Archive of SID

بررسی بیان ژن زیر واحد آلفای مهاری ($G\alpha i/o$) و زیر واحد بتا ($G\beta$) پروتئین‌های G در ایجاد تحمل به اثر ضد دردی مصرف مزمن مرفین در قطعه‌کمری 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: ۳۵۵-۱۹۸۳۵، 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 $G\alpha i/o$ و $G\beta$ در ایجاد تحمل به اثر ضد دردی اپیوئیدها هنگام مصرف مزمن مرفین

* **مواد و روشها:** از دوز ۲۰mg/kg مرفین به مدت ۴ روز برای ایجاد تحمل استفاده شد. RNA کل با کمک محلول RNX^+، 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 - اکتین $G\alpha i/o$ و $G\beta$ با استفاده از پرایمرهای اختصاصی توسط PCR تکثیر شدند (Semi-quantitative PCR). دانسیته باند حاصل از الکتروفورز مربوط به پروتئین‌های $G\alpha i/o$ و $G\beta$ نسبت به بتا-اکتین 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 $G\alpha i/o$ نداشت ولی باعث افزایش معنی دار میزان بیان ژن پروتئین $G\beta$ گردید ($P<0.05$).

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

گل واژگان: اپیوئیدها، تحمل به مرفین، $G\alpha i/o$، $G\beta$، بیان ژن و موش صحرایی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

فعال شدن گیرنده‌های اپیوئیدی 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 اپیوئیدی با این فاکتورها با فعالیت پروتئینهای G حساس به سم پرتوزیس (PTX) یعنی Go و Gi 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 اپیوئیدی باعث چندین تغییر سازشی مانند تنظیم کاهشی گیرنده‌های اپیوئیدی، فرار رسپتور به درون سلول و جفت نشدن گیرنده‌ها با پروتئین‌های G می‌شود که این وقایع با غیر حساس شدن گیرنده‌های اپیوئیدی در ارتباط است (۱، ۲). پاسخ سازشی دیگر به حضور مزمن اپیوئیدها، تنظیم افزایشی یا حساس شدن سیستم نشانه‌پردازی cAMP (Signaling) 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 کارآیی و کفایت جفت شدن گیرنده‌های اپیوئیدی و پروتئین‌های G می‌تواند در بروز تحمل دخیل باشد، دوم اینکه رسپتور گیرندهٔ 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 $\alpha\beta\gamma$ (G$\alpha\beta\gamma$) 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_s α_i/α_o α_q و α_{12}/α_{13} تقسیم می‌شوند.

خانواده α_i/α_o که دارای زیر واحدهای نوع α_i می‌باشد به نظر می‌رسد که در تمام بدن پراکنده‌اند و با آدنیلیل سیکلاز جفت شده‌اند و سنتز cAMP را مهار می‌کنند. پروتئین‌های G دارای اجزا α_i به نظر می‌رسد که با کانالهای K^+ نیز کوپل شده‌اند. نقش αo 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 $C\beta$ 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 ایمنوراکتیویتی 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 Gαi/o و Gβ 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 Gα/io و Gβ در قطعه کمری طناب نخاعی بررسی شد.

مواد و روشها

* حیوانات

جامعه مورد بررسی رتهای نر نژاد NMRI با محدودهٔ وزنی ۲۴۰-۲۰۰ 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 Gαi/o در بخش کمری نخاع

۱ـ استخراج قطعه کمری 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 ساکرال سوراخ مهره‌های، نخاع حیوان خارج شد و پس از جداکردن رشته‌های عصبی ناحیه کمری و پرده‌های اطراف، قطعه کمری نخاع بریده شده و به میکروتیوپ استریل منتقل شد. نمونه‌ها پس از استخراج در نیتروژن مایع ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲ـ استخراج RNA: کل RNA موجود در بافت با کمک RNX+ (شرکت سینا ژن) و بر اساس پروتکل کلروفوم - الکل استخراج گردید (۱۱). تمامی روند 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.

۳ـ 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.

۴ـ واکنش PCR: برای تکثیر cDNA ژنهای Gαi/o و Gβ از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و به صورت نیمه کمی (Semi-quantiative)

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده شد. فرآیند PCR (به حجم ۵۰ میکرولیتر) با کمک آنزیم پلیمراز 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 (Gαi/o) و پروتئین Gβ 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 واکنش دیگر Primer یعنی در آن تمامی اجزاء واکنش بجز پرایمرها حضور داشتند.

۵ـ واکنش RFLP: به منظور تایید محصولات PCR از روش RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 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 نرم‌افزار 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.

۶ـ 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 رنگ‌آمیزی شد.

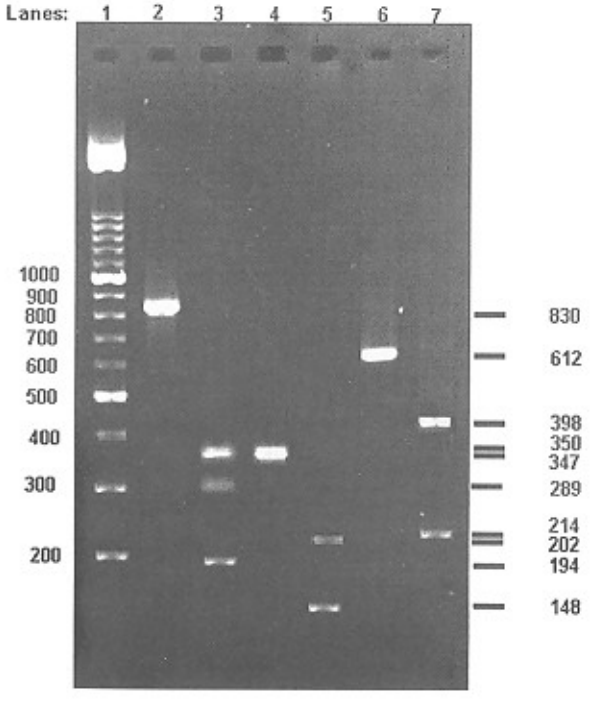
* تجزیه و تحلیل آماری

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 دانسیته باندهای مورد نظر روی آنها توسط نرم‌افزار Lab works اندازه‌گیری گردید. برای هر نمونه تراکم باندهای مربوط به Gαi/o و Gβ 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 اندازه‌گیری شد. مقایسه میانگین‌ها با کمک آزمون t-student انجام گرفت. نتایج به صورت میانگین ±SEM ارائه شده‌اند و P<۰/۰۵ به عنوان حداقل سطح معنی دار بودن مورد استفاده قرار گرفت.

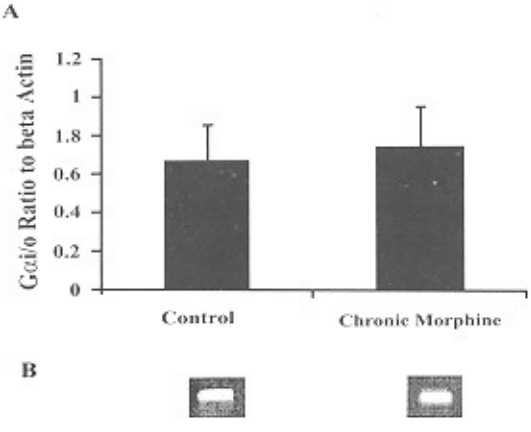
یافته‌ها

آشکار سازی محصولات PCR با اتیدیوم بروماید، وجود یک باند برای هر کدام از ژن پروتئین‌های Gαi/o و Gβ و بتا۱کتین را نشان داد. طول محصول PCR برای Gαi/o، Gβ و بتا۱کتین به ترتیب ۳۵۰، ۶۱۲ و ۸۳۰ جفت باز می‌باشد. (شکل ۱).

انجام واکنش RFLP روی محصولات PCR نشان داد: آنزیم PstI محصول ژن Gαi/o را به دو قطعه با طول‌های ۲۰۲ و ۱۴۸ جفت باز، آنزیم Hinf I محصول PCR ژن Gβ را به دو قطعه با طولهای ۳۹۸ و ۲۱۴ جفت باز و آنزیم Hinf I محصول PCR ژن بتا۱کتین 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 bp 100 ستون ۲: محصول PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن بتا – اکتین، ستون ۳: الگوی الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی محصول PCR ژن بتا اکتین با آنزیم HinfI، ستون ۴: محصول PCR با پرایمرهای اختصاصی پروتئین Gαi/o، ستون ۵: الگوی الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی محصول PCR ژل پروتئین Gαi/o با آنزیم Pst I، ستون ۶: محصول PCR با پرایمرهای اختصاصی پروتئین Gβ ستون ۷: الگوی الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی محصول PCR ژن پروتئین Gβ با آنزیم HinfI. (وضوح باندهای قسمت پایین تصویر برای حصول کیفیت بهتر در چاپ، افزایش یافته است)



شکل ۲: اثر مصرف مزمن مرفین به مدت ۴ روز، بر میزان بیان ژنهای پروتئین‌های Gαi/o در قطعه کمری نخاع موش صحرایی. A: نسبت باند مربوط به ژن پروتئین Gαi/o به بتا-اکتین در دو گروه کنترل و دریافت کننده مرفین مزمن نشان می‌دهد (n=۶). B: نمونه‌ای از باند مربوط به پروتئین Gαi/o را در دو گروه کنترل و تیمار شده با مرفین مزمن را نشان می‌دهد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در واکنشهای PCR برای تکثیر هر یک از ژنهای بتا-اکتین، پروتئین Gαi/o و پروتئین Gβ

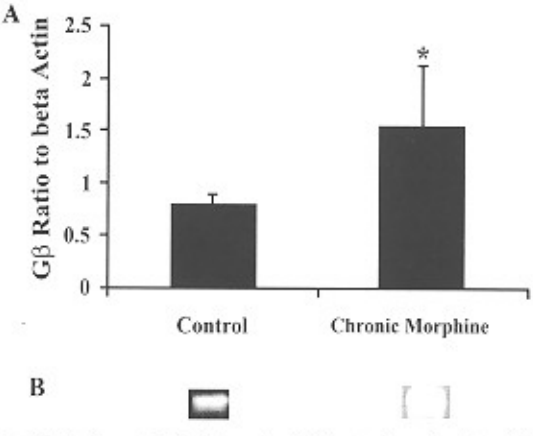
قطعه تکثیر شده	نوع پرایمر	طول پرایمر (جفت باز)	توالی پرایمر
بتا-اکتین	پیشرو	۲۰	5'-CCAGAGCAAGAGAGGCATC-3'
بتا-اکتین	پسرو	۲۰	5'-CTCAGGAGGAGCAATGATCT-3'
پروتئین Gαi/o	پیشرو	۲۰	5'-TACAGCAACACCATCCAGTC-3'
پروتئین Gαi/o	پسرو	۲۰	5'-AAGTGGGTTTCTACGATGCC-3'
پروتئین Gβ	پیشرو	۲۰	5'-CCGCTGCGTTCCTCCTGGGT-3'
پروتئین Gβ	پسرو	۲۰	5'-CCAGACATTGCAGTTGAAGT-3'

جدول ۲: طول محصول PCR و قطعات حاصل از برش آنزیمی هر کدام از ژنهای بتا-اکتین، پروتئین Gαi/o و پروتئین Gβ

قطعه تکثیر شده	طول قطعه (جفت باز)	آنزیم برش دهنده	طول قطعات حاصل از برش (جفت باز)
بتا-اکتین	۸۳۰	HinfI	۳۴۷، ۲۸۹، ۱۹۴
پروتئین Gαi/o	۳۵۰	PstI	۱۴۸ و ۲۰۲
پروتئین Gβ	۶۱۲	HinfI	۳۱۴ و ۲۹۸

مصرف مزمن مرفین با دوز روزانه ۲۰mg/kg به مدت ۴ روز اثر بارزی بر میزان بیان ژن پروتئین Gαi/o نداشت. نسبت دانسیته باند مربوط به ژن پروتئین Gαi/o به بتااکتین در گروه کنترل ۰/۱۸ ± ۰/۶۶ است که در مقایسه با گروه دریافت کننده مرفین (۰/۲ ± ۰/۷۴) تفاوت معنی‌داری ندارد (شکل ۲).

ولی نسبت دانسیته باند مربوط به ژن پروتئین Gβ به بتااکتین در گروه کنترل و دریافت کننده مرفین مزمن به ترتیب ۰/۰۸ ± ۰/۷۹ و ۰/۵ ± ۱/۵۶ است. یعنی مصرف مزمن مرفین باعث افزایش معنی‌دار میزان بیان ژن پروتئین Gβ شده است (P<۰/۰۵، شکل ۳).



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

بحث

تکثیر قطعه‌ای از cDNA مربوط به mRNA پروتئین Gαi/o، Gβ و بتااکتین (به عنوان استاندارد داخلی) با کمک پرایمرهای اختصاصی در واکنش‌های PCR جداگانه به میزان ۲۵ سیکل منجر به تولید محصولاتی شد که در ژل آگارز رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید و زیر نور UV قابل تشخیص بودند. با توجه به پرایمرهای مورد استفاده، طول محصول PCR برای Gαi/o، Gβ و بتااکتین 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 Gαi/o، Gβ و بتا - اکتین محصولاتی با طولهای مورد انتظار تولید کرد که بدین ترتیب صحت توالی محصول PCR برای هر کدام از ژنها تائید گردید (شکل ۱).

گزارش شده است که بر هم‌کنش اپیوئیدها با گیرنده‌های اپیوئیدی جفت شده با پروتئین‌های Gαi/o منجر به کاهش cAMP می‌گردد (۲). چندین نوع از پروتئین‌های G مهاری شامل Go، Gi1، Gi2 و 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 Gαi/o قادر است تمام انواع Go، Gi1، Gi2 و 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 Gαi/o 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 V(ACv) ناشی از حضور مزمن مرفین در محیط کشت، توسط مهارکننده‌های پروتئین‌های $G\beta\gamma$ از بین

www.SID.ir

Archive of SID

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 آنجاکه 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 I گردد (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 ACII 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 ACII باعث ایجاد و یا تقویت مکانیزم‌های تحمل به اثر ضد دردی اپیوئیدها گردد.

از آنزیم‌هایی که گفته می‌شود با فسفریله کردن گیرنده‌های اپیوئیدی 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 قرارگرفتن 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 ۲۰mg/kg که قادر به ایجاد تحمل به اثر ضد دردی اپیوئیدها است، اثری بر میزان بیان ژن‌های $G\alpha i/o$ ندارد اما احتمالاً بخشی از روند ایجاد تحمل را افزایش بیان ژن پروتئین $G\beta\gamma$ باعث می‌شود. همانطورکه 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 $G\alpha i/o$ 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؟

References

1. 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
2. Williams JT, McDonald JC, Manzoni O: Cellular and synaptic adaptation mediating opioid dependence. Physiol Rev 2001; 81: 299-343
3. Liu JG, Anand KJS: Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence, Brain Res Rev 2001; 38: 1-19
4. Mao J, Price DD, Mayer DJ: Mechanisms of hyperalgesia and morphine tolerance: a current view of their possible interaction. Pain 1995; 62: 259-274
5. 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
6. Zeitz KP, malmberg AB, Gilbert H, Basbaum AL: Reduced development of tolerance to the analgesic effects of morphine and clonidine inPKCgammamutant mice. Pain 2001; 94: 245-253
7. Fain GL: Molecular and cellular physiology of neurons. HarvardUniversity Press, London, 1999, pp 385-405
8. Conklin BR, Bourne HR: structural elements of $G\beta$ subunits thatinteract with $G\alpha i/o$ receptors and effects, Cell 1993; 73: 631-641
9. Vliet VBJ, Rilswijk VAL, Wardeh G, Mulder AH, Schoffelmeer AN: Adaptive changes in the number of Gs and Gi-proteins underlieadenylyl cyclase sensitization in morphine-treated rat striatal neurons. Eur J Pharmacol 1993; 245: 23-29
10. Nestler EJ, Hope BT, Widnell KL: Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity. Neuron 1993; 11: 995-1006
11. 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)
12. 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
13. 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

www.SID.ir

Archive of SID

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-copled, 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 andcharacterization of calmodulin activated (type I) adenylyl cyclase. J BiolChem 1991; 266: 8595-8603.
20. Tang WJ, Gilman AG: Type specific regulation of adenylyl cyclase by Gprotein Gβ subunits. Science 1991; 245: 1500-1503
21. Qin N, Platano D, Olcese R, Stefani E, Birnnaumer L: Directinteraction of Gαi/o with a C-terminal Gbg-binding domain ofthe Ca21 channel a1 subunit is responsible for channel inhibition by Gprotein-coupled receptors Proc Natl Acad Sci USA 8871 1997; 94: 8866
22. Zimmermann G, Taussig R: Protein kinase C alters theresponsiveness of adenylyl cyclase to G protein Gαi/o and Gβ 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((/Gs(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

www.SID.ir