNase) اضافه شد.

۴- واکنش PCR: برای تکثیر cDNA ژنهای Gi/o و G β از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و به صورت نیمه کمی (Semi-quantitative)

انجام واکنش RFLP روی محصولات PCR نشان داد: آنزیم *Pst*I محصول ژن *Gα10* را به دو قطعه با طول‌های ۲۰۲ و ۱۴۸ جفت باز، آنزیم *Hinf*I محصول PCR ژن $G\beta$ را به دو قطعه با طول‌های ۳۹۸ و ۲۱۴ جفت باز و آنزیم *Hinf*I محصول PCR ژن بتا-اکتین را به سه قطعه با طول‌های ۳۴۷، ۲۸۹ و ۱۹۴ جفت باز می‌شکند (شکل ۱).



شکل ۱: الگوی الکتروفورز محصولات PCR و محصولات واکنش هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. ستون ۱: DNA Ladder با فواصل 100 bp. ستون ۲: محصول PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن بتا-اکتین. ستون ۳: الگوی الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی محصول PCR ژن بتا-اکتین با آنزیم *Hinf*I. ستون ۴: محصول PCR با پرایمرهای اختصاصی پروتئین *Gα10*. ستون ۵: الگوی الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی محصول ژل پروتئین *Gα10* با آنزیم *Pst*I. ستون ۶: محصول PCR با پرایمرهای اختصاصی پروتئین $G\beta$. ستون ۷: الگوی الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی محصول PCR ژن پروتئین $G\beta$ با آنزیم *Hinf*I. (وضوح باندهای قسمت پایین تصویر برای محصول کیفیت بهتر در چاپ، افزایش یافته است.)

استفاده شد. فرآیند PCR (به حجم ۵۰ میکرولیتر) با کمک آنزیم پلیمرز Taq و پرایمرهای اختصاصی پیشرو و معکوس برای هر ژن انجام گرفت (۱۲). مقدار ۴μl از cDNA برای هر واکنش PCR استفاده شد. برای هر نمونه سه واکنش PCR با کمک Master mix تهیه شد و به هر واکنش پرایمرهای مربوط به یکی از ژنهای α -Actin (به عنوان استاندارد داخلی)، پروتئین *Gα* مهاری (*Gα10*) و پروتئین $G\beta$ اضافه شد. از دو واکنش کنترل نیز استفاده گردید. یکی واکنش کنترل cDNA که در آن تمامی اجزای واکنش حضور داشت و تنها به جای cDNA از آب مقطر استریل استفاده شد و واکنش دیگر Primer یعنی در آن تمامی اجزاء واکنش بجز پرایمرها حضور داشتند.

۵- واکنش RFLP: به منظور تایید محصولات PCR از روش (Restriction Fragment Length Polymorphism) RFLP استفاده شد. با توجه به پرایمرهای مورد استفاده، طول و توالی قطعه تکثیر شده برای هر یک از ژنها قابل پیش بینی است. به کمک نرم افزار DNAsis محل و تعداد جایگاه برش برای هر یک از آنزیمهای برش دهنده PCR مشخص گردید. واکنشهای هضم آنزیمی برای آنزیمهای نشان داده شده در حجم ۵۰μl انجام گرفت و پس از غیر فعال نمودن آنزیمها توسط حرارت، طول قطعات حاصل از برش، با کمک DNA Ladder برآورد گردید.

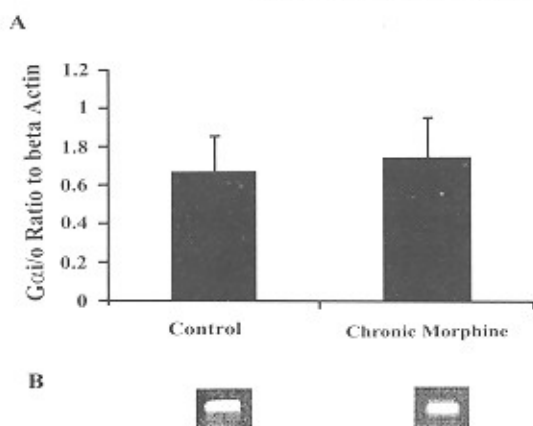
۶- الکتروفورز نمونه‌ها: ۱۰ میکرولیتر از محصول هر واکنش پس از مخلوط شدن با بافر مخصوص (Loading buffer) به چاهک‌های ژل آگارز ۱/۵ درصد اضافه شد. برآورد طول قطعه PCR با قرار دادن دو نمونه از DNA Ladder با فواصل 100 bp در چاهک کنار نمونه انجام گرفت. الکتروفورز به مدت ۶۰ دقیقه با ولتاژ ثابت ۵۰ ولت و در دمای آزمایشگاه انجام گرفت. ژل مورد استفاده در هنگام ساخت توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد.

تجزیه و تحلیل آماری

پس از پایان الکتروفورز، ژلها در دستگاه UV Transilluminator قرار گرفته و تحت نور UV با زمان acquisition برابر ۱/۲ ثانیه تصویر برداری شد. تصویر بدست آمده ذخیره و دانسته باندهای مورد نظر روی آنها توسط نرم افزار Lab works اندازه گیری گردید. برای هر نمونه تراکم باندهای مربوط به *Gα10* و $G\beta$ نسبت به تراکم باند مربوط به β -Actin محاسبه شد. هر گروه شامل نمونه‌های بدست آمده از حداقل ۶ حیوان بود که به طور مستقل نسبت باندها در آنها اندازه گیری شد. مقایسه میانگینها با کمک آزمون t-student انجام گرفت. نتایج به صورت میانگین \pm SEM ارائه شده‌اند و $P < 0.05$ به عنوان حداقل سطح معنی دار بودن مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

آشکار سازی محصولات PCR با اتیدیوم بروماید، وجود یک باند برای هر کدام از ژن پروتئین‌های *Gα10* و $G\beta$ و بتا-اکتین را نشان داد. طول محصول PCR برای *Gα10*، $G\beta$ و بتا-اکتین به ترتیب ۶۱۲، ۳۵۰ و ۸۳۰ جفت باز می‌باشد. (شکل ۱).



شکل ۲: اثر مصرف مزمن مرفین به مدت ۴ روز، بر میزان بیان ژنهای پروتئین‌های *Gα10* در قطعه کمری نخاع موش صحرائی. A: نسبت باند مربوط به ژن پروتئین *Gα10* به بتا-اکتین در دو گروه کنترل و دریافت کننده مرفین مزمن نشان می‌دهد ($n=6$). B: نمونه‌ای از باند مربوط به پروتئین *Gα10* را در گروه کنترل و تیمار شده با مرفین مزمن را نشان می‌دهد.

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در واکنشهای PCR برای تکثیر هر یک از ژنهای بتا-اکتین، پروتئین *Gai1* و پروتئین *Gβ*.

توالی پرایمر	طول پرایمر (جفت باز)	نوع پرایمر	قطعه تکثیر شده
5'-CCAGAGCAAGAGAGGCATC-3'	۲۰	پیشرو	بتا-اکتین
5'-CTCAGGAGGAGCAATGATCT-3'	۲۰	پسرو	بتا-اکتین
5'-TACAGCAACACCATCCAGTC-3'	۲۰	پیشرو	پروتئین <i>Gai1</i>
5'-AAGTGGGTTTCTACAGATGCC-3'	۲۰	پسرو	پروتئین <i>Gai1</i>
5'-CCGCTGGGTTCTCTCTGGGT-3'	۲۰	پیشرو	پروتئین <i>Gβ</i>
5'-CCAGACATTGCAGTTGAAGT-3'	۲۰	پسرو	پروتئین <i>Gβ</i>

جدول ۲: طول محصول PCR و قطعات حاصل از برش آنزیمی هر کدام از ژنهای بتا-اکتین، پروتئین *Gai1* و پروتئین *Gβ*.

طول قطعات حاصل از برش (جفت باز)	آنزیم برش دهنده	طول قطعه (جفت باز)	قطعه تکثیر شده
۲۴۷، ۲۸۹، ۱۹۲	HinfI	۸۳۰	بتا-اکتین
۲۰۲ و ۱۶۸	PstI	۲۵۰	پروتئین <i>Gai1</i>
۲۹۸ و ۲۱۲	HinfI	۶۱۲	پروتئین <i>Gβ</i>

طول محصول PCR برای *Gai1*، *Gβ* و بتا-اکتین در حد مورد انتظار یعنی به ترتیب ۳۵۰، ۶۱۲ و ۸۳۰ جفت باز بود (شکل ۱). برای حصول اطمینان از محصول PCR، از واکنش‌های هضم آنزیمی استفاده شد. هضم آنزیمی محصول PCR ژنهای *Gai1*، *Gβ* و بتا-اکتین محصولاتی با طولهای مورد انتظار تولید کرد که بدین ترتیب صحت توالی محصول PCR برای هر کدام از ژنها تأیید گردید (شکل ۱).

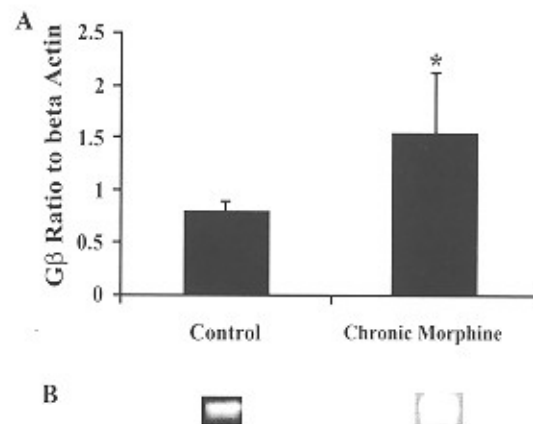
گزارش شده است که بر هم کنش اپیوئیدها با گیرنده‌های اپیوئیدی جفت شده با پروتئین‌های *Gai1* منجر به کاهش cAMP می‌گردد (۲). چندین نوع از پروتئین‌های G مهاری شامل *Go*، *Gi1*، *Gi2*، *Gi3* توسط گیرنده‌های اپیوئیدی فعال می‌شوند (۱۳، ۱۴). کاهش جفت شدن مناسب پروتئین‌های G مذکور با گیرنده‌های اپیوئیدی و آنزیم آدنیلیل سیکلاز می‌تواند از علل ایجاد تحمل به اثر ضد دردی اپیوئیدها باشد (۱۵) و البته گزارشاتی نیز از افزایش توان جفت شدن گیرنده‌های اپیوئیدی با پروتئین *Gs* وجود دارد (۱۶، ۱۷). پرایمرهای طرح شده برای کلون کردن cDNA پروتئین‌های *Gai1* قادر است تمام انواع *Go*، *Gi1*، *Gi2*، *Gi3* را همزمان تکثیر نماید (۱۸) و بنابراین در مطالعه عملاً مجموع میزان بیان ژن‌های فوق اندازه‌گیری شده است.

نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد که مصرف مزمن مرفین به مدت ۴ روز اثر بارزی بر میزان بیان ژنهای پروتئین‌های *Gai1* ناشی نمی‌شود و می‌تواند به عوامل دیگر مانند فسفریلاسیون گیرنده‌های اپیوئیدها، پروتئین‌های G، و نیز اینترنالیزه شدن گیرنده‌ها و سایر عوامل شناخته شده مربوط باشد (۱، ۲).

گزارشات متعددی نیز از نقش زیر واحدهای $\beta\gamma$ پروتئین‌های G ($G\beta\gamma$) در نشانه‌پردازی داخل سلولی وجود دارد (۲۴-۱۹). در خصوص ایجاد تحمل به اثر ضد دردی مرفین گزارش شده است که در سلولهای COS-7، که در آنها گیرنده‌های اپیوئیدی بیان شده‌اند، افزایش حساسیت در سیستم آدنیلیل سیکلاز (ACV) ناشی از حضور مزمن مرفین در محیط کشت، توسط مهارکننده‌های پروتئین‌های $G\beta\gamma$ از بین

مصرف مزمن مرفین با دوز روزانه ۲۰ mg/kg به مدت ۴ روز اثر بارزی بر میزان بیان ژن پروتئین *Gai1* نداشت. نسبت دانسیته باند مربوط به ژن پروتئین *Gai1* به بتا-اکتین در گروه کنترل ۰/۱۸ ± ۰/۹۶ است که در مقایسه با گروه دریافت‌کننده مرفین (۰/۲ ± ۰/۷۴) تفاوت معنی‌داری ندارد (شکل ۲).

ولی نسبت دانسیته باند مربوط به ژن پروتئین *Gβ* به بتا-اکتین در گروه کنترل و دریافت‌کننده مرفین مزمن به ترتیب ۰/۰۸ ± ۰/۷۹ و ۰/۵ ± ۰/۵۶ است. یعنی مصرف مزمن مرفین باعث افزایش معنی‌دار میزان بیان ژن پروتئین *Gβ* شده است (۰/۰۵ < P، شکل ۳).



شکل ۳: اثر مصرف مزمن مرفین به مدت ۴ روز، بر میزان بیان ژنهای پروتئین *Gβ* در قطعه کمری نخاع موش صحرایی. * نسبت دانسیته باند مربوط به ژن پروتئین *Gβ* به بتا-اکتین در دو گروه کنترل و دریافت‌کننده مرفین مزمن نشان می‌دهد. (۰/۰۵ < P، n=۶) و B نمونه‌ای از باند مربوط به پروتئین *Gβ* را در و گروه کنترل و تیمار شده با مرفین مزمن

بحث

تکثیر قطعه‌ای از cDNA مربوط به پروتئین *Gai1*، *Gβ* و بتا-اکتین (به عنوان استاندارد داخلی) با کمک پرایمرهای اختصاصی در واکنش‌های PCR جداگانه به میزان ۲۵ سیکل منجر به تولید محصولاتی شد که در ژل آگاروز رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم برآمید و زیر نور UV قابل تشخیص بودند. با توجه به پرایمرهای مورد استفاده،

در ایجاد تحمل نقش ایفا می‌کنند، اسپتور کینازهای جفت شده با پروتئین‌های G (GRKs) هستند. انواع ۲ و ۳ این آنزیم‌ها ($GRK2$ و $GRK3$) برای فرار گرفتن در غشاء و فعال شدن به پروتئین‌های $G\beta\gamma$ نیاز دارند (۲۸) که دلیل دیگری بر نقش احتمالی افزایش بیان پروتئین $G\beta\gamma$ در ایجاد تحمل به اثر ضد دردی اپیوئیدها است.

نتایج به دست آمده در این مطالعات نشان داد که مصرف مزمن مرفین با دوز 20 mg/kg که قادر به ایجاد تحمل به اثر ضد دردی اپیوئیدها است، اثری بر میزان بیان ژن‌های Gai/o ندارد اما احتمالاً بخشی از روند ایجاد تحمل را افزایش بیان ژن پروتئین $G\beta\gamma$ باعث می‌شود. همانطور که عملکرد انواع گیرنده‌ها، پروتئین‌های G و آدنیلیل سیکلازها در بافت‌های مختلف کاملاً مشابه یکدیگر نیست، در خصوص نتایج این مطالعه نیز باید در نظر داشت که نتایج بدست آمده مربوط به اثر مصرف مزمن مرفین بر میزان بیان ژن پروتئین‌های Gai/o و $G\beta\gamma$ در بخش کمری نخاع می‌باشد و لزوماً در مورد سایر بخش‌های سیستم عصبی مرکزی و نقاط درگیر در پدیده‌های تحمل و وابستگی به اپیوئیدها صادق نیست. مطالعات بیشتری لازم است تا مشخص گردد که مصرف مزمن مرفین چگونه باعث افزایش بیان ژن پروتئین $G\beta\gamma$ می‌گردد. آیا این تغییر بیان، نتیجه مستقیم افزایش فعالیت مسیرهای انتقال درد در نخاع است یا از سایر جنبه‌های عملکرد درد، مانند جنبه استرس زایی آن ناشی می‌گردد؟

می‌رود (۳، ۲۴). بنابراین به نظر می‌رسد که فعالیت پروتئین‌های $G\beta\gamma$ می‌تواند در ایجاد تحمل به اثر ضد دردی اپیوئیدها موثر باشد. مطالعه حاضر نشان داد که مصرف مزمن مرفین می‌تواند باعث افزایش بارزی در میزان بیان پروتئین $G\beta$ گردد. از آنجا که زیر واحدهای β و γ در شرایط فیزیولوژیک همواره به صورت دایمر وجود دارند (۷)، لذا افزایش بیان پروتئین $G\beta$ می‌تواند به مفهوم افزایش عملکرد دایمر $\beta\gamma$ باشد و بنابراین افزایش بیان پروتئین‌های $G\beta$ می‌تواند یکی از دلایل ایجاد تحمل به اثر ضد دردی اپیوئیدها باشد.

گفته می‌شود پروتئین $G\beta\gamma$ می‌تواند باعث افزایش فعالیت آدنیلیل سیکلازهای نوع II و IV، و مهار نوع اگررد (۲۵). بدین ترتیب اثر نهایی پروتئین‌های $G\beta\gamma$ بر میزان $cAMP$ به نوع بافت و فراوانی نسبی انواع آدنیلیل سیکلاز بستگی دارد. نکته قابل توجه دیگر این است که حساسیت $AC\ II$ به پروتئین $G\beta\gamma$ ، در اثر فسفریله شدن توسط کینازها افزایش می‌یابد (۲۶، ۲۷). با توجه به افزایش فعالیت انواع کینازها در طی تحمل به اپیوئیدها، به نظر می‌رسد که نقش $AC\ II$ در تولید $cAMP$ بویژه در بافت‌های دچار تحمل به اثر ضد دردی اپیوئیدها برجسته‌تر باشد. بنابراین افزایش بیان پروتئین $G\beta\gamma$ می‌تواند با فعال کردن $AC\ II$ باعث ایجاد و یا تقویت مکانیزم‌های تحمل به اثر ضد دردی اپیوئیدها گردد.

از آنزیم‌هایی که گفته می‌شود با فسفریله کردن گیرنده‌های اپیوئیدی



References

- Polastron J, Meunier JC, Jauzac P: Chronic morphine induces tolerance and desensitization of mu-opioid receptor but not down-regulation in rabbit. *Eur J Pharmacol* 1994; 266: 139-146
- Williams JT, McDonald JC, Manzoni O: Cellular and synaptic adaptation mediating opioid dependence. *Physiol Rev* 2001; 81: 299-343
- Liu JG, Anand KJS: Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Res Rev* 2001; 38: 1-19
- Mao J, Price DD, Mayer DJ: Mechanisms of hyperalgesia and morphine tolerance: a current view of their possible interaction. *Pain* 1995; 62: 259-274
- Shen J, Benedict GA, Gallader A, Stafford K, Yoburn BC: Role of $cAMP$ -dependent protein kinase (PKA) in opioid agonist-induced mu-opioid receptor down regulation and tolerance in mice. *Synapse* 2000; 38: 322-327
- Zeitl KP, malmberg AB, Gilbert H, Basbaum AL: Reduced development of tolerance to the analgesic effects of morphine and clonidine in PKC γ mutant mice. *Pain* 2001; 94: 245-253
- Fain GL: Molecular and cellular physiology of neurons. Harvard University Press, London, 1999, pp 385-405
- Conklin BR, Bourne HR: structural elements of $G\beta$ subunits that interact with Gai/o receptors and effects. *Cell* 1993; 73: 631-641
- Vliet VBJ, Rilswijk VAL, Wardeh G, Mulder AH, Schoffelmeeer AN: Adaptive changes in the number of G_s and G_i -proteins underlie adenylyl cyclase sensitization in morphine-treated rat striatal neurons. *Eur J Pharmacol* 1993; 245: 23-29
- Nestler EJ, Hope BT, Widnell KL: Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron* 1993; 11: 995-1006
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K: Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons Press, USA, 2002, pp (2-1)-(15-40)
- Chetsawang B, Casalotti SO, Phansuwan-Pujito P, Kotchabhakdi N, Govitrapong P: Gene expressions of opioid receptors and G-proteins in pineal glands. *Biochem Biophys Res Comm* 1999; 262: 775-780
- Burford NT, Tolbert LM, Sadee W: Specific G protein activation and mu-opioid receptor internalization caused by morphine, DAMGO and endorphine I. *Eur J Pharmacol* 1998; 342: 123-126

14. Burford NT, Wang D, Sadee W: G-protein coupling of mu-opioid receptors (OP3): elevated basal signaling activity. *Biochem J* 2000; 348: 531-537
15. Nestler EJ: Molecular mechanisms underlying opiate addiction: implications for medications development. *Sem Neurosci* 1997; 9: 84-93
16. Ammer H, Schulz R: Coupling of prostaglandin E1 receptors to the stimulatory GTP-binding protein Gs is enhanced in neuroblastoma X glioma (NG108-15) hybrid cells chronically exposed to an opioid. *Mol Pharmacol* 1993; 43: 556-563
17. Crain SM, Shen KF: Modulation of opioid analgesia, tolerance and dependence by Gs-coupled, GM1 ganglioside-regulated opioid receptor functions. *TIPS* 1998; 19: 658-365
18. Gao B, Gilman AG: Cloning and expression of a widely distributed (type IV) adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10174-10182
19. Tang WJ, Krupinski J, Gilman AG: Expression and characterization of calmodulin activated (type I) adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 1991; 266: 8595-8603.
20. Tang WJ, Gilman AG: Type specific regulation of adenylyl cyclase by Gprotein G β subunits. *Science* 1991; 245: 1500-1503
21. Qin N, Platano D, Olcese R, Stefani E, Birnbaumer L: Direct interaction of G α i/o with a C-terminal G β g-binding domain of the Ca v 2.1 channel α 1 subunit is responsible for channel inhibition by Gprotein-coupled receptors *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8866
22. Zimmermann G, Taussig R: Protein kinase C alters the responsiveness of adenylyl cyclase to G protein G α i/o and G β 27166 subunits. *J Biol Chem* 1996; 271: 27161
23. Wei J, Zhao AZ, Chan GCK, Baker LP, Impey S, Beavo JA, Storm DR: *Neuron* 1998; 21: 495-504
24. Avidor-Reiss T, Bayewitch M, Levy R, Matus-Leibovitch N, Nevo I, Vogel Z: Adenylyl cyclase supersensitization in m-opioid receptor-transfected Chinese hamster ovary cells following chronic opioid treatment. *J Biol Chem* 1995; 270: 29732-29738
25. Chern Y: Regulation of adenylyl cyclase in the central nervous system. *Cellular Signaling* 2000; 12: 195-204
26. Chakrabarti S, Rivera M, Yan SZ, Tang WJ, Gintzler AR: Chronic morphine augments G α i/G β stimulation of adenylyl cyclase: relevance to opioid tolerance. *Mol Pharmacol* 1998; 54: 655-662
27. Chakrabarti S, Wang L, Tang WJ, Gintzler RA: Chronic morphine augments adenylyl cyclase phosphorylation: relevance to altered signaling during tolerance/dependence. *Mol Pharmacol* 1998; 54: 949-953
28. Daaka Y, Pitcher JA, Richardson M, Stofeel RH, Robishaw JD, Lefkowitz RJ: Biochemistry Receptor and isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 2185-2180

