

ارزیابی بیان ژن های *Amph* و *Polr2j* در موش های مدل معتاد به کانابیس قبل و پس از درمان با GDNF

اعظم رجبی فقیهی^۱، میترا حیدری نصر آبادی^۲، پروین خدارحمی^۳

^۱کارشناس ارشد ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند و رباط کریم

^۲دانشیار زیست شناسی - سلولی تکوینی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند

^۳دانشیار زیست شناسی-علوم جانوری- فیزیولوژی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند

چکیده

با وجود کاربردهای درمانی کانابینوئیدها، این ترکیبات می توانند موجب اعتیاد و وابستگی گردند. لزوم درمان های موثر برای اعتیاد به کانابینوئیدها محققان را وامی دارد که ترکیبات مختلف را مورد بررسی قرار دهند. از آنجایی که GDNF یک مولکول دارای خاصیت محافظت کننده عصبی است و از طرف دیگر بخش عمده ای اثرات کانابینوئیدها روی مغز اعمال می شود، در تحقیق حاضر اثر درمان موش های معتاد به کانابیس با استفاده از GDNF و از طریق ارزیابی بیان دو ژن *Polr2j* و *Amph* در بافت مغز مطالعه شد. موش ها به طور تصادفی به سه گروه کنترل، اعتیاد به کانابیس و درمان شده با GDNF تقسیم شدند. اعتیاد به کانابیس با دود دادن کانابیس ساتیوا به درون قفس القا شد. سپس آزمون های رفتاری شامل پلاس ماز، زمینه باز و ترجیح سوکرروز انجام شد تا تغییرات رفتاری موش های مورد مطالعه ارزیابی گردد. در پایان موش ها کشته شده و پس از خروج بافت مغز آن ها، بیان دو ژن *Polr2j* و *Amph* با استفاده از روش Real time PCR مطالعه شد. نتایج حاصل نشان داد که تزریق GDNF موجب تغییرات رفتاری در موش ها می گردد. موش های معتاد پس از دریافت GDNF رفتارهایی مشابه با موش های کنترل نشان دادند. نتایج حاصل از مطالعات مولکولی نیز نشان دهنده کاهش معنادار بیان هر دو ژن در موش های معتاد نسبت به موش های کنترل بود ($P < 0.05$). از طرفی درمان با GDNF موجب شد که بیان هر دو ژن مجدداً افزایش یابد. به طور کلی نتایج آزمایش حاضر نشان می دهد که GDNF می تواند به عنوان یک ترکیب امیدوار کننده برای درمان اعتیاد به کانابیس و کاهش اثرات سوء آن در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: اعتیاد، کانابیس، ماری جوانا، GDNF، بیان ژن

مقدمه

گیاه *Cannabis sativa* L. هزاران سال است که در پزشکی استفاده می شود. با این حال، نگرانی در مورد خطرات سوء مصرف آن، منجر به ممنوعیت استفاده دارویی از ماری جوانا در بیشتر کشورها در دهه ۱۹۳۰ شد. اخیراً، ماری جوانا و آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های گیرنده کانابینوئید طبیعی و مصنوعی، و همچنین ترکیبات شیمیایی مرتبط، که مکانیسم اثر آن‌ها هنوز مبهم است، ارزش درمانی دارند. با این حال، استفاده از آنها بسیار محدود است (Kogan & Mechoulam, 2022).

مدت‌هاست که تشخیص داده شده است که مصرف مواد مخدر معمولاً در نوجوانی شروع می‌شود و از طریق یک سری مراحل، از تنباکو و الکل تا حشیش، و سپس به روان‌گردان‌ها و مواد افیونی پیشرفت می‌کند (Kandel et al., 1992). این پیشرفت به طور استعاری به عنوان یک اثر "دروازه" نامیده می‌شود، زیرا به نظر می‌رسد استفاده از یک ماده مخدر منجر به استفاده از ماده دیگر می‌شود. دلایل متعددی وجود دارد که چرا این پیشرفت ممکن است رخ دهد (Fergusson et al., 2015)، از جمله وضعیت نسبی قانونی، مقبولیت اجتماعی، و در دسترس بودن هر دسته از مواد مخدر. یک احتمال مهم، که مطالعه مستقیم آن در انسان دشوار است، اما می‌توان آن را به طور سیستماتیک در مدل‌های حیوانی ارزیابی کرد، این است که قرار گرفتن در معرض یک نوع دارو به خودی خود می‌تواند فرد را مستعد تبدیل شدن به مصرف‌کننده همیشگی دسته‌ای از مواد مخدر کند. تحقیقات در این زمینه در دهه گذشته به طور فزاینده‌ای فعال شده است و بیشتر بر اثرات قرار گرفتن در معرض THC یا آگونیست‌های کانابینوئید مصنوعی متمرکز شده است. این مطالعات نشان داده‌اند که قرار گرفتن در معرض داروهای کانابینوئیدی می‌تواند تغییرات پایداری را در سیستم‌های مغزی مرتبط با اعتیاد و پاداش ایجاد کند (از جمله سیستم‌های درون‌زا کانابینوئید، مواد افیونی و دوپامین) و می‌تواند اثرات پاداش‌دهنده داروهای غیرکانابینوئیدی را که بعداً در زندگی مصرف می‌شوند، تغییر دهد (Panlilio & Justinova, 2018).

مبانی نظری

گیاه *Cannabis sativa* L.

گیاه *Cannabis sativa* L. به دلیل منابع غنی از فیتوکمیکال‌ها، از زمان‌های قدیم برای مصارف دارویی آن شناخته شده است، از این رو دانشمندان تلاش کردند تا از پتانسیل دارویی آن استفاده کنند. اصطلاح شاهدانه برای تعریف محصولاتی (داروها و اسانس‌ها) است که از گیاه یک ساله *C. sativa* و گونه‌های آن که از خانواده Cannabaceae هستند استفاده می‌شود.

توصیف گیاه شناسی *C. sativa*

نام جنس *Cannabis* به معنای "عصا مانند" است در حالی که *sativa* به معنای "کاشته شده" است که نشان می‌دهد این گیاه از دانه تکثیر می‌شود نه از ریشه. اعتقاد بر این است که منشأ این گیاه در آسیا بوده و به طور گسترده در آفریقا دیده می‌شود. آسیای مرکزی و جنوب شرقی منشأ طبیعی بالقوه برای اهلی کردن جنس شاهدانه است و با نام‌های رایج مختلف در زبان‌های مختلف (کنف، ماری‌جوانا، کانابیس ساتیوا، گانجا، بانگ و البانگو) شناخته می‌شود. در آفریقای جنوبی، در زبان آفریکانسی به عنوان "داگا"^۱ شناخته می‌شود. از نظر طبقه‌بندی، کارل لینه^۲ (گیاه شناس سوئدی) اولین کسی بود که نام *Cannabis sativa* را ابداع کرد. گیاه شناسان دیگر اظهار داشتند که انواع مختلفی از شاهدانه بر اساس اندازه، شکل و محتوای رزین آنها (تکثیر و انتخاب) وجود دارد (Bonini et al., 2018).

^۱ dagga^۲ Carl Linnaeus

اختلال مصرف کانابیس

سوء مصرف حشیش اصطلاحی است که استفاده مداوم از کانابیس را با وجود اختلال در عملکرد روانی، فیزیکی یا اجتماعی توصیف می‌کند. با این حال، این یک تعریف پزشکی منسوخ است که قبلاً در راهنمای تشخیصی و آماری اختلالات روانی (DSM-IV-TR^۳) استفاده می‌شد.

اتیولوژی

مصرف حشیش بر اساس تعاریف جمعیت شناسی متفاوت است. تحقیقات نشان می‌دهد که دانشجویان و بزرگسالان جوان معمولاً از حشیش برای سازگاری اجتماعی (۴۲ درصد)، آزمایش (۲۹ درصد) و برای لذت بردن (۲۴ درصد) استفاده می‌کنند. ۱۲ درصد عمدتاً از این عامل برای مدیریت استرس یا آرامش استفاده می‌کنند. مطابق با مطالعات دیگر که استفاده از آن را برای افسردگی، اضطراب، اضطراب اجتماعی و اختلال استرس پس از سانحه مرتبط می‌دانند (Lee et al., 2007).

اپیدمیولوژی

نزدیک به چهار درصد از جمعیت جهان در سال ۲۰۱۵ از کانابیس استفاده می‌کردند. در میان نوجوانان، هشت درصد در ایالات متحده و ۱۶ درصد در اروپا مصرف کانابیس دارند. ۹ درصد از تمام کاربران اعتیاد را تجربه می‌کنند، که تقریباً یک پنجم آن در نوجوانی شروع به استفاده از آن کردند. شواهد محدودی برای مصرف حشیش در میان بیماران مسن وجود دارد. با این حال، مصرف آن ممکن است در حال افزایش باشد، زیرا مجوز قانونی برای استفاده پزشکی آن ممکن است استفاده از آن را در بین کاربران قبلی توجیه کند. در حرفه پزشکی، دستیاران سال اول روانپزشکی احتمال بیشتری دارد که به اختلال مصرف حشیش مبتلا شوند و به دنبال تجربیاتی برای مهار آن هستند. این افراد دارای سابقه مصرف آرامبخش و اضطراب نیز هستند (Fond et al., 2018).

مسیرهای پیام‌رسانی و عملکرد GDNF

به طور کلی دو مسیر اصلی برای فعالیت فاکتور GDNF شناخته شده است: ۱- فعالیت GDNF از طریق فعال شدن یک گیرنده پروتئوکوزنی به نام Ret^۴ صورت می‌گیرد. این گیرنده از خانواده تیروزین کینازها می‌باشد. در ابتدا GDNF به گیرنده اختصاصی خود GFRα1 متصل می‌شود که این اتصال باعث جذب Ret شده و با هم یک کمپلکس تشکیل می‌دهند.

GDNF و اعتیاد

در اعتیاد گیرنده‌های GDNF، GFRα1 و Ret در ناحیه VTA به میزان زیادی بیان شده‌اند، نورون‌های دوپامینرژیک در VTA نقش مهمی در مدار نورونی مربوط به رفتارهای اعتیادی دارند. همه انواع سوء مصرف مواد باعث افزایش سطح خارج سلولی دوپامین در NA جوندگان و انسان شده‌اند.

ژن *Amph*

مهم است که بدانیم چگونه در مغز، میلیون‌ها نورون با یکدیگر در بسیاری از سیناپس‌های متصل به هم ارتباط برقرار می‌کنند. پس از آزاد شدن انتقال دهنده عصبی توسط اگزوسیتوز، وزیکول‌های سیناپسی باید به طور مداوم از غشای پلاسمایی پیش-سیناپسی بازیافت شوند.

ژن *Polr2j*

Polr2j کد کننده‌ی زیرواحد RPB11-a از RNA پلیمراز وابسته به DNA است. این آنزیم با استفاده از چهار ریبونوکلوئید تری فسفات به عنوان سوپسترا، رونویسی DNA به RNA را کاتالیز می‌کند. *Polr2j* کد کننده‌ی جزئی از RNA پلیمراز II است که پیش سازهای mRNA و بسیاری از RNA های غیر کد کننده عملکردی را سنتز می‌کند.

تحقیقات انجام شده در ایران

علیپور و همکاران در سال ۲۰۲۱، تاثیر کابروگولین^۵ بر سطح سرمی GDNF و تأثیر آن بر پرهیز از متامفتامین در افراد تحت درمان برای اختلال مصرف متامفتامین بررسی شد. در این مطالعه ۶۰ مرد مبتلا به اختلال مصرف متامفتامین به طور تصادفی

³ Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

⁴ Rearranged during transfection receptor

در ۲ گروه دریافت کننده کابروگولین و دارونما قرار گرفتند. در طی ۱۲ هفته پیگیری، سطح سرمی GDNF، نتایج آزمایش ادرار برای مصرف متامفتامین و مقیاس افسردگی بین دو گروه مقایسه گردید. نتایج نشان داد که GDNF سرم در افرادی که از متامفتامین استفاده می کردند کمتر از افراد سالم بود. با این حال، سطح سرمی GDNF با مصرف کابروگولین مرتبط نبود. افزایش تعداد موارد مثبت در گروه دارونما روندی را نشان داد که منجر به عدم تفاوت معنی دار بین موارد مثبت و منفی در پایان هفته ۱۲ شد. با این حال، در گروه وروم^۵، تعداد قابل توجهی از مواردی که آزمایش آنها منفی بود (هوشیار) برای موارد مشاهده شده در مراحل اولیه همچنان تا پایان مطالعه به طور قابل توجهی بالاتر بود، که شبیه ارتباط بین درمان با کابروگولین و هوشیار ماندن است. با این حال، بهبودی از افسردگی با درمان کابروگولین ارتباطی نداشت (Alipour et al., 2021).

تحقیقات انجام شده در خارج از ایران

Maier و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان دادند که فاکتور نوروتروفیک مشتق از سلول گلیال (GDNF) نتایج امیدوارکننده ای را در مورد مهار مصرف الکل در مدل های جوندگان دارد. آن ها تنظیم اپی ژنتیک GDNF را به دنبال مصرف اتانول و خروج در یک مدل موش بررسی کردند. ۳۲ موش تحت ۷ هفته دسترسی متناوب به الکل قرار گرفتند. خون و ناحیه Tegmental شکمی (VTA)^۶ را بلافاصله ۲۴ ساعت پس از آخرین نوشیدن الکل جمع آوری کردند. سطوح mRNA با استفاده از PCR اندازه گیری شد. CP از AG در NAc^۸ به طور قابل توجهی در مقایسه با گروه شاهد کمتر متیله بود ($P < 0.05$). در NAc، بیان mRNA به طور قابل توجهی در WG^۹ بالاتر بود. در WG، سطح بیان mRNA در VTA به طور قابل توجهی پایین تر بود و متیلاسیون کمتری در NRE و در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. تغییرات در بیان mRNA مغزی مربوط به تغییرات در متیلاسیون DNA پروموتور GDNF در مدل موشی می باشد. نتایج آنها دارای ارتباطات بالینی است زیرا تفاوت در بیان mRNA GDNF و متیلاسیون DNA می تواند دلیلی برای مداخلات دارویی باشد (Maier et al., 2020).

Yazici و همکاران در سال ۲۰۲۱، سطوح Klotho، BDNF، NGF و GDNF در دوره ترک در کاربران مزمن کانابینوئید را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF^{۱۰})، فاکتور رشد عصبی (NGF^{۱۱})، فاکتور نوروتروفیک مشتق از گلیال (GDNF^{۱۲}) و سطوح سرمی کلوتو^{۱۳} یک گروه بیمار متشکل از ۲۷ مصرف کننده مزمن کانابیس و ۲۷ فرد سالم مقایسه شدند و روابط آنها با سایر ویژگی های بالینی سایر بیماران مورد ارزیابی قرار گرفت. مقیاس های بالینی، مقیاس پرخاشگری باس-پری^{۱۴}، و مقیاس ولع مصرف مواد در روز اول بستری و در روز هفتم ترک مجدد ثبت گردید. سطوح BDNF، GDNF، NGF و klotho با استفاده از روش الایزا مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از نظر کلوتو و سایر سطوح نوروتروفیک، هیچ تفاوتی بین گروه مصرف کننده کانابینوئید و گروه کنترل وجود نداشت، اما سن شروع مصرف کانابیس با این سطوح همبستگی منفی داشت. علاوه بر این، بین نمرات پرخاشگری کلامی و سطوح BDNF و NGF رابطه وجود داشت. بین کلوتو و فاکتورهای نوروتروفیک در همه گروه ها (گروه بیمار روز اول، گروه بیمار روز هفتم، گروه کنترل) همبستگی مثبت وجود داشت. هنگام مقایسه تفاوت بین همبستگی ها با استفاده از کوکور^{۱۵} (راه حلی جامع برای مقایسه آماری همبستگی ها)، همبستگی های klotho-GDNF و klotho-NGF برای روز اول گروه بیمار و گروه کنترل متفاوت بود (Yazici et al., 2021).

⁵ Cabergoline

⁶ verum

⁷ ventral tegmental area

⁸ N-acetylcysteine

⁹ Wegener's Granulomatosis

¹⁰ brain-derived neurotrophic factor

¹¹ nerve growth factor

¹² glial derived neurotrophic factor

¹³ Klotho

¹⁴ Buss-Perry Aggression Scale

¹⁵ between the correlations using the cocor

مواد و روش ها

مواد مورد استفاده

موادی که در تحقیق حاضر مورد استفاده قرار گرفتند در جدول ۱ ذکر شده‌اند.

جدول ۱- مواد مورد استفاده

مواد	شرکت سازنده
خوراک موش	بهپرور
GDNF	Sigma -SRP3239
بافر فسفات	Sigma-P4417
کیت استخراج RNA ترايزول	کيازيست / ايران
ايزوپروپانول	صنایع شیمیایی دکتر مجللی / ايران
آب عاری از RNase	Thermo / آمریکا
کیت سنتز cDNA (Easy cDNA Synthesis Kit)	پارس توس / ايران
مستر میکس PCR (Add SYBR Master with high) (Rox)	Addbio / کره
پرایمرها	سیناکلون / ايران

تجهیزات مورد استفاده

تجهیزات مورد استفاده در تحقیق حاضر، در جدول ۲ ذکر شده‌اند.

جدول ۲- تجهیزات مورد استفاده

تجهیزات	شرکت سازنده
سرنگ همیلتون	آمریکا
دستگاه استریوتاکیسی	RWD, 0755-86111281
فور	Vinteb
هود لامینار	بهسان لب / ايران
هود PCR	سبز / ايران
تانک الکتروفورز و منبع تغذیه	Mupid-ONE / ژاپن
اتوکلاو	کاوش مگا / ايران
سانتریفیوژ	Hettich / آلمان
ور تکس	کیاژن / ايران
ترانس لومیناتور	تایوان
Dry Block Heater	کیاژن / ايران
دستگاه PCR	ABI Stepone / آمریکا

تهیه و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی

در مجموع ۲۰ سر رت نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۱۸۰ گرم از انستیتو پاستور خریداری شده و به حیوان خانه دانشکده منتقل شد. موش‌ها در شرایط محیطی کنترل شده شامل دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت 55 ± 5 درصد و چرخه نور تا تاریکی ۱۲:۱۲ نگهداری شدند. رژیم غذایی آزمایشگاهی استاندارد و آب لوله کشی به طور آزاد برای موش‌ها فراهم شد. حیوانات دوره سازش پذیری یک هفته ای را طی نموده تا عوامل محیطی ناخواسته از قبیل جا به جایی، دما، نور و رطوبت روی نتایج آزمایش اثر نامطلوب نگذارد (شکل ۱). سپس موش‌ها به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند (جدول ۳).



شکل ۱- رت‌های تهیه شده جهت انجام آزمایش

جدول ۳- گروه‌بندی موش‌های گروه تجربی

گروه	توضیحات
گروه A شامل ۵ رت	رت‌هایی که سالم هستند و هیچ گونه بیماری دریافت نکردند.
گروه B شامل ۵ رت	رت‌هایی که معتاد به مخدر کانابیس هستند.
گروه C شامل ۱۰ رت	رت‌های معتاد به مخدر کانابیس که با هورمون <u>GDNF</u> درمان شده‌اند.

تهیه‌ی مخدر کانابیس ساتیوا و ایجاد مدل موش معتاد

ماده مخدر کانابیس ساتیوا از دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران به کد هرباریومی TEH-۷۱۵۱ به میزان ۴ گرم تهیه شد. این ماده توسط دکتر توکلی در دانشکده داروسازی تایید گردید (شکل ۲). در مرحله بعد رول‌های ۰/۲۵ گرمی مخدر کانابیس با پیپر تهیه شدند. یک دستگاه SMOCKING MACHINE با قدرت ۱۲ ولت برای انجام این کار توسط مهندسی مکانیک طراحی و تولید شد. اعتیاد به کانابیس طی ۶ دوره القا انجام شد که هر هفته دو بار القای اعتیاد صورت گرفت. برای این منظور هر بار یک رول ۰/۲۵ گرمی در قفس‌های ۵ تایی و دو رول ۰/۲۵ گرمی در قفس ۱۰ تایی دود شد.



شکل ۲- تهیه رول گیاه کانابیس ساتیوا

جراحی استریوتاکسی جهت تزریق GDNF

ابزار استریوتاکسی از سیستم مختصات سه بعدی برای جداسازی دقیق نقاط مورد نظر در مغز استفاده می‌کند، که محققان را قادر می‌سازد تا حداقل جراحی تهاجمی مانند تزریق دقیق را انجام دهند. این ابزار قابل استفاده برای هر دو نوع موش و موش صحرایی می‌باشد. میله‌های گوش در این دستگاه قابل نصب هستند. از طریق سوراخ گوش خارجی دو میله را وارد کرده و پس از تقارن در دو طرف سر، میله‌ها از طریق پیچ آنها محکم شدند. محل برش جمجمه با پنبه آغشته به بتادین ضد عفونی شده و با تیغ جراحی استریل برش در فاصله بین چشم‌ها و دو گوش در امتداد شیار ساژیتال میانی جمجمه انجام شد. پس از

خشک کردن سطح مجموعه به طور کامل در نقطه برگما (محل تقاطع درز تاجی و درز سهمی) لامبدا و خط واسط آن کاملاً مشخص گردید. با استفاده از اطلس پاکسینوس و واتسون مشخصات هیپوکمپ تعیین شده و تزریق GDNF در ناحیه هیپوکامپ با مختصات DV: +2.7 mm AP: -3.8 mm ML: ± 2.4 mm و BREGMA: -3.10 mm انجام گرفت. برای این منظور با محاسبه دقیق مکان های تزریق، این محلها با مته سوراخ شده و سپس به آرامی توسط سرنگ همیلتون میزان ۰/۲۵ میکروگرم GDNF به هیپوکمپ راست و ۰/۲۵ میکروگرم به هیپوکمپ چپ تزریق شد. مدت زمان تزریق بین ۶۰ تا ۹۰ ثانیه بوده و برای جلوگیری از خروج GDNF از داخل سوراخها، سرنگ به مدت ۵ دقیقه داخل محل تزریق باقی ماند تا جذب دارو صورت گیرد (شکل ۳). سپس محل برش بخیه زده شده و محل مورد ضدعفونی قرار گرفت. حیوانات پس از عمل جراحی به مدت یک هفته دوره بهبودی را طی کردند و در طول این مدت اقدامات و مراقبت های لازم (استفاده از جنتامایسین) صورت گرفته تا عفونتی برای حیوان در محل زخم پیش نیاید.



شکل ۳- تزریق GDNF با استفاده از جراحی استریوتاکسی به هیپوکمپ موش

ارزیابی رفتاری

آزمون پلاس ماز

این دستگاه بیشترین استفاده را در بررسی اضطراب در بخش مطالعات رفتاری حیوانات آزمایشگاهی (مخصوصاً جوندگانی چون موش سوری و رت)، به خود اختصاص داده است و از معتبرترین آزمونهای این حیطة بشمار می‌رود. این ابزار از چهار بازو به شکل بعلاوه و یک چهار پایه تشکیل یافته است. دو بازوی روبروی هم با دیواره های بلند و انتهای بسته، دالان تاریکی را بوجود آورده است و دو بازوی دیگر بدون دیواره و طبیعتاً روشن می‌باشند. یک دوربین در بالا و مرکز بعلاوه تعبیه می‌شود تا حرکات موش را ثبت کند (شکل ۴). به موشها اجازه داده شد که ماز را طی دوره زمانی پنج دقیقه‌ای آزادانه جست‌وجو کنند. طی این زمان، تعداد کل ورودها به بازوهای باز و بسته و نیز زمان گذرانده شده در بازوهای باز و بسته ثبت و ضبط می‌شود. قبل از آزمایش، در روز آزمون هر موش به طور جداگانه به مدت پنج دقیقه در جعبه‌ای با دیواره‌های پلکسی‌گلاس سیاه قرار گرفتند تا فعالیت جست‌وجوگرانه آن افزایش یابد. برای تعیین مقدار فعالیت حرکتی، تعداد ورودها به بازوی باز و بسته اندازه‌گیری شدند (Ookawa et al., 2007).



شکل ۴- محیط انجام آزمون پلاس ماز

آزمون زمینه باز

آزمون اوپن فیلد یا زمینه باز، معمولاً برای مطالعات رفتاری، نقص حرکتی و اضطراب و افسردگی در حیوانات آزمایشگاهی مانند موش سوری و رت به کار می‌رود. این تست در مطالعه و ارزیابی اثرات داروهای ضد اضطراب و افسردگی و همچنین عکس العمل اعضای حرکتی به موادی مانند مواد مخدر و واکنشهای رفتاری، بسیار مفید و کارا است. این ابزار از یک مربع خالی و معمولاً به رنگ روشن با دیواره‌های بلند تشکیل یافته است (شکل ۵). معمولاً حیوان را در مرکز این ابزار قرار می‌دهند و رفتار حیوان را در یک بازه زمانی ثبت می‌کنند. برای انجام آزمون، حیوان به آرامی و به صورت تصادفی در یکی از چهار گوشه‌ی دستگاه قرار داده شده و اجازه داده شد تا محیط دستگاه را آزادانه به مدت ۵ دقیقه کاوش کند. در طول این مدت، رفتار موش از طریق دوربین قابل مشاهده بود. بعد از انجام آزمون، موش‌ها به قفس‌هایشان منتقل شده و کف و دیواره‌های دستگاه هر بار توسط پنبه‌ی آغشته به الکل ۷۰٪ برای جلوگیری از اثرات بوی برجای مانده از حیوان قبلی تمیز شده و اجازه داده شد در بین هر آزمون خشک شود. طی دو روز متوالی این آزمون تکرار شده و میزان عبور از خطوط ثبت و امتیازدهی انجام شد (Habr et al., 2011).



شکل ۵- محیط انجام آزمون زمینه باز

آزمون ترجیح سوکروز

تست ترجیح سوکروز برای بررسی افسردگی در حیوانات به کار می‌رود. قبل از انجام آزمایش، حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. پس از یک روز سازگاری با محیط، دو بطری یکسان، یکی حاوی آب لوله کشی و دیگری حاوی ساکارز ۲٪، در دسترس حیوانات قرار داده شد (شکل ۶). موقعیت بطری‌ها جهت جلوگیری از تمایل روانی به یک بطری خاص، هر ۱۲ ساعت یک بار عوض شد. مقدار محلول ساکارز و آب مصرف شده، بلافاصله پس از تست، با وزن کردن بطری‌ها محاسبه شد. ترجیح

ساکارز به عنوان درصد محلول ساکارز مصرف شده نسبت به کل مایع مصرفی محاسبه گردید. موش‌هایی که در معرض استرس مزمن قرار می‌گیرند، بعد از استرس هفتگی به مدت چند هفته، تمایل کمتری برای مصرف سوکروز دارند. اگر مواجهه با استرس قطع شود مصرف سوکروز پس از مدتی نرمال می‌گردد (Zavvari & Karimzadeh, 2015).



شکل ۶- محیط انجام آزمون ترجیح سوکروز

ارزیابی بیان ژن در بافت مغز

بیان ژن‌های *Amph* و *Polr2j* در بافت مغز موش‌های مورد آزمایش، بررسی گردید. برای این منظور موش‌ها با کلروفرم کشته شده و مغز آن‌ها خارج گردید (شکل ۷).



شکل ۷- جداسازی بافت مغز موش‌ها جهت مطالعات مولکولی

استخراج RNA

جهت استخراج RNA در این پژوهش از محلول ترایزول و طبق روش زیر استفاده شد (تمامی مراحل روی یخ انجام شد و سانتریفیوژها با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار انجام گردید).

۱. ۱۰۰ میلی گرم از بافت هموزن شده‌ی مغز با ۱ میلی لیتر ترایزول مخلوط شد تا لیزات سلولی به دست آید.
۲. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به نمونه‌ها اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شد تا به خوبی مخلوط شوند.
۳. ۵۰۰ میکرولیتر از بافر تیازول به رسوب سلولی اضافه شده با سمپلر به خوبی پیپتاژ کرده تا سلول‌ها به خوبی از هم جدا و لیز شوند. میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد.
۴. میکروتیوب به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شد سپس به آن ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه کرده دوباره به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس و ۱۰ دقیقه روی یخ انکوبه گردید.
۵. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند.

۶. در این مرحله سه فاز قابل مشاهده است که فاز رویی حاوی مولکول‌های RNA می‌باشد، با احتیاط فاز رویی جدا شده و داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری دیگر ریخته شد و ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال انکوبه شدند.
۷. پس از گذشت مرحله انکوباسیون میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند.
۸. محلول رویی تخلیه و به رسوب سلولی ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد سرد اضافه گردید، توسط سمپلر رسوب RNA در داخل اتانول پیپتاژ شد، سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. (این مرحله ۲ بار انجام شد)
۹. میکروتیوب‌های حاوی رسوب RNA را با درب باز زیر ورک استیشن گذاشتیم تا بقایای اتانول تبخیر شود.
۱۰. به رسوب‌ها ۳۰ میکرولیتر DEPC water با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، اضافه شد و با سمپلر پیپتاژ گردید تا محلول همگن شود.
۱۱. نمونه‌های استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای نگهداری کوتاه مدت قرار داده شدند.

سنجش کمی RNA استخراج شده

به منظور تعیین مقدار RNA استخراج شده و درجه خلوص آن از نانودرآپ در طول موج فرابنفش استفاده شد RNA و DNA در طول موج ۲۶۰ nm و پروتئین در طول موج ۲۸۰ نانومتر جذب دارند. ۱ میکرولیتر از محلول حاوی RNA استخراج شده را برداشته و OD در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر قرائت شد. لازم به یادآوری است که محلول نهایی تخلیص شده باید OD ۲۶۰/۲۸۰ بیشتر از ۱/۸ داشته باشد. نسبت‌های کمتر از ۱/۸ مشخص‌کننده آلودگی با پروتئین و ترکیبات آروماتیک (نظیر فنل) است. در این‌گونه موارد نمونه باید دوباره تخلیص شود. همچنین OD خوانده شده به هیچ وجه نشانه‌ای از سایز و اندازه RNA نمی‌دهد.

سنجش کیفی RNA استخراج شده

به سبب اینکه ماکرومولکول‌های زیستی باردار هستند، می‌توان با قرار دادن آنها در یک میدان الکتریکی، آنها را بر اساس خواص فیزیکی مانند شکل فضایی، وزن مولکولی و بار الکتریکی، تفکیک کرد. برای این منظور از روشی بنام ژل الکتروفورز استفاده می‌شود.

به منظور آماده سازی ژل آگارز، ابتدا حجم مورد نیاز ژل آگارز برای تانک الکتروفورز با اندازه‌گیری ابعاد قالب تانک مشخص گردید. با توجه به آنکه ژل آگارز ۲٪ مد نظر بود، برای این منظور ۱/۲۷ گرم آگارز به ۷۵ میلی‌لیتر بافر TBE اضافه شد و به مدت ۱ دقیقه در ماکروبو قرار گرفت تا بجوشد. پس از سرد شدن، ۳/۵ میکرولیتر اتیدیوم بروماید به مخلوط فوق اضافه گردید و سپس مخلوط داخل قالب مخصوص الکتروفورز ریخته شد. پیش از آن شانه‌ی مخصوص جهت ایجاد چاهک در ژل، در جای مناسب خود قرار گرفت. با سفت شدن مخلوط، ژل آگارز آماده و به تانک مخصوص منتقل گردید.

برای بارگذاری نمونه در ژل، ۱۰ میکرولیتر از RNA به چاهک‌ها در ژل آگارز منتقل شد. جهت اطمینان از صحت کار و همچنین بررسی وجود باندهای مورد نظر از لدر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی استفاده شد که مقدار ۳ میکرولیتر از آن در چاهک مناسب بارگذاری گردید. پس از بارگذاری نمونه‌ها تانک الکتروفورز به منبع تغذیه^{۱۶} متصل گردید. با توجه به بار منفی مولکول‌های RNA این مولکول‌ها به طرف الکترود مثبت حرکت می‌کنند. الکتروفورز با جریان ۹۸ ولت به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد.

پس از انجام الکتروفورز، ژل در دستگاه ترانس‌لومیناتور قرار داده شد. این دستگاه با تابش نور فرابنفش (UV) باعث مشخص شدن باندهای ایجاد شده بر روی ژل می‌شود و باندهای موجود با توجه به وزن مولکولی و مقایسه با لدر مولکولی و نتایج مربوط به سویه‌های کنترل مثبت و کنترل منفی، مورد بررسی قرار گرفتند. در انتها از ژل عکس گرفته شد.

¹⁶ Power Supply

سنتز cDNA

سنتز cDNA به روش زیر انجام شد:

- مقدار ۱ میکروگرم از RNA با ۱ میکرولیتر پرایمر OligodT مخلوط و با DEPC water به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط حاصل پیپتاژ شده و پس از فیوژ مختصر، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و بلافاصله روی یخ قرار داده شد.
- مخلوط واکنش با حجم ۵ میکرولیتر به نمونه‌ها اضافه شده، حجم نهایی واکنش ۱۰ میکرولیتر بود.
- نمونه‌ها در ترموسایکلر قرار داده شده و برنامه دمایی مطابق با جدول ۴ اجرا گردید. نمونه‌های cDNA تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جدول ۴- برنامه دمایی سنتز cDNA

مرحله	دما	زمان	تعداد سیکل
RT-PCR	۲۵ درجه سانتی‌گراد	۱۰ دقیقه	1X
	۴۷ درجه سانتی‌گراد	۶۰ دقیقه	
	۸۵ درجه سانتی‌گراد	۵ دقیقه	
خنک کردن	۴ درجه سانتی‌گراد	۲ دقیقه	1X

طراحی و تهیه پرایمر

برای طراحی پرایمر از دو نرم افزار Gene Runner و Primer3 استفاده شد. توالی ژن‌ها نیز از طریق وب سایت NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) مشخص گردید. به دلیل هدف مطالعه مبنی بر سنجش بیان ژن نیاز بر این بود که از توالی mRNA استفاده گردد و همچنین محل اتصال پرایمرها در نواحی اتصال اگزون‌ها انتخاب شود. در طراحی پرایمرها نکات زیر مورد توجه قرار گرفت:

طول پرایمرها بین ۲۰-۱۸ نوکلئوتید انتخاب و نیز طول امپلیکون ۲۰۰-۷۰ جفت باز منظور شد. دمای ذوب مطلوب $^{\circ}\text{C}$ ۶۱-۵۸ و درصد بازهای GC بین ۸۰-۳۰ درصد معین شد. پس از انتخاب پرایمرها، توالی آنها از نظر اتصال با جایگاه ژنی مورد نظر BLAST شد و نیز برای کنترل بیشتر پرایمرها از دید اتصال یا عدم اتصال به DNA از وب سایت NCBI استفاده گردید. پس از طراحی، پرایمرهای ویژه سنجش بیان ژن جهت سنتز، توالی الیگونوکلئوتیدی به شرکت یکتا ژن فناوران ارسال گردید (جدول ۵).

جدول ۵- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای واکنش Real time PCR

نام ژن	توالی پرایمر
r-Polr2j-F	AGGGCGAGAAGAAAATCACCA
r-Polr2j-R	AAGGGGTGAGGGACTTTGTA
r-Amph-F	CAAGAGGCAGAGGGTACCAGA
r-Amph-R	ACATCTTCCCGTCCATACCAA
r-GAPDH-F	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
r-GAPDH-R	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

واکنش Real time PCR

Real-time PCR تکنیکی برای مشاهده ی لحظه به لحظه فرایند تکثیر اسید نوکلئیک می باشد. مشکلات و نواقص عدیده موجود در PCR های معمول، همراه با نیاز به یک روش تعیین کمی دقیق، زمینه گشایش عرصه ای نوین در تکنیک PCR را فراهم آورد. در این تکنیک از رنگ‌هایی استفاده می شود که پس از اتصال به ساختار دو رشته ای DNA، نور فلورسانس منتشر می کنند.

بنابراین در طی واکنش PCR، به موازات افزایش غلظت DNA، میزان ثبت جذب فلورسانس در واکنش توسط شناساگر دستگاه افزایش می یابد. با اندازه گیری شدت نور فلورسانس در انتهای هر سیکل، نهایتاً یک منحنی بدست می آید. سپس با استفاده از نمودارهای استاندارد، غلظت DNA هدف در نمونه مورد مطالعه محاسبه می شوند. مولکول های گزارشگر فلوروسنت یا به صورت رنگ هایی می باشند که به DNA دو رشته ای متصل می شوند، مانند SYBR® Green و یا بصورت شناساگرهای توالی های خاص مانند TaqMan® Probes می باشند. پس از سنتز cDNA واکنش Real-time PCR انجام شد. مواد واکنش با توجه به جدول ۶ در میکروتیوب با هم مخلوط شدند و با برنامه دمایی جدول ۷ در دستگاه قرار داده شد. دمای اتصال پرایمر برای هر دو ژن طبق دمای T_m ، ۶۰ درجه سانتی گراد محاسبه شد. منحنی های تکثیر و ذوب تمامی نمونه های بررسی شد. واکنش به صورت سه بار تکرار انجام شد. نمونه های فاقد منحنی های استاندارد از مطالعه حذف و واکنش Real-time PCR برای آن نمونه ها تکرار شد.

جدول ۶- مقادیر استفاده جهت واکنش Real-time PCR

ترکیبات	حجم
مستر میکس سایبرگرین	۵ میکرولیتر
پرایمر رفت (۱۰ میکرومولار)	۰/۵ میکرولیتر
پرایمر برگشت (۱۰ میکرومولار)	۰/۵ میکرولیتر
آب	۳ میکرولیتر
نمونه cDNA	۱ میکرولیتر
حجم نهایی	۱۰ میکرولیتر

جدول ۷- برنامه دمایی واکنش Real time PCR

مرحله	دما	زمان	سیکل
دنا تورا سیون اولیه	۹۵ درجه سانتی گراد	۵ دقیقه	1X
تکثیر	۹۵ درجه سانتی گراد	۱۵ ثانیه	40X
	۶۰ درجه سانتی گراد	۱۵-۲۰ ثانیه	
	۷۲ درجه سانتی گراد	۱۵-۳۰ ثانیه	
منحنی ذوب	۹۵ درجه سانتی گراد	۱۵ ثانیه	1X
	۶۰ درجه سانتی گراد	۱ دقیقه	
	۶۵-۹۵ درجه سانتی گراد	۰/۳ درجه بر ثانیه	
خنک کردن	۳۰ درجه سانتی گراد	۲۰ ثانیه	1X

منحنی ذوب

پس از انجام آزمایش، به منظور تایید تکثیر قطعات اختصاصی هر ژن و عدم حضور محصولات غیراختصاصی و پرایمر دایمر، نمودار منحنی ذوب برای هر ژن مورد بررسی قرار گرفت. در واکنش Real Time، دستگاه علاوه بر کنترل سنتز DNA در طی واکنش و رسم نمودار تکثیر، نقطه ذوب محصول را در انتهای واکنش تعیین و منحنی ذوب را ترسیم می نماید. دمای ذوب DNA دو رشته ای به محتوای بازی آن بستگی دارد. در این دما نیمی از DNA دو رشته ای دنا توره و به صورت تک رشته ای در می آید در نتیجه میزان فلورسانس کاهش می یابد. تمام محصولات PCR که توسط یک جفت پرایمر خاص تولید می شوند دمای ذوب یکسان دارند. همانطور که پیشتر ذکر شد سایبرگرین قادر به تمایز بین DNA هدف و دیگر DNA های دو رشته ای نمی باشد. در طی واکنش اطمینان از صحت و اختصاصیت اندازه گیری نکته بسیار مهمی است. رسم نمودار منحنی ذوب امکان تشخیص وجود آلودگی، دایمرهای پرایمر و همچنین DNA غیراختصاصی را فراهم می آورد. جهت رسم این نمودار دستگاه دما را با فواصل معین در یک بازه دمایی بین ۹۵-۶۵ درجه به تدریج و با سرعت ۰/۱ درجه سانتی گراد بر ثانیه افزایش داده و میزان فلورسانس را در هر نقطه اندازه گیری می نمایند. محور Y در این نمودار سرعت تغییر در واحد فلورسانس

متناسب با زمان و محور X تغییر دما را نشان می‌دهد. در این نمودار دمای ذوب یا T_m ^{۱۷} قله نمودار می‌باشد. چنانچه قله‌های متعدد و متفاوتی در منحنی ذوب وجود داشته باشد نشانگر وجود آلودگی، دایمرهای پرایمر و همچنین DNA غیراختصاصی می‌باشد. در ناحیه چپ قله اصلی، قله‌ها با دمای ذوب کمتر دیده می‌شود که مربوط به پرایمر دایمر می‌باشد. در ناحیه سمت راست قله اصلی قله‌ها با دمای ذوب بیشتر مربوط به محصولات غیراختصاصی می‌باشند. همچنین در مواردی که هیچگونه DNA هدفی در واکنش دیده نشود منحنی ذوب قله ندارد.

آنالیز داده‌های بیان ژن

در ارزیابی نسبی از چندین روش متفاوت استفاده می‌شود که عبارتند از:

- ارزیابی نسبی با استفاده از دو منحنی استاندارد
- روش $\Delta\Delta Ct$

برای بررسی به روش نسبی تغییرات میزان بیان ژن در دو حالت مختلف به کار می‌رود. به این منظور Ct بدست آمده برای دو حالت بر هم تقسیم می‌شود. نسبت بدست آمده بیانگر میزان افزایش یا کاهش بیان ژن در این دو حالت است. لازم است برای حذف این ناهمسانی از یک ژن که بیان آن در سلول تحت هر شرایط یکسان است به عنوان رفرنس استفاده بشود. این ژن باید از خانواده ژن‌های خانه‌دار انتخاب شود. در این مطالعه از ژن *GAPDH* به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. در روش $\Delta\Delta Ct$ بیان نمونه‌ها بدون نیاز به منحنی استاندارد در زمان مشاهده سطوح بیان نسبت به کنترل مرجع سنجیده می‌شود. برای آنالیز داده‌ها، یکی از نمونه‌ها به عنوان مرجع (نرمالایزر) در هر آزمایش انتخاب می‌شود و عملیات زیر به ترتیب انجام می‌شود:

- پس از انجام و پایان یافتن واکنشها، ابتدا میانگین Ct هر نمونه محاسبه می‌شود.
- تفاوت بین ژن هدف و ژن مرجع به صورت ΔCt محاسبه می‌شود:

$$\Delta Ct = Ct (\text{هدف}) - Ct (\text{مرجع})$$

- سپس تفاوت بین نمونه‌های شاهد و نمونه‌های مورد آزمایش به صورت $\Delta\Delta Ct$ محاسبه می‌شود:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{شاهد}) - \Delta Ct (\text{آزمون})$$

آخرین بخش، محاسبه Fold chang از طریق فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ می‌باشد.

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آنالیزهای آماری این پژوهش توسط نرم‌افزار SPSS ver.16 انجام شد. نمودارها توسط نرم‌افزار GraphPad-Prism ترسیم شدند. در تمامی مراحل $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

اهداف تحقیق

هدف اصلی

ارزیابی بیان ژن‌های *Amph* و *Polr2j* در موش‌های مدل معتاد به کانابیس قبل و پس از درمان با GDNF

اهداف فرعی

- ایجاد مدل موش معتاد به کانابیس
- درمان موش‌ها با GDNF
- استخراج RNA از بافت مغز و سنتز cDNA
- بررسی بیان ژن‌های *Amph* و *Polr2j* با روش Real time PCR

هدف کاربردی

ارائه راهکار درمانی برای اعتیاد به کانابیس

¹⁷ Melting temperature

فرضیات تحقیق

- GDNF دارای پتانسیل درمانی برای اعتیاد به کانابیس‌ها می‌باشد.
- GDNF باعث تغییر بیان ژن *Amph* در بافت مغز موش‌های معتاد به کانابیس می‌گردد.
- GDNF باعث تغییر بیان ژن *Polr2j* در بافت مغز موش‌های معتاد به کانابیس می‌گردد.

بحث

GDNF عضوی از ابرخانواده فاکتور رشد تبدیل کننده- β ($\text{TGF-}\beta$) است و به طور گسترده در مغز پستانداران بیان می‌شود. GDNF اثرات خود را عمدتاً از طریق اتصال به گیرنده‌های $\alpha 1$ خانواده GDNF ($\text{GFR } \alpha 1$) و فعال‌سازی سیگنالینگ تیروزین کیناز اعمال می‌کند. GDNF به دلیل خواص محافظت کننده عصبی، به ویژه در برابر آسیب اکسیداتیو و التهابی عصبی، به عنوان یک عامل حیاتی برای بقا و حفظ نورون‌های دوپامینرژیک و سروتونرژیک در نظر گرفته می‌شود. علاوه بر این، به نظر می‌رسد تعامل بین GDNF و مسیرهای دوپامینرژیک در حافظه و یادگیری نقش دارد (Sharma et al., 2016).

GDNF نقش اساسی در رشد کلیه‌ها و نورون‌های محیطی ایفا می‌کند و همچنین مشخص شده است که بقای عصبی نورون‌های دوپامینرژیک مزانسفالیک (DAergic) را در بزرگسالان پس از آسیب افزایش می‌دهد. به این ترتیب، پتانسیل آن به عنوان یک عامل درمانی برای درمان پاتولوژی‌هایی مانند بیماری پارکینسون به طور گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته است. اخیراً نقش GDNF در اعتیاد پیشنهاد شده است. جالب توجه است که GDNF برای مقابله با سازگاری‌های بیوشیمیایی و رفتاری ناشی از مواد مخدر عمل می‌کند (Ron & Janak, 2005).

با توجه به افزایش روزافزون اعتیاد به کانابیس در جوامع مختلف، در تحقیق حاضر اثر GDNF بر مغز موش‌های معتاد به کانابیس مورد آزمایش قرار گرفت. ابتدا آزمون‌های رفتاری شامل پلاس ماز، زمینه باز و ترجیح سوکرورز انجام شد تا تغییرات رفتاری موش‌های معتاد نسبت به موش‌های کنترل، و همچنین موش‌های درمان شده با GDNF مورد بررسی قرار گیرد. نتایج حاصل نشان داد که در مجموع یک سری تفاوت‌ها در الگوهای رفتاری موش‌های معتاد نسبت به موش‌های کنترل ایجاد می‌شود که پس از درمان با GDNF این الگوهای رفتاری مجدداً تغییر کرده و به موش‌های کنترل نزدیک می‌گردد. بیان دو ژن *Amph* و *Polr2j* نیز در مغز موش‌های مورد مطالعه، بررسی گردید. نتایج حاصل نشان داد که اعتیاد به کانابیس بیان هر دو ژن را به شدت کاهش می‌دهد. همچنین مشخص گردید که درمان موش‌های معتاد با GDNF بیان هر دو ژن را افزایش می‌دهد.

GDNF یک پروتئین ترشحی است که بیشتر به دلیل نقشش در توسعه سیستم عصبی مرکزی و محیطی و بقای نورون‌های دوپامینرژیک بالغ شناخته شده است. اخیراً، شواهد نشان می‌دهد که GDNF نقش منحصر به فردی در تنظیم منفی اعمال مواد مخدر ایفا می‌کند که نشان می‌دهد مسیر GDNF می‌تواند یک هدف امیدوارکننده برای درمان اعتیاد باشد (Carnicella & Ron, 2009).

در طی چندین سال گذشته، داده‌هایی جمع‌آوری شده است که GDNF را در نفی مکانیسمی که زمینه‌ساز رفتارهای نوشیدن اتانول است، دخیل می‌داند. یک تجویز واحد از GDNF در ناحیه تگمنتال شکمی (VTA)، موش‌ها منجر به کاهش سریع مصرف خودسرانه اتانول می‌شود (Carnicella et al., 2008). نکته مهم این است که تجویز GDNF در VTA باعث کاهش مصرف سطوح متوسط اتانول در الگویی شبیه به نوشیدن اجتماعی و همچنین در مدل‌های نوشیدن بیش از حد و اعتیاد اتانول می‌شود. به طور خاص گزارش شده است که GDNF در VTA باعث تضعیف اثرات محلول اتانول ۱۰ درصد در موش صحرایی می‌شود (He et al., 2005). علاوه بر این، تزریق GDNF درون VTA در کاهش مصرف اتانول در موش‌هایی که برای نوشیدن سطوح بالای محلول اتانول ۲۰ درصد آموزش دیده بودند، مؤثر بود. عملکرد GDNF برای کاهش مصرف خودسرانه اتانول احتمالاً محدود به VTA است، زیرا تزریق آن به ناحیه مغز میانی مجاور، تاثیری بر مصرف اتانول نداشت (Carnicella et al., 2008).

Maier و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان دادند که فاکتور نوروتروفیک مشتق از سلول گلیال (GDNF) نتایج امیدوارکننده‌ای را در مورد مهار مصرف الکل در مدل‌های جوندگان دارد. آن‌ها تنظیم اپی ژنتیک GDNF را به دنبال مصرف اتانول و خروج در یک مدل موش بررسی کردند. آن‌ها گزارش کردند که تغییرات در بیان mRNA مغزی مربوط به تغییرات در متیلاسیون DNA پروموتور GDNF در مدل موشی می‌باشد. نتایج آنها دارای ارتباطات بالینی است زیرا تفاوت در بیان mRNA GDNF و متیلاسیون DNA می‌تواند دلیلی برای مداخلات دارویی باشد (Maier et al., 2020).

GDNF بر روی اعتیاد به محرک‌های روانی نیز تاثیر دارد. جالب توجه است که سیستم درون زای GDNF در پاسخ به قرار گرفتن در معرض محرک‌های روانی تغییر می‌کند. گزارش شده است که بیان GDNF در NAc، ۲۴ ساعت پس از مواجهه مکرر با متامفتامین (Niwa et al., 2007) و همچنین در VTA پس از قرار گرفتن در معرض مکرر فنسیکلیدین افزایش یافت (Semba et al., 2004). علاوه بر این، نشان داده شده است که ۱۲ روز مصرف خودسرانه کوکائین بیان GDNF را در جسم مخطط پشتی کاهش می‌دهد (Green-Sadan et al., 2003). از آنجایی که تجویز برون زای GDNF سازگاری بیوشیمیایی و رفتاری با کوکائین را مهار می‌کند و قرار گرفتن مکرر در معرض محرک‌های روانی سطوح GDNF و مسیر سیگنال دهی GDNF را تغییر می‌دهد، ممکن است GDNF درون زای نقش در تنظیم اثرات محرک‌های روانی ایفا کند. در تایید این فرضیه، Messer و همکاران نشان دادند که تزریق داخل VTA آنتی بادی‌های خنثی کننده ضد GDNF، که از اتصال GDNF و در نتیجه فعال شدن گیرنده‌های آن جلوگیری می‌کند، منجر به افزایش حساسیت موش‌ها به اثر پاداش کوکائین می‌شود (Messer et al., 2000).

علیپور و همکاران در سال ۲۰۲۱، تاثیر کابریولین بر سطح سرمی GDNF و تأثیر آن را بر پرهیز از متامفتامین در افراد تحت درمان برای اختلال مصرف متامفتامین بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که GDNF سرم در افرادی که از متامفتامین استفاده می‌کردند کمتر از افراد سالم بود. با این حال، سطح سرمی GDNF با مصرف کابریولین مرتبط نبود (Alipour et al., 2021).

برخی داده‌ها نشان می‌دهند که GDNF فنوتیپ‌های مرتبط با اپوئیدها را نیز به طور منفی تنظیم می‌کند. گزارش شده است که تزریق GDNF درون VTA از افزایش سطوح تیروزین هیدروکسیلاز در VTA ناشی از مواجهه مزمن با مورفین جلوگیری می‌کند (Messer et al., 2000). همچنین نشان داده شده است که تزریق حاد و چالش برانگیز مورفین باعث افزایش بیشتر سطح دوپامین خارج سلولی تجمعی GDNF در موش‌ها می‌شود، که نقش مهم GDNF را در تنظیم جسم مخطط نشان می‌دهد (Airavaara et al., 2006; Airavaara et al., 2007). پاسخ دوپامین به مواد اپوئیدی جالب توجه است که این اثر با تجویز حاد کوکائین مشاهده نشده است (Airavaara et al., 2004). کوکائین غلظت خارج سلولی دوپامین را با مسدود کردن بازجذب آن در سطح سیناپسی افزایش می‌دهد، در حالی که مورفین این کار را با تحریک نورون‌های دوپامینرژیک VTA انجام می‌دهد (Koob et al., 1998). بنابراین، قابل قبول است که GDNF پاسخ دوپامین را با اثر مستقیم بر تحریک پذیری نورون‌های دوپامینرژیک در VTA تنظیم می‌کند، اما بر مکانیسم‌های آزادسازی دوپامین تاثیری ندارد.

Messer و همکاران در سال ۲۰۰۰ نقش GDNF را در سازگاری با مواد مخدر مورد بررسی قرار دادند. تزریق GDNF به VTA که یک ناحیه دوپامینرژیک مغز است که در اعتیاد مهم می‌باشد، سازگاری‌های بیوشیمیایی خاصی را با کوکائین یا مورفین مزمن داشت و همچنین اثرات مفید کوکائین را مسدود می‌کرد. برعکس، پاسخ به کوکائین در موش‌ها با تزریق داخل VTA آنتی‌بادی ضد GDNF و در موش‌های هتروزیگوت برای جهش null در ژن GDNF افزایش یافت. قرار گرفتن در معرض مزمن مورفین یا کوکائین باعث کاهش سطح phosphoRet، پروتئین کیناز که واسطه سیگنال دهی GDNF است، در VTA گردید. این نتایج یک حلقه بازخورد را نشان می‌دهد، که به موجب آن مواد اپوئیدی سیگنال‌دهی را از طریق مسیرهای درون‌زای GDNF در VTA کاهش می‌دهند، که سپس حساسیت رفتاری را نسبت به مواجهه بعدی با مواد افزایش می‌دهد (Messer et al., 2000).

با توجه به موارد ذکر شده، GDNF به عنوان یک ترکیب ضد اعتیاد در سوء مصرف انواع مختلف مواد همچون الکل، اپوئیدها و محرک‌های روانی عنوان شده است. با این حال نقش آن در اعتیاد به ماری‌جوانا تا کنون بررسی نشده است. در تحقیق حاضر

اثر GDNF بر اعتیاد به کانابیس در موش مطالعه شد. نتایج حاصل نشان داد که تزریق GDNF موجب تغییرات رفتاری در موش‌ها می‌گردد. موش‌های معتاد پس از دریافت GDNF رفتارهایی مشابه با موش‌های کنترل نشان دادند. علاوه بر مطالعات رفتاری، مطالعات مولکولی نیز انجام شد. برای این منظور بیان دو ژن *Amph* و *Polr2j* در مغز موش‌های کنترل، موش‌های معتاد به کانابیس و موش‌های درمان شده با GDNF مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان دهنده کاهش معنادار بیان هر دو ژن در موش‌های معتاد نسبت به موش‌های کنترل بود. از طرفی درمان با GDNF موجب شد که بیان هر دو ژن مجدداً افزایش یابد.

آمفیفیزین I یک پروتئین سیناپسی با دامین N-Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) است که در اندوسیتوز با واسطه کلاترین نقش دارد. در طول تشکیل وزیکول‌های پیش سیناپسی تازه بازبایی شده، آمفیفیزین I انحنا را تسهیل می‌کند تا میانجی وزیکول‌های سیناپسی در داخل و شکافت سیناپسی شود. آمفیفیزین I همچنین به عنوان یک پروتئین پیوند دهنده با دینامین، کلاترین، آمفیفیزین II و سایر دفسفین‌ها در مجموعه پوشش داده شده با کلاترین عمل می‌کند. علاوه بر این، آمفیفیزین I با فعال کننده CDK5 p35 نیز تعامل دارد. بیان آمفیفیزین I در نواحی مغز با توده‌های تائو هیپرفسفریله کاهش می‌یابد، که نشان می‌دهد اختلال عملکرد آمفیفیزین I در پاتوژن بیماری‌هایی مانند آلزایمر نقش دارد (Zhang et al., 2021). BIN1 که همچنین به عنوان آمفیفیزین II شناخته می‌شود، عضوی دیگری از خانواده BAR است که دینامیک غشاء را تنظیم می‌کند و واسطه انتقال پروتئین و اندوسیتوز است. در نورون‌ها، BIN1 به طور برجسته در پایانه‌های پیش سیناپسی تحریک‌کننده بیان می‌شود، اما در بخش‌های پس سیناپسی با بیان کمتر نیز شناسایی شده است. تغییر بیان BIN1 با تولید پپتید Aβ در آکسون‌ها و گسترش تائو در اتصال مدار در آلزایمر مرتبط است (Fu & Ip, 2022). از طرفی در افرادی که سو مصرف به مواد دارند نورودجنراتیو یا مرگ سلول‌های عصبی اتفاق می‌افتد و با وجود مطالعات انجام شده هنوز مکانیسم مرگ سلولی در این بیماری مشخص نشده است. به نظر می‌رسد که یکی از مسیرهای تاثیر ماریجوانا بر مغز، اثر بر پروتئین تائو و ایجاد سیس تائوژیس می‌باشد (Battistella et al., 2014). همچنین نقش آمفیفیزین در سایر مکانیسم‌ها مرتبط با تکامل عصبی نشان داده شده است. شبه کیناز ۵ وابسته به سیکلین (CDKL5) یک پروتئین کیناز Ser/Thr است که عمدتاً در مغز بیان می‌شود و جهش‌های ژن آن با اختلالات عصبی رشدی مانند سندرم وست وابسته به X و سندرم رت مرتبط است. نشان داده شده است که آمفیفیزین I سوبسترای سیتوپلاسمی برای CDKL5 است و فسفوریلاسیون آن می‌تواند نقش مهمی در رشد عصبی داشته باشد (Sekiguchi et al., 2013).

Hamamura و همکاران در سال ۲۰۱۳، تاثیر تجویز مکرر متامفتامین در مخ و مخچه موش صحرایی بر سطوح آمفیفیزین I، دینامین I و بیان mRNA سیناپتوجانین را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه، کلون cDNA، شبیه به mRNA آمفیفیزین ۱ (پروتئین وزیکول) از نئوکورتکس موش‌های صحرایی جداسازی گردید. موش‌ها به طور مکرر با متامفتامین تزریق شدند. هیپریداسیون درجا نشان داد که mRNA ژن *Amph 1* در مخ، تالاموس داخلی، هیپوکامپ و مخچه بیان می‌شود. در مخچه، بیان mRNA ژن *Amph 1* به لایه سلولی گرانول بالایی محدود شد. تجویز مکرر متامفتامین بیان mRNA ژن *Amph 1* را در هر دو قسمت قدامی مخ و مخچه افزایش داد. با این حال، تجویز مکرر بیان mRNA سایر پروتئین‌های وزیکول، سیناپتوتاگمین، سیناپسین، سیناپتوجانین و دینامین را تغییر نداد. بنابراین، می‌توان گفت که آمفیفیزین ۱ به عنوان بازیافت سیناپسی کار نمی‌کند، اما پیشنهاد می‌شود، به عنوان بخشی از پاتوژن آسیب بافت مغز در حالت‌های مکرر تزریق متامفتامین، بیان ژن، تجمع اکتین، یادگیری، سیگنال‌دهی استرس سلولی و قطبیت سلولی را تنظیم می‌کند (Hamamura et al., 2013). در مطالعه‌ی حاضر که اعتیاد به کانابیس مورد ارزیابی قرار گرفته بود، مشخص شد که بیان *Amph* در موش‌های معتاد به کانابیس به طور معناداری کاهش می‌یابد. این تفاوت مشاهده شده می‌تواند به دلیل نوع مخدر مورد آزمایش باشد.

Polr2j کد کننده‌ی زیرواحد RPB11-a از RNA پلیمراز وابسته به DNA است. این آنزیم با استفاده از چهار ریبونوکلوئید تری فسفات به عنوان سوبسترا، رونویسی DNA به RNA را کاتالیز می‌کند. *Polr2j* کد کننده‌ی جزئی از RNA پلیمراز II است که پیش سازهای mRNA و بسیاری از RNA‌های غیر کد کننده عملکردی را سنتز می‌کند. Pol II جزء مرکزی دستگاه رونویسی RNA پلیمراز II پایه است و از عناصر متحرک تشکیل شده است که نسبت به یکدیگر

حرکت می کنند. RPB11 بخشی از عنصر هسته با شکاف بزرگ مرکزی است (Kershnar et al., 1998). مشخص شده است که RNA پلیمراز II می تواند هیپر استیلاسیون هیستونی پروموتور GDNF را تسهیل کند. RNA پلیمراز II (RNA POL II) به دنبال اتصال، رونویسی از ژن های با پروموتورهای بدون TATA غنی از CG را انجام می دهد (Furukawa & Tanese, 2000). جالب اینجاست که پروموتورهای GDNF دارای موتیف جعبه TATA نیستند. علاوه بر این، جذب RNA POL II در مکان های اتصال EGR-1 پروموتورهای GDNF در سلول های گلیوبلاستوما بسیار بالاتر است. این امر به دلیل هیپرمتیلاسیون محل های اتصال EGR-1 در ناحیه پروموتور GDNF II در گلیوبلاستوما امکان پذیر است. اتصال EGR-1 به شیار اصلی DNA در محل های اتصال هیپرمتیله از طریق دامین های انگشت روی ممکن است شیار اصلی را عمیق تر کرده و مولکول های DNA را شل کند تا به جذب RNA POL II کمک کند. علیرغم وجود همزمان EGR-1 و RNA POL II در هسته، پروتئین های آنها متصل نمی شوند. این نشان می دهد که رابطه آنها محدود به سطوح رونویسی است و به سطوح پس از ترجمه گسترش نمی یابد. علاوه بر این، هیپومتیلاسیون هیستون h3k9 بر اتصال EGR-1 و جذب RNA POL II تأثیر می گذارد و در نتیجه رونویسی GDNF در سلول های گلیوما را به شیوه ای برگشت ناپذیر کاهش می دهد (Zhang et al., 2017). در تحقیق حاضر GDNF توانسته بیان *Polr2j* را در موش های معتاد به کانابیس افزایش دهد.

نتیجه گیری

با وجود کاربردهای درمانی کانابینوئیدها، این ترکیبات می توانند موجب اعتیاد و وابستگی گردند. لزوم درمان های موثر برای اعتیاد به کانابینوئیدها محققان را وامی دارد که ترکیبات مختلف را مورد بررسی قرار دهند. از آنجایی که GDNF یک مولکول دارای خاصیت محافظت کننده عصبی است و از طرف دیگر بخش عمده ای اثرات کانابینوئیدها روی مغز اعمال می شود، در تحقیق حاضر اثر درمان موش های معتاد به کانابیس با استفاده از GDNF و از طریق ارزیابی بیان دو ژن *Amph* و *Polr2j* در بافت مغز مطالعه شد. نتایج حاصل نشان داد که تزریق GDNF موجب تغییرات رفتاری در موش ها می گردد. موش های معتاد پس از دریافت GDNF رفتارهایی مشابه با موش های کنترل نشان دادند. نتایج حاصل از مطالعات مولکولی نیز نشان دهنده کاهش معنادار بیان هر دو ژن در موش های معتاد نسبت به موش های کنترل بود. از طرفی درمان با GDNF موجب شد که بیان هر دو ژن مجدداً افزایش یابد. به طور کلی نتایج آزمایش حاضر نشان می دهد که GDNF می تواند به عنوان یک ترکیب امیدوار کننده برای درمان اعتیاد به کانابیس و کاهش اثرات سوء آن در نظر گرفته شود. نمونه های بافتی از نئوکورتکس موش های صحرایی توسط خانم روژینا لاله دانشجوی دکتری تخصصی زیست شناسی - سلولی و تکوینی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند و رباط کریم جهت بررسی ژن های *Amph* و *Polr2j* دریافت شد.

پیشنهادهای

پیشنهاد می گردد که در مطالعات آینده به موارد زیر نیز پرداخته شود:

- مطالعه ی بافت مغز موش های معتاد به کانابیس پس از درمان با GDNF
- مطالعه ی ایمنو هیستوشیمی مغز موش های معتاد به کانابیس پس از درمان با GDNF
- ارزیابی مسیر مولکولی دخیل در ارتباط GDNF با ژن های مورد مطالعه

منابع

1. Abuse, S. (2013). Mental health services administration. *Results from the*, 2, 013 .
2. Airavaara, M., Mijatovic, J., Vihavainen, T., Piepponen, T. P., Saarma, M., & Ahtee, L. (2006). In heterozygous GDNF knockout mice the response of striatal dopaminergic system to acute morphine is altered. *Synapse*, 59(6), 321-329 .
3. Airavaara, M., Planken, A., Gädnnäs, H., Piepponen, T. P., Saarma, M., & Ahtee, L. (2004). Increased extracellular dopamine concentrations and FosB/ Δ FosB expression in striatal brain areas of heterozygous GDNF knockout mice. *European Journal of Neuroscience*, 20(9), 2336-2344 .
4. Airavaara, M., Tuomainen, H., Piepponen, T., Saarma, M., & Ahtee, L. (2007). Effects of repeated morphine on locomotion, place preference and dopamine in heterozygous glial cell line-derived neurotrophic factor knockout mice. *Genes, Brain and Behavior*, 6(3), 287-298 .
5. Alipour, M., Jafarian, M., Rastgoo, R., Mokri, A., Gorji, A., Zarrindast, M. R., Lorestani, F., & Razaghi, E. M. (2021). Cabergoline in Treatment of Methamphetamine-Dependent Patients and Its Effect on Serum Level of Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *European Addiction Research*, 27(6), 457-468 .
6. Allwood, J. W., Ellis, D. I., & Goodacre, R. (۲۰۰۸). Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant–host interactions. *Physiologia plantarum*, 132(2), 117-135 .
7. Andre, C. M., Hausman, J.-F., & Guerriero, G. (2016). Cannabis sativa: the plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in plant science*, 7, 19 .
8. Battistella, G., Fornari, E., Annoni, J.-M., Chtioui, H., Dao, K., Fabritius, M., Favrat, B., Mall, J.-F., Maeder, P., & Giroud, C. (2014). Long-term effects of cannabis on brain structure. *Neuropsychopharmacology*, 39(9), 2041-2048 .
9. Bonini, S. A., Premoli, M., Tambaro, S., Kumar, A., Maccarinelli, G., Memo, M., & Mastinu, A. (2018). Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *Journal of ethnopharmacology*, 227, 300-315 .
10. Carnicella, S., & Ron, D. (2009). GDNF—a potential target to treat addiction. *Pharmacology & therapeutics*, 122(1), 9-18 .
11. Connor, J. P., Stjepanović, D., Le Foll, B., Hoch, E., Budney, A. J., & Hall, W. D. (2021). Cannabis use and cannabis use disorder. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), 16 .
12. Dinis-Oliveira, R. J. (2016). Metabolomics of Δ 9-tetrahydrocannabinol: implications in toxicity *Drug metabolism reviews*, 48(1), 80-87 .
13. Kamp, F., Proebstl, L., Penzel, N., Adorjan, K., Ilankovic, A., Pogarell, O., Koller, G., Soyka, M., Falkai, P., & Koutsouleris, N. (2019). Effects of sedative drug use on the dopamine system: a systematic review and meta-analysis of in vivo neuroimaging studies. *Neuropsychopharmacology*, 44(4), 660-667 .
14. Kandel, D. B., Yamaguchi, K., & Chen, K. (1992). Stages of progression in drug involvement from adolescence to adulthood: further evidence for the gateway theory. *Journal of studies on alcohol*, 53(5), 447-457 .

15. Kershner, E., Wu, S.-Y., & Chiang, C.-M. (1998). Immunoaffinity purification and functional characterization of human transcription factor IIH and RNA polymerase II from clonal cell lines that conditionally express epitope-tagged subunits of the multiprotein complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 273(51), 34444-34453 .
16. Ozaki, S., & Wada, K. (2001). Amotivational syndrome in organic solvent abusers. *Nihon Yakurigaku zasshi. Folia Pharmacologica Japonica*, 117(1), 42-48 .
17. Panlilio, L. V., & Justinova, Z. (2018). Preclinical studies of cannabinoid reward, treatments for cannabis use disorder, and addiction-related effects of cannabinoid exposure. *Neuropsychopharmacology*, 43(1), 116-141 .
18. Papaseit, E., Pérez-Mañá, C., Pérez-Acevedo, A. P., Hladun, O., Torres-Moreno, M. C., Muga, R., Torrens, M., & Farré, M. (2018). Cannabinoids: from pot to lab. *International journal of medical sciences*, 15(12), 1286 .
19. Zavvari, F., & Karimzadeh, F. (2015). A methodological review of development and assessment of behavioral models of depression in rats. *The Neuroscience journal of shefaye khatam*, 3(4), 151-160 .
20. Zhang, B.-L., Guo, T.-W., Gao, L.-L., Ji, G.-Q., Gu, X.-H., Shao, Y.-Q., Yao, R.-Q., & Gao, D.-S. (2017). Egr-1 and RNA POL II facilitate glioma cell GDNF transcription induced by histone hyperacetylation in promoter II. *Oncotarget*, 8(28), 45105 .
21. Zhang, X., Zou, L., Meng, L., Xiong, M., Pan, L., Chen, G., Zheng, Y., Xiong, J., Wang, Z., & Duong, D. M. (2021). Amphiphysin I cleavage by asparagine endopeptidase leads to tau hyperphosphorylation and synaptic dysfunction. *Elife*, 10, e65301 .