مقاله پژوهشی

ارزیابی بیان ژن BDNF در سلول‌های خون بهبودیافتگان تریاک با روش درمانی جدید: یک شاخص مولکولی

آنی دژاکام[۱]، پیمان حسنی ابهریان[۲*] و آزاده حکمت[۳]

۱- دیده بان همسفران، موسسه جمعیت احیای انسانی کنگره ۶۰، تهران، ایران
۲- گروه نوروساینس، پژوهشکده مطالعات علوم شناختی، تهران، ایران
۳- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: پیمان حسنی ابهریان، دکتری تخصصی علوم اعصاب شناختی، abharian@iricss.org

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۱۰/۱۰ تاریخ بازنگری: ۱۳۹۹/۱/۲۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۲//۲۷

چکیده

پیشینه مطالعه و هدف: اعتیاد به تریاک در جامعه بسیار ایرانی شایع است. در طی دو دهه گذشته، در کنگره ۶۰ که یک سازمان غیر دولتی است، روش درمان تدریجی تریاک (DST) که مرتبط با کلاس‌های گروهی درمان‌های روانشناختی است اجرا شده است. اثر بخشی متد کاهش تدریجی تریاک، تایید شده است. اما مکانیسم‌های مولکولی این روش درمان اعتیاد به طور کلی روشن نشده است. ژن BDNF فاکتور نوروتروفیک مشتق گرفته از مغز است که با چندین مکانیسم مولکولی مغز شامل حافظه مرتبط است.

روش مطالعه: ابتدا نمونه‌های سلول‌های خون از ۲۱ نفر از بیماران مراجعه کننده به مرکز ترک اعتیاد کنگره شصت قبل و بعد از ۵ ماه درمان تهیه شد. RNA استخراج شده از هر نمونه به وسیله روش RT به cDNA تبدیل و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای ژن BDNF، تکثیر گردید؛ همچنین تولید درون سلولی پروتئین BDNF به وسیله روش وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: کاهش قابل توجه بیان ژن BDNF در دربیماران معتاد در مقابل افراد سالم نشان داده شد. همچنین به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش بیان ژن BDNF در بیماران بعداز ۵ ماه دوره درمانی مشاهده شد ($P<۰/۰۱$). بنابراین سوء مصرف مواد و روش درمان تدریجی بر روی بیان BDNF اثر می‌گذارد.

نتیجه‌گیری: مطالعات حاضر می‌تواند به فهم بهتر مکانیسم‌های نورولوژیکی و مولکولی تریاک و روش درمان تدریجی کمک نماید. همچنین BDNF به عنوان مارکرهای بالقوه برای آزمایش و اثر بخشی انواع مختلف درمان اعتیاد باشد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های خون، مارکر مولکولی، درمان تدریجی، ژن BDNF، Real-time PCR

مقدمه

بر خلاف سایر اختلال‌ها مانند اختلال‌های سایکوتیک و اختلال‌های عاطفی که برای تشخیص آنها بررسی نحوه ادراک، عاطفه و شناخت فرد ضروری دانسته شده است، در مورد اعتیاد چنین الزامی‌مشاهده نمی‌شود و صرف بررسی رفتارهای فعلی بیمار و تغییرات فیزیولوژیک ایجاد شده در فرد، برای تشخیص کافی است. وابستگی به دارو یا مواد از جمله اختلال‌های روانی خطرناک و بسیار شایع است (West and Brown, 2013). اعتیاد با مصرف یک ماده اعتیاد آور مخدر یا محرک شروع شده و با گذشت زمان و به علت وابستگی بدن به آن ادامه می‌یابد به گونه‌ای که فرد مصرف کننده تحمل عدم مصرف آن را نداشته و در هر زمانی و

برای آنکه بتواند شرایط عادی و روزانه خود را داشته باشد به ناچار می‌باید از آن استفاده کند. با گذشت زمان رفتار جستجوگرانه مواد حالتی اجباری پیدا کرده و به علت تاثیرات سمی طولانی مدت بر عملکرد مغز دامنه وسیعی از بدکارکردی‌های رفتاری، روانشناختی، اجتماعی و فیزیولوژیکی را ایجاد می‌کند که مانع از انجام رفتار و عملکرد طبیعی در خانواده، محیط کاری و در سطح وسیعتر در جامعه می‌شود. بیماری اعتیاد مدارهای عصبی مربوط به نظام پاداش، انگیزش، و حافظه را در مغز دچار اختلال کرده، و اختلال در این سیستم‌ها در مغز باعث بروز عوارض بیولوژیک، فیزیولوژیک، اجتماعی و روانی می‌گردد (Robbins *et al.*, 2007).

فاکتور رشد عصبی مشتق از مغز، پروتئینی است که توسط ژنی به نام BDNF کد می‌شود. این فاکتور از خانواده نوروتروفین‌ها است که سبب تکامل و رشد شبکه‌های عصبی می‌شود. این ژن بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۱ (۱۳-۱۴ ۱۱p) قرار دارد و ۹ اگزون و ۹ پروموتر در ابتدای هر یک از اگزون‌ها دارد که از طریق پیرایش متناوب منجر به تولید رونوشت‌های بسیار زیادی از BDNF می‌شود که همه آنها شامل اگزون ۹ می‌باشند که پروتئین BDNF را کد می‌کند. جالب است که نواحی شروع این رونوشت به طور متفاوتی به وسیله فعالیت عصبی و متیلاسیون DNA فعال شده و منجر به تنظیم رونوشت می‌شود. به طور مثال دپلاریزاسیون عصبی منجر به افزایش سطح اگزون‌های ۱، ۴، ۵، ۷، ۸ و ۹ می‌شود. در نتیجه متیلاسیون ژن به وسیله‌ی DNA متیل ترنسفراز رونوشت‌های اگزون‌های ۱، ۴، ۵، ۸ و ۹ افزایش می‌یابد (Koo *et al.*, 2016). پروتئین کد شده به وسیله آن سبب رشد و توسعه سیستم عصبی مرکزی و محیطی می‌شود. همچنین سبب راه اندازی سیناپس‌های عصبی و برقراری ارتباطات نورونی نیز می‌شود. بیشترین فعالیت این ژن هیپوکامپوس و بخش کورتکس مغز می‌باشد. به طور کلی نوروتروفین‌ها دسته‌ای از ترکیبات فیزیولوژیک بدن هستند که توانایی تمایز یاخته‌های بنیادی به نورون‌ها را دارا می‌باشند. این قعالیت نورون زایی نامیده می‌شود. فاکتور رشد عصبی مشتق از مغز یکی از مهمترین اعضاء این خانواده بوده و با اتصال به گیرنده‌های تیروزین کینازی خاصی سبب راه اندازی آبشارهای درون یاخته‌ای و در نهایت تولید و تمایز نورون‌های جدید می‌شود. تولید این پروتئین در ماهیچه سبب ترمیم وتولید دوباره یاخته‌های ماهیچه‌ای می‌شود.جهش Val66Met یکی از مهمترین تغییرات تک نوکلئوتیدی این ژن می‌باشد که در بالا دست پروتئین نهایی قرار دارد و طی برش آنزیمی جدا می‌شود. کاهش بیان این نوروتروفین در مغز منجر به افزایش اضطراب، پرخاشگری و افسردگی می‌شود. گزارش‌های کمی‌در خصوص ارتباط این جهش در ژن BDNF با اسکیزوفرنیا منتشر شده است.

همچنین بررسی‌هایی در خصوص ارتباط پلی مورفیسم‌های این ژن با گرایش به اعتیاد به مواد مخدر و نیز سوء مصرف داروهای مرفینی انجام شده است (Berton *et al.*, 2006).

توانبخشی شناختی روشی جهت بازگرداندن ظرفیت‌های شناختی از دست رفته است که توسط تمرینات و ارائه محرک‌های هدفمند صورت می‌گیرد و هدف آن بهبود عملکرد فرد در اجرای فعالیت‌هایش می‌باشد. در این روش درمانگر اطلاعات حاصل از ارزیابی جلسات را در نظر گرفته بر طبق آن تکالیفی برای تقویت کارکردهای شناختی مغز طراحی می‌کند که با پیشرفت بیمار، درجه دشواری تکلیف افزایش می‌یابد. برنامه توانبخشی شناختی با ارزیابی شروع می‌شود و بعد از مداخله نیز با ارزیابی پایان می‌یابد. ارزیابی شامل: خودآگاهی، جهت‌یابی، فراموشی، توجه، پردازش بینایی، بینایی حرکتی، برنامه ریزی حرکتی، حافظه، سازمان دهی، حل مشکلات و عملکردهای اجرایی می‌باشد. بر اساس سطح آسیب برای هر کارکرد تکلیف بهبود دهنده آن طی جلسات آموزش توانبخشی ارائه می‌گردد. پس از پایان جلسات مجدداً ارزیابی صورت می‌گیرد و وضعیت کارکردهای مورد نظر ارزیابی می‌شود (Cattelani *et al.*, 2010). توان بخشی شناختی به عنوان یک رویکرد درمانی برای مشکلات شناختی است. که در برگیرنده بازگشت یا جبران عملکردهای آسیب دیده به وسیله راهبردهای آموزش، تکرار وتمرین می‌باشد (Kesler *et al.*, 2011).

نرم افزار رهاکام (Rehacam) یک برنامه تعاملی می‌باشد که برای آموزش توانایی‌های شناختی طراحی شده است. طراحی سیستم شامل استراتژی‌های جبرانی، محرک‌های کنترل شده و باز خورد فوری است. این سیستم شامل روش‌هایی برای آموزش و بهبود توجه، حافظه، پردازش فضایی و عملیات اجرایی است جلسات تمرینی شامل عملکرد بیماران در برنامه‌ها است که توسط درمانگر درجات سختی آنها از پیش تعیین شده است. این سیستم نتایج فردی از جمله زمان واکنش، نتایج فردی و تعداد خطاها را محاسبه می‌کند (Fernandez *et al.*, 2018).

امروزه وابستگی به تریاک به عنوان یکی از معضلات بزرگ اجتماعی وبهداشتی جامعه ایران است. با این وجود درک مناسبی از ریشه‌های گرایش به تریاک و نیز مکانیسم‌های اثر این ماده در بدن انسان وجود ندارد. درک شناخت این مکانیسم‌های مولکولی کمک زیادی به درمان بیماران می‌کند. ارزیابی روندهای درمان با استفاده از ابزارهای مدرن بیان ژن و ارزیابی سطح پروتئین می‌تواند به درک روندهای نوروبیولوژیک درمان اعتیاد کمک کند. بنابراین هدف از این پژوهش بررسی تغییرات بیان ژن BDNF در سلول‌های خون مصرف‌کنندگان تریاک نسبت به افراد سالم و

سپس ارزیابی اثرگذاری درمان نوینی به نام کاهش تدریجی مصرف بیماران بر سطح بیان ژن و بیان پروتئین می‌باشد.

روش مطالعه

مواد شیمیایی و تجهیزات مورد استفاده: کیت استخراج RNA، کیت سنتز cDNA، بافر TBE1X، و کیت Real time خریداری شده از شرکت Thermoscientific fermentase، SYBR Green، EDTA و آگارز تهیه شده از شرکت سیگما مورد استفاده قرار گرفت. ازدستگاه Real time PCR ساخت شرکت Bio-Rad و تانک الکتروفورز ساخت شرکت زیماژن مورد استفاده قرار گرفت. Ficoll-Paque Pharmacia, Pisca جهت لیز نمودن سلول‌ها استفاده شد.

نمونه‌گیری: جهت بررسی بیان ژن BDNF و سطح بیان پروتئین BDNF از افراد مصرف‌کننده تریاک که تحت درمان تدریجی کنگره ۶۰ قرار گفته‌اند نمونه‌گیری شد. لذا نیاز به نمونه‌گیری حداکثری افراد مراجعه کننده به جمعیت احیای انسانی کنگره ۶۰ قبل از ورود به پروسه درمانی بود تا پس از گذشت ۵ ماه تعداد افراد باقی مانده در پروژه درمانی برای ارائه نتایج قابل قبول باشند. بنابراین از تعداد ۷۹ نفر مصرف کننده تریاک و مشتقات آن نمونه خون و آزمون‌های روانشناختی گرفته شد. بعد از گذشت ۵ ماه ۴۲ نفر در پروژه باقی ماندند که نمونه خون و آزمون‌های روانشناختی مجدداً از آنها گرفته شد. نمونه کنترل از افراد خویشاوند درجه یک بیماران، انتخاب شدند و نمونه ۲۱ نفری به دلیل اینکه این تعداد افراد برای مقایسه با دیگر نمونه‌ها و ارائه نتایج کفایت می‌نمود.

شرایط ورود به مطالعه: ۱- نمونه‌های سالم سابقه سوء مصرف مواد مخدر نداشتند و افراد بیمار سابقه مصرف تریاک و مشتقات آن را داشتند. ۲- نمونه‌های افراد سالم و بیمار، فاقد عقب ماندگی ذهنی بوده و از هوش طبیعی برخوردار بودند. صحت این گفته توسط آزمون‌های توانبخشی شناختی تایید شد. ۳- نمونه‌های سالم از سلامت روانی عمومی‌برخوردار بودند. این افراد حداقل سابقه یک سال حضور مستمر هفته‌ای یک بار و خدمت در سازمان مردم نهاد کنگره ۶۰ را دارا بودند و سلامتی روانی آنها توسط راهنمایان مربوطه تایید شد. ۴- نمونه‌های بیمار اعتیاد در ابتدای آزمایش، از سلامت روانی عمومی‌برخوردار بوده ولی به دلیل خاصیت بیماری اعتیاد افرادی که قطع ناگهانی مواد داشتند از ثبات خلقی لازم برخوردار نبودند و افرادی که مواد مخدر مصرف نموده بودند ثبات خلقی داشتند. در هر دو مورد نمونه گیری خون و انجام آزمون‌های روانشناختی انجام گرفت. ۵- نمونه‌گیری خون و انجام آزمون‌های روانشناختی، ابتدای مهرماه ۱۳۹۷ تا انتهای مهرماه ۱۳۹۷ و مرحله پایانی تحقیق از اواسط فروردین‌ماه تا اواسط اردیبهشت ماه ۱۳۹۸ با نمونه گیری مجدد خون و انجام همان آزمون‌های روانشناختی انجام گرفت. به علاوه به تعداد ۱۱ نفر درمان‌های توانبخشی شناختی رهاکام در طی ۸ هفته، ۸ جلسه تمرین، هر جلسه به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت. ۶- بیمارانی که به هر دلیل روند درمانی خود را به پایان نرساندند و همزمان با درمان با متد DST (درمان تدریجی) از مواد مخدر دیگر مثل هروئین، کرک، تریاک، متادن و مواد مخدر دیگر استفاده نمودند یا از داروی درمانی خود، تنتور تریاک بیشتر از دوز تعیین شده توسط راهنمای مربوطه مصرف کردند از پروژه حذف شدند.

آزمون‌های روانشناختی مورد استفاده در پژوهش: در این پژوهش از بیماران آزمون‌های حافظه کاری فضایی (Spatial Working Memory)، تکلیف سنجش عملکرد کنش‌های اجرایی (Executive Function Mesurment Task) و آزمون عملکرد اجرایی GO-NO GO اخذ شد.

استخراج RNA: نمونه‌های خون در ۴۰۰ g و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و فاز آبی جدا سازی شد. ۶۰۰ میکرولیتر Lysis buffer که مرکاپتو اتانول به آن اضافه شده بود به محلول اضافه شد. سپس ۴۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد اضافه شد. ۷۰۰ میکرولیتر از محلول تهیه شده به ستون تخلیص منتقل و سانتریفیوز در دور ۱۲۰۰۰ g به مدت یک دقیقه انجام شد. سپس ۷۰۰ میکرولیتر از Wash buffer1 به مقدار معین شده در کیت به آن اضافه شده است وسانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ g به مدت ۱ دقیقه انجام شد و محلول جمع شده در تیوب دور ریخته شد. سپس سپس۶۰۰ میکرولیتر از Wash buffer1 به مقدار معین شده در کیت به آن اضافه شده است و سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ g به مدت ۱ دقیقه انجام شد و محلول جمع شده در تیوب دور ریخته شد. دوباره سپس۲۵۰ میکرولیتر از Wash buffer1 به مقدار معین شده در کیت به آن اضافه شده است وسانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ g به مدت ۱ دقیقه انجام شد و محلول جمع شده در تیوب دور ریخته شد. نمونه RNA استخراج شده با بافر و آنزیم DNAase مخلوط شده و پس از ترکیب با محلول‌ها با تکان دادن آرام به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد تا DNA احتمالی موجود در نمونه از بین برود.RNA بدست آمده در ۲۰- تا۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

ژل الکتروفورز: در این مرحله برای سنجش DNA تخلیص شده از ژل الکتروفورز آگاروز ۱ درصد استفاده شد. ابتدا ۰/۲۶ گرم از آگاروز با ۳۰ میلی‌لیتر بافر TBE1X مخلوط شده و حرارت داده شد تا کاملا حل شود. بعد از مدتی ژل به اندازه کافی سرد شده (دمای ۴۰ تا ۵۰ درجه

سانتیگراد) و به آرامی‌درون ظرف تهیه الکتروفورز حاوی شانه ریخته شد. پس از ۳۰ تا ۴۰ دقیقه ژل سفت و محکم شده برای بارگذاری DNA آماده شد. سپس ۵ میکرولیتر از DNA تخلیص شده با ۱ میکرولیتر از بافر بارگذاری مخلوط شد و درون چاهک‌های ژل بارگذاری شد. سپس شدت جریان ۸۰ میلی آمپر و اختلاف پتانسیل ۹۰ ولت دستگاه مبدل جریان الکتریکی را تنظیم کرده و آزمایش در مدت ۶۰ دقیقه انجام شد. پس از اتمام آزمایش، با استفاده از دستگاه آشکار ساز باند مشاهده شد و با دستگاه GelDoc از ژل عکس گرفته شد. در نهایت باندهای ایجاد شده از نمونه‌های مختلف در ژل آنالیز شد. در نمونه‌های RNA انتظار دیدن دو باند S ۱۸ و S ۲۸ می‌باشد. اما آن طور که در ادامه در سنتز cDNA گفته خواهد شد، در سنجش DNA که محصول PCR است انتظار وجود یک باند شارپ می‌رود.

سنتز cDNA: واکنش RT در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در میکروتیوب‌های عاری از RNase و DNase انجام شد. ۱ میکروگرم RNA کل با ۳۰pmol پرایمر معکوس و ۱۰ میکروگرم آب مقطر عاری از RNase مخلوط شد. مخلوط فوق به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شد و بلافاصله روی یخ قرار گرفت. سپس سایر مواد واکنش RT شامل ۴ میکرولیتر بافر RT (۵X)، ۲۰۰ میکرومول dNTPs، ۴۰ U مهار کننده RNase، ۴۰U آنزیم M-MULV و آب، به مدت یک ساعت در ۴۲ درجه سانتیگراد انکوباسیون شد. برای غیر فعال کردن آنزیم ۵ دقیقه حرارت ۹۵ درجه سانتیگراد اعمال شد. محصول RT تا زمان انجام PCR در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

سنجش کیفیت cDNA: جهت سنجش کیفی cDNA حاصل از PCR از ژل الکتروفورز (آگاروز) استفاده شد. در پژوهش حاضر از پرایمر GAPDH برای انجام PCR استفاده شد و سپس محصول بر روی ژل آگاروز ۱ درصد بررسی شد و برای همه نمونه‌های بیمار و سالم باند تک بر اساس سایز محصول PCR بدست آمد.

طراحی پرایمر: توالی FASTA یا همان کتابخانه cDNA ژن‌ها از وب سایت NCBI استخراج شد. سپس توسط نرم افزارهای Oligo7 و Primer3 طراحی پرایمر صورت گرفت. پس از اصلاح دستی پرایمر با استفاده از نرم افزارهای نامبرده نتیجه در وب سایت NCBI بلاست شد تا اختصاصی بودن و اتصال پرایمر به هر سه تایپ مورد تایید قرار بگیرد. پرایمرهای بدست آمده برای ژن BDNF و GAPDH در جدول ۱ آمده است.

انجام Real-Time PCR به روش SYBR Green: ژن BDNF به عنوان ژن هدف و ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع انتخاب شدند. غلظت بهینه برای پرایمرهای ژن GAPDH ۱۰۰ پیکومول و برای پرایمرهای ژن BDNF ۱۲۰ پیکومول انتخاب شد. واکنش Real time برای ژن‌های هدف و مرجع در افراد بیمار و نرمال درپلیت‌های ۹۶ چاهک بدین صورت انجام پذیرفت. مقادیر ۱۲/۵ میکرولیتر از SYBR Green Master Mix ساخت شرکت Fermentase، ۱ میکرولیتر از پرایمر Forward و ۱ میکرولیتر از پرایمر Reverse (برای پرایمرهای ژن GAPDH ۱مولار و برای ژن BDNF ۱/۲میکرولیتر)، ۷ میکرولیتر از cDNA با غلظت ۲/۵ نانوگرم در میکرولیتر و ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر به ترتیب اضافه گردید. سپس برنامه اجرایی PCR طبق جدول ۲ انجام شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای طراحی شده

ژن	پرایمر (5' to 3')
Forward Primer BDNF	CTGTAGTCGCCAAGGTGGTT
Reverse Primer BDNF	AAGTGCTAGGAAGAGCCGTG
Forward primer GAPDH	AAGGGCCCTGACAACTCTTT
Reverse primer GAPDH	CTCCCCTCTTCAAGGGGTCT

پس از اتمام واکنش، ۷ میکرولیتر از محصول PCR جهت اطمینان از بیان ژن، توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید و بقیه محصول PCR در دمای ۲۰°C- نگهداری شد.

جدول ۲- برنامه اجرایی PCR

زمان (S)	دما (°C)	مرحله	سیکل
۲۴۰	۹۵	Initial Denaturation	۱
۳۰	۹۴	Denaturation	۳۵
۳۰	۵۵،۵۸،۶۰	Annealing	
۳۰	۷۲	Extension	
۳۰۰	۷۲	Final extension	۱

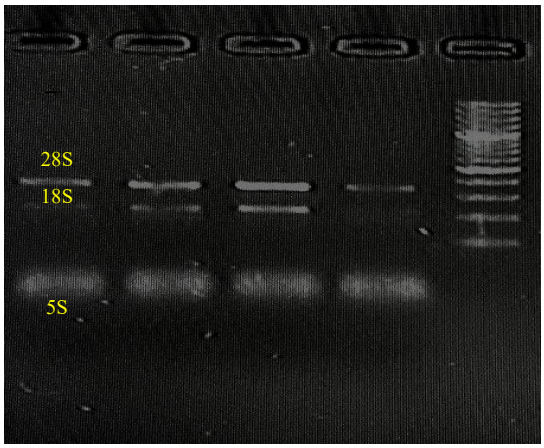
استخراج پروتئین و وسترن بلاتینگ: سلول‌های خون توسط شیب غلظت Ficoll-Paque سانتریفیوژ شده و گلبول‌های سفید تک هسته‌ای جدا گردید .لوکوسیت‌های به دست آمده از خون در غلظت ۷۱۰*۲ سلول در هر میلی لیتر در بافر PBS که حاوی ۱ NP-40 %، ۰/۵ % دی اکسی کولات، ۰/۱ %سدیم دو دسیل سولفات، ۱ میلی مولار سدیم وانادات Na_3VO_4 (۳۰ واحد بر میلی لیتر)، آپروتینین (۱ میلی مولار)، ۱ میلی مولار فنیل متیل سولفونیل فلورایدِ، ۱ گرم بر میلی لیتر پپستاتین و ۱ گرم بر میلی لیتر لوپپتین بود، لیز گردید. نمونه لیز

شده به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ انکوبه شد و در دور g ۱۵۰۰۰ برای مدت ۱۰ دقیقه به منظور حذف مواد زائد سانتریفیوژ گردید. مقدار پروتئین به دست آمده توسط کیت اندازه گیری پروتئین Bi Cinchoninic Acid (BCA) تعیین شد. سپس در مقادیر مناسب تقسیم شد و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد ذخیره گردید. برای آنالیز ایمونوبلات، نمونه پروتئین از حالت فریز خارج شد و با نمونه بافر و عامل کاهنده مخلوط گردید و به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شد. سپس پروتئین‌ها (۳۰ µg/Lane) توسط SDS-PAGE ۱۰٪ جداسازی شده و از داخل غشاهای پلی وینیلیدین دی فلوراید (PVDF) عبور داده شدند. غشاها به طور شبانه روزی توسط آنتی بادی‌های اولیه BDNF و GAPDH با رقت ۱:۱۰۰۰ به عنوان loading control در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. در مرحله بعد، غشاها با آنتی بادی ثانویه anti-rabbit IgG نشاندار شده با Horseradish peroxidase (HRP) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند و با استفاده از یک سیستم نورتابی شیمیایی افزایش یافته (thermos Fisher Scienfific, INC) در معرض اشعه X قرار گرفتند. شدت باندها توسط روش‌های آزمایشگاهی اندازه‌گیری شد.

آنالیز داده‌ها: جهت آنالیز داده‌ها از تست Anova استفاده گردید و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

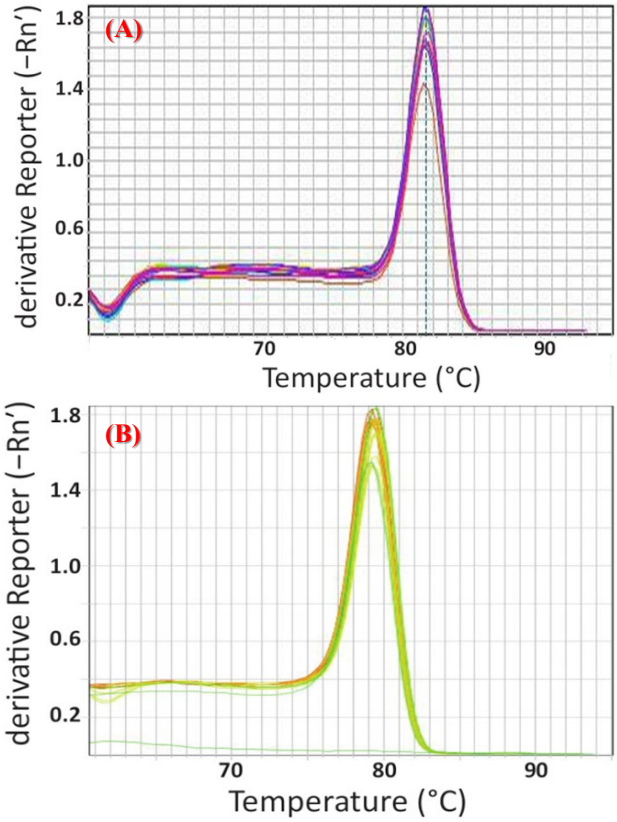
نتایج

تصویر ژل الکتروفورز آگارز ۱ درصد تهیه شده با دستگاه ژل داک پس از استخراج RNA در شکل ۱ نشان داده شده است. باندهای شارپ و واضح در ۵S، ۱۸S و ۲۸S بیانگر استخراج مناسب RNA است.



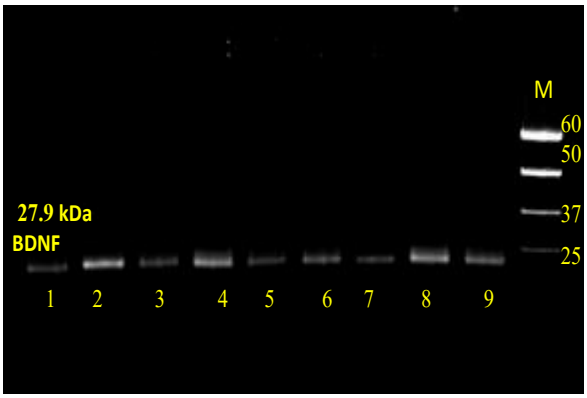
شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورز آگارز ۱ درصد مربوط به استخراج RNA

جهت تایید محصولات ایجاد شده از PCR نمودارهای دمای ذوب (melt curve) برای ژن‌های GAPDH و BDNF بدست آمد که در شکل ۲ نشان داده شده است. وجود تک قله ماکزیمم در آن‌ها بیانگر طراحی پرایمرها با بالاترین کیفیت و اختصاصی بودن آنها است.

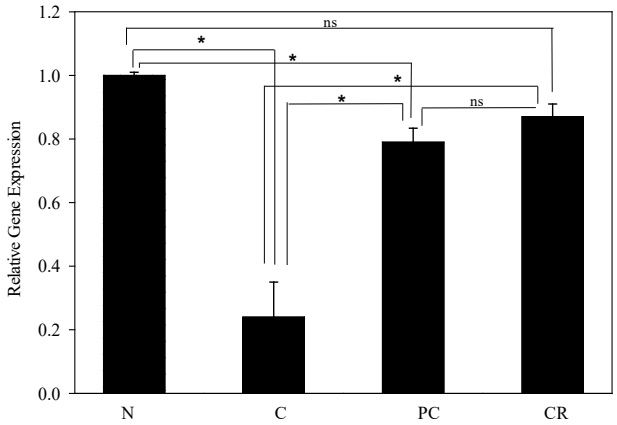


شکل ۲- منحنی‌های ذوب (A) ژن GAPDH و (B) ژن BDNF که تایید کننده اختصاصی بودن پرایمر استفاده شده است

محصولات PCR توسط ژل الکتروفورز ۱ درصد نیز مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج آن در شکل ۳ نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می‌گردد محصولات با کیفیت بالا استخراج گردیده است.



شکل ۳- تصویر ژل الکتروفورز آگارز ۱ درصد. ۳-۱ نمونه سالم، ۶-۴ نمونه پیش از درمان کنگره ۶۰ و ۹-۷ نمونه بیماران پس از دریافت درمان کنگره ۶۰ را نشان می‌دهد

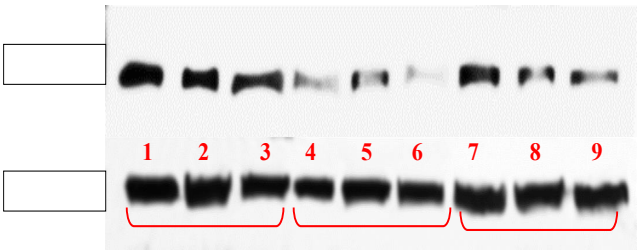


شکل ٤- نتایج بیان ژن‌های هدف در مقایسه بین گروه‌های مورد مطالعه. N نشان دهنده گروه سالم، C نشان دهنده گروه بیمار مبتلا پیش از آغاز درمان، PC نشان دهنده همان بیماران پس از درمان کاهش تدریجی مصرف و CR نشان دهنده گروه بیمار پس از درمان با روش کاهش تدریجی مصرف و درمان توانبخشی شناختی رهاکام می‌باشند. * بیانگر سطح معناداری ۰/۰۵ $P <$

نتایج بیان ژن‌های هدف در مقایسه بین گروه‌های مورد مطالعه در شکل ۴ نشان داده شده است. همانگونه که در این شکل مشاهده می‌گردد، بیان ژن در گروه بیمار بسیار کمتر از نمونه‌های سالم است.گروه بیمار پس از درمان تدریجی در کنگره ۶۰ در مقابل گروه بیمار پیش از درمان افزایش بیان ژن BDNF را نشان می‌دهد. گروه بیمار پس از درمان تدریجی در کنگره ۶۰ در مقابل گروه سالم تفاوت معنی‌دار نشان می‌دهد. گروه سالم درمقابل گروه بیمار پس از درمان با روش کاهش تدریجی مصرف به همراه درمان توانبخشی شناختی تفاوت معنی‌دار نشان نمی‌دهد. به عبارتی سطح بیان ژن BDNF در گروه بیمار پس از درمان با روش کاهش تدریجی مصرف به همراه درمان توانبخشی شناختی تفاوت چندانی ندارد. گروه بیمار پس از درمان به روش درمان تدریجی و درمان توانبخشی رهاکام در مقابل گروه پس از درمان به روش درمان تدریجی می‌باشد تفاوت معنی دار نشان نداد. گروه بیمار پس از درمان به روش درمان تدریجی و درمان توانبخشی شناختی در مقابل گروه بیمار پیش از درمان تفاوت معنی دار نشان داد و تفاوت شاخص است.

در مرحله بعد از روش وسترن بلات پراش برای ارزیابی پروفایل بیان پروتئین BDNF که توسط GAPDH جهت نرمالیزاسیون غلظت در نمونه‌ها استفاده شد، استفاده گردید. نتایج در شکل ۵ نشان داده شده است.

جدول ۳ بیانگر نتایج بیان پروتئین BDNF در مقایسه بین گروه‌های مورد مطالعه می‌باشد. توضیح آنکه از دو گروه تحت درمان یک نمونه برای درمان همراه با توانبخشی شناختی و یک نمونه برای درمان کاهش تدریجی بدون درمان توانبخشی شناختی ارزیابی شد.



شکل ۵- پروفایل بیان پروتئین BDNF با روش وسترن بلات که از GAPDH برای نرمالیزاسیون غلظت در نمونه‌ها استفاده شده است. ۱-۳ نمونه سالم، ۶-۴ نمونه پیش از درمان کنگره ۶۰ و ۹-۷ نمونه بیماران پس از دریافت درمان کنگره ۶۰ را نشان می‌دهد.

جدول ۳- نتایج بیان پروتئین BDNF در مقایسه بین گروه‌های مورد مطالعه. در این جدول N نشان دهنده گروه سالم، C نشان دهنده گروه بیمار مبتلا پیش از آغاز درمان، PC نشان دهنده همان بیماران پس از درمان کاهش تدریجی مصرف و CR نشان دهنده گروه بیمار پس از درمان با روش کاهش تدریجی مصرف در کنار درمان توانبخشی شناختی رهاکام می‌باشند.

نمونه‌ها	BDNF	GAPDH
N_1	۲۸/۱۳۹	۱۲/۷
N_2	۲۵/۸۸۳	۱۲/۳۸۷
N_3	۲۹/۷۱۲	۹/۷۶۸
C_1	۴/۷۱۴	۸/۳۰۷
C_2	۵/۲۹۸	۱۰/۹۳۵
C_3	۱/۷۱	۹/۷۴
PC_1	۲۶/۴۳۱	۱۲/۳۶۳
PC_2	۲۱/۷۳۷	۱۱/۴۶۲
CR_1	۲۰/۹۷۶	۱۲/۳۳۹

همانگونه که مشاهده می‌شود پس از درمان با روش کاهش تدریجی مصرف در کنار درمان توانبخشی شناختی رهاکام درصد بیان پروتئین BDNF تقریبا برابر با میزان بیان آن در نمونه‌های سالم شده است. قابل ذکر است که نتایج حاصل کاهش بیان ژن BDNF را در بیماران مصرف‌کننده تریاک نشان می‌دهد.

بحث

اعتیاد یکی از بیماری‌های ذهنی بشر به حساب می‌آید. اعتیاد امروزه به عنوان یک اختلال رفتاری-عصبی تعریف می‌شود که درآن فرد رفتاری مضر یا غیر مفید یا غیرضروری را متداوماً تکرار می‌کند. در حالی که در ابتدا آن رفتار یا مجموعه رفتارها باعث احساس لذت می‌شوند اما به تدریج به یک نیاز برای تثبیت خلق تبدیل می‌شود. همچنین میزان مصرف مورد نیاز برای رسیدن به احساس نشئگی به تدریج افزایش می‌یابد و ولع مصرف کننده به استفاده از ماده یا رفتار اعتیادی تدریجاً

بالا می‌رود (West and Brown, 2013). مطالعات نوروبیولوژی نشان داده است که رفتارهای اعتیادی با سامانه‌های انگیزش و هیجان و نیز پاداش در مغز مرتبط است (Robbins *et al.*, 2007). انتقال دهنده عصبی به نام دوپامین نقش اصلی در احساس رضایت حاصل از فعالیت سیتم پاداش در مغز دارد. دوپامین در اثر فعالیت‌های عادی زندگی مانند غذا خوردن و رابطه جنسی آزاد می‌شود و منجر به احساس رضایت می‌شود. آزاد سازی دوپامین در پایانه‌های عصبی بر اثر مصرف مواد مخدر و محرک بشدت افزایش می‌یابد. از طرف دیگر پیام آزادسازی دوپامین ناشی از مصرف مواد مخدر مانند تریاک یا مواد محرک مانند مت آمفتامین دارای پتانسیل القایی طولانی مدت (LTP) بالاتری هستند که فرد را به تکرار تجربه مصرف سوق می‌دهند. تغییرات در میزان انتشار دوپامین تاثیرات متعددی بر رفتار و نیز بر فعالیت و انعطاف پذیری نورونی می‌گذارد. این تغییرات به ویژه در کارکرد و بیان ژن های گیرنده‌های دوپامین (D1-D5) و نیز فاکتورهای مشتق از نورون به ویژه فاکتور نورتروفیک مشتق از مغز (BDNF) تاثیر گذار است (Berton *et al.*, 2006). تغییرات در بیان ژن BDNF به عنوان ماشه تغییر در تنظیم چندین مسیر سیگنالینگ از جمله MAP kinase و نیز تنظیم LTP می‌شناسند. همچنین القای LTP توسط BDNF نیز به نوبه خود تحت کنترل ژن هایی مانند ژن‌های خانواده Arc و Arg3.1 است. به نظر می‌رسد که BDNF می‌تواند یک مارکر مناسب برای پیگیری تاثیر داروهای مختلف بر مکانیزم‌های مختلف مغزی مرتبط با فعالیت نورونی باشد. همچنان که تغییرات محرک‌های مختلف مانند استرس، شادی یا هیجان بر سیستم‌های مغزی با ارزیابی سطح پروتئین یا mRNA ژن BDNF قابل پیش‌بینی است (Zigova *et al.*, 1998; Pencea *et al.*, 2001; Ribases *et al.*, 2003). برطبق مقالات عمده ژن‌های دخیل در اعتیاد که تا به حال در بررسی‌ها به نقش آنان پی برده شده از نظر کارکرد در بدن به چند دسته تقسیم‌بندی شده‌اند که شامل: ژن‌های دخیل در تکوین عصبی سیستم اعصاب مرکزی و محیطی، ژن‌های دخیل در مسیر سیگنالینگ دوپامین، ژن‌های دخیل در مسیر سیگنالینگ سروتونین، ژن‌های دخیل در مسیر سیگنالینگ گلوتامات، ژن‌های دخیل در گیرنده‌های درد و گیرنده‌های اوپیوئیدی، ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی، ژن‌های مسئول سنتز نورورترانسمیترهای مهاری، ژن‌های مسئول سنتز نورورترانسمیترهای تحریکی، ژن‌های دخیل در حفاظت از نورون‌ها و سلول‌های گانگلیونی، ژن‌های مرتبط با انتقال‌های درون سلولی و ژن‌های مرتبط با دفع سموم درون سلول می‌باشند. اگرچه مطالعات گسترده و جامع، پیوستگی ارتباط ژن BDNF با روند اثرگذاری و اعتیاد به مواد مخدر در انسان را نشان داده است، روندها و مکانیزم اثرگذاری متقابل ژن و مواد مخدر و محرک مختلف بر هم به روشنی مشخص نیست. لذا هدف از این پژوهش درک بهتر تغییرات بیان ژن BDNF در مصرف کنندگان تریاک نسبت به افراد سالم و سپس ارزیابی اثر گذاری درمان نوینی به نام کاهش تدریجی مصرف بیماران بر سطح بیان ژن و بیان پروتئین بود.

نتایج حاصله تفاوت معنی دار، بیان ژن BDNF و سطح پروتئین BDNF بین افراد سالم و افراد بیمار پیش از درمان را نشان داد. همچنین کاهش بیان ژن BDNF به شکل معنی‌داری در بیماران مصرف کننده تریاک نسبت به افراد سالم مشاهده شد که تایید کننده اغلب گزارش‌ها در زمینه بیان این ژن در معتادان است (Guillin *et al.*, 2001) هر چند با اطلاعات حاضر قادر به تفسیر دقیق علل این کاهش بیان ژن نیست. نتایج حاصله تفاوت معنی‌دار، بیان ژن BDNF و سطح پروتئین BDNF در سلول‌های خون محیطی در افراد وابسته به تریاک قبل و بعد از درمان کاهش تدریجی نشان داد. همچنین نتایج حاصله تفاوت معنی‌دار، بیان ژن BDNF و سطح پروتئین BDNF در خون محیطی در افراد وابسته به تریاک قبل و بعد از درمان کاهش تدریجی به همراه توانبخشی شناختی را نشان داد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیان ژن BDNF بر اثر مصرف مزمن و طولانی مدت تریاک به شکل تزریقی، استشمام یا خوراکی به شکل معنی‌داری کاهش می‌یابد. روند این کاهش بیان ژن بر اثر درمان به شکل معنی‌داری برعکس می‌شود و بیان ژن BDNF در بیماران پس از درمان به شکل معنی‌دار با ضریب خطای کمتر از ۰/۰۵ نسبت به همان بیماران پیش از درمان افزایش می‌یابد. نتایج این مطالعه بیان ژن BDNF را به عنوان یک مارکر بالقوه برای ارزیابی اثر بخشی درمان با متادون و یا سایر درمان‌های تریاک معرفی می‌کند. به این ترتیب نتایج این پژوهش را به دو بخش می توان تقسیم کرد:

۱) مطالعه مقایسه‌ای بیان ژن در افراد مصرف کننده تریاک نسبت به افراد سالم:

داده‌های بررسی‌های بیان ژن BDNF در معتادان به مواد مخدر و محرک مختلف بشدت متفاوت و گاه متناقض هستند. به عنوان مثال Guillin و همکاران در سال ۲۰۰۱ گزارش کردند که بیان ژن BDNF بر اثر مصرف مواد مخدر کاهش می‌یابد که این به نوبه خود منجر به افزایش بیان ژن‌های گیرنده دوپامین شده و نهایتا به افزایش انتشار دوپامین در فضای بین سیناپسی منجر می‌شود (Guillin *et al.*, 2001).

از طرف دیگر Kordi-Tamandani و همکاران در پژوهشی که در شهر زاهدان کشور ایران انجام شد و به ارزیابی سطح بیان ژن‌های ترانسپورتر دوپامین DAT1 و ژن BDNF در خون معتادان به مواد مخدر پرداختند، عدم تغییر معنی‌دار بیان ژن BDNF در معتادان نسبت به افراد سالم را نشان دادند (Kordi-Tamandani *et al.*, 2015).

بیان ژن BDNF در برخی مواد محرک گاه حتی افزایش می‌یابد. نمونه مشخص این مواد کوکائین است. Schmidt و همکاران در سال ۲۰۱۲ در حالی که اغلب گزارش‌های پیشین کاهش بیان ژن BDNF

در مصرف کنندگان مواد مخدر، محرک و نیز افراد معتاد به الکل را نشان داده بودند (McGough *et al.*, 2004)، افزایش معنی‌دار بیان ژن را در مصرف کنندگان ماده محرک کوکائین گزارش دادند. که این افزایش بیان با افزایش انتشار دوپامین ارتباط معنی‌دار داشت (Schmidt *et al.*, 2012). با توجه به این موارد می‌توان اذعان داشت که مکانیزم تغییرات بیان ژن BDNF و نیز نحوه کارکرد این ژن در تنظیم سطح بیان ژن های گیرنده دوپامین روشن نیست. این در حالی است که مطالعات اخیر به اثرات اپی ژنتیک نیز توجه کرده‌اند.

Toledo-Rodriguez و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که سیگار کشیدن مادران در حین بارداری می‌تواند باعث تغییر در الگوی اپی ژنتیک پروموتر شماره ۶ مربوط به اگزون شماره ۶ ژن BDNF شود. این تغییرات در الگوی اپی ژنتیک می تواند در تغییرات بیان ژن افراد در بزرگسالی موثر باشد (Toledo-Rodriguez *et al.*, 2010).

Koo و همکاران نیز در سال ۲۰۱۵ در پژوهشی به ارزیابی مکانیزم‌های اپی ژنتیک مرتبط با تنظیم بیان ژن BDNF به عنوان یک مارکر مشتق از نورون در موش‌های مدل اعتیاد به مورفین پرداختند. این پژوهشگران پس از درمان موش‌ها با دز مشخص مورفین در ۸ هفته، بیان ژن های را در قسمت ventral tegmental area (VTA) مغز موش‌ها که محل نورون های دوپامین ساز است، ارزیابی کردند. این پژوهشگران به بررسی بیان ژن BDNF و عوامل رونویسی مرتبط با این ژن پرداختند و نشان دادند که کاهش معنی‌دار بیان ژن BDNF در مغز موش‌ها بر اثر چندین تغییر اپی ژنتیک در سامانه تنظیم بیان ژن است. این تغییرات شامل به تاخیر انداختن حرکت RNA pol II بر روی پروموتر این ژن و نیز تغییرات ساختاری در هیستون‌های متصل به ژن می‌شد. از طرف دیگر مورفین باعث کاهش اتصال پروتئین متصل شونده به عناصر پاسخ به cAMP به پروموتر ژن BDNF در VTA می‌شد که این به نوبه خود باعث افزایش اتصال H3K27 به ژن BDNF و کاهش بیان NURR1 که یک گیرنده هسته‌ای است و نهایتا کاهش بیان BDNF می‌شود (Koo *et al.*, 2015).

۲) مطالعه مقایسه ای بیان ژن در افراد مصرف کننده تریاک پیش و پس از درمان:

بخش دیگر پژوهش که به بررسی روند درمان پرداخته و نتایج بدست آمده از آن را می‌توان در چارچوب فارماکوژنتیک طبقه‌بندی کرد، مطالعه بیان ژن در بیماران پیش و پس از دوره ۵ ماهه کاهش تدریجی مصرف است. پژوهش‌های متعددی پیشتر ارتباط این ژن با اثر بخشی درمان متادون را نشان داده بودند. Gratacos و همکاران در سال ۲۰۰۸ به بررسی نقش ۲۱ واریانت ژن BDNF در گرایش افراد به مواد اپیوئیدی و پاسخ آنان به درمان با متادون پرداختند (Gratacos *et al.*, 2008). SNP 13 از مجموع SNP 21 به طور معنی‌داری در ارتباط با عدم پاسخ به درمان با متادون مرتبط دانسته شدند. SNP 6 از این SNP 13 یک هاپلوتایپ مرتبط با عدم پاسخ به درمان MMT را تشکیل می¬دادند (Ribases *et al.*, 2003). برخی از مطالعات نیز ارتباط واریانت‌های ژنتیک در ژن BDNF با وسوسه مواد مخدر و بازگشت به سوئ مصرف در حین متادون درمانی را بررسی کردند. Bawor و همکاران در سال ۲۰۱۵ به بررسی نقش پلی¬مورفیسم¬های دو ژن BDNF, DRD2 در بازگشت به مصرف معتادان به مواد اپیوئیدی که تحت درمان با متادون هستند پرداختند. این پژوهشگران دو واریانت rs6265 در BDNF, rs1799978 در DRD2 در ۲۴۰ بیماری که در حین درمان با متادون به مصرف مواد اپیوئیدی بازگشته بودند بررسی کردند. ۸۷ بیمار واریانت rs6265 و ۲۷ بیمار واریانت rs1799978 را نشان می¬دادند که نشان دهنده فراوانی غیر معنی¬دار اما بیش از حد معمول است (Bawor *et al.*, 2015).

پژوهش حاضر نسبت به مطالعات فارماکوژنتیک نقش BDNF در درمان متادون دو برتری مهم دارد. نخست آنکه ارزیابی بیان ژن ابزاری دقیق برای مطالعه تغییرات حال حاضر است و امکان دنبال کردن روند درمان را در بازه زمانی مشخص فراهم می‌کند. با استفاده از نتایج این مطالعه و محاسبه سرعت و مدت تغییرات بیان ژن می‌توان زمان مناسب برای پایان درمان را انتخاب کرد تا طول درمان و زمان بازگشت به زندگی عادی فرد مشخص شود. برتری مهم دیگر مطالعه همزمان نتایج روانی و تغییرات آن در طول درمان است که در مطالعات پیشین مشاهده نشده بود. برای این منظور دو پارامتر مهم حافظه و توان تصمیم گیری مورد توجه قرار گرفت. سطح این دو پارامتر مهم روانی با آزمون‌های معتبر، ساده و نرمالیزه شده برای جمعیت ایرانی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که درمان بر بهبود هر دو پارامتر شناختی که به طور بالقوه می‌توانند علل گرایش به سوء مصرف مواد مخدر باشند اثر گذاری مناسبی دارد. نکته جالب توجه این است که افزایش تدریجی بیان ژن BDNF بر اثر درمان با متادون، در حالی با کاهش شدت استرس در بیماران تحت درمان همراه است که معروف ترین پلی مورفیسم کارکردی ژن BDNF به نام جهش val66met به ویژه در نوع هوموزیگوت مغلوب جهش یافته منجر به اختلال در ساختار پروتئین BDNF کاهش محصول این ژن می‌شود. دارندگان این پلی مورفیسم در برابر عوامل استرس‌زای بیرونی مانند فیلم‌های ترسناک واکنش استرسی بیش از حد طبیعی نشان می‌دهند و سطح استرس بالاتری در مقایسه با افراد فاقد پلی مورفیسم دارند. با این نتایج می‌توان فرضیه‌ای مطرح کرد که حضور پلی مورفیسم val66met می‌تواند یک عامل خطر برای مقاومت به درمان اعتیاد متادون در بیماران مصرف کننده تحت درمان باشد. البته دو محدودیت عمده در این پژوهش ارزیابی و نتیجه‌گیری را مشکل می‌سازد. نخست آنکه مدت پنج ماه برای ارزیابی میزان پاسخ به درمان یک ساله کاهش تدریجی مصرف در کنگره ۶۰ و یا مقاومت احتمالی

مدت مناسبی نیست زیرا اغلب افراد تحت درمان دست کم یک سال طول درمانی دارند. از طرف دیگر اگرچه تغییرات بیان ژن و نیز فنوتیپ روانی نشات گرفته از بیان ژن مورد بررسی قرار گرفت، علت این تغییر بیان ژن که ممکن است به واریانت‌های ژنتیک شناخته شده در این ژن مرتبط باشد، مشخص نشده است.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد سوء مصرف مواد و روش درمان تدریجی بر روی بیان BDNF اثر می‌گذارد. همچنین مشخص شد که سطوح mRNA-BDNF با حالات روانی اشخاص مرتبط است. مطالعات حاضر می‌تواند به فهم بهتر مکانیسم‌های نورولوژیکی و مولکولی تریاک و روش درمان تدریجی کمک نماید. همچنین BDNF می‌تواند به عنوان مارکرهای بالقوه برای آزمایش و اثر بخشی انواع مختلف درمان اعتیاد باشد. امید است در مطالعات آتی هم بازه زمانی ارزیابی گسترده‌تر شود و هم بیان ژن و توالی ژنوم به طور همزمان مورد بررسی قرار بگیرد.

مراجع

Bawor, M., Bami, H., Dennis, B.B., Plater, C., Worster, A., Varenbut, M., Daiter, J., Marsh, D.C., Steiner, M. and Anglin, R. 2015. Testosterone suppression in opioid users: A systematic review and meta-analysis. Drug and alcohol dependence, 149: 1-9.

Berton, O., McClung, C.A., DiLeone, R.J., Krishnan, V., Renthal, W., Russo, S.J., Graham, D., Tsankova, N.M., Bolanos, C.A. and Rios, M. 2006. Essential role of bdnf in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. Science, 311(5762): 864-868.

Cattelani, R., Zettin, M. and Zoccolotti, P. 2010. Rehabilitation treatments for adults with behavioral and psychosocial disorders following acquired brain injury: A systematic review. Neuropsychology review, 20(1): 52-85.

Fernandez, E., Bergado Rosado, J.A ,.Rodriguez Perez, D., Salazar Santana, S., Torres Aguilar, M. and Bringas, M.L. 2018. Effectiveness of a computer-based training program of attention and memory in patients with acquired brain damage. Behavioral Sciences, 8(1): 4.

Gratacos, M., Soria, V ,.Urretavizcaya, M., Gonzalez, J., Crespo, J., Bayes, M., De Cid, R., Menchon, J., Vallejo, J. and Estivill, X. 2008. A brain-derived neurotrophic factor (bdnf) haplotype is associated with antidepressant treatment outcome in mood disorders. The pharmacogenomics journal, 8(2): 101-112.

Guillin, O., Diaz, J., Carroll, P., Griffon, N., Schwartz, J.-C. and Sokoloff, P. 2001. Bdnf controls dopamine d 3 receptor expression and triggers behavioural sensitization. Nature, 411(6833): 86-89.

Kesler, S.R., Lacayo ,N.J. and Jo, B. 2011. A pilot study of an online cognitive rehabilitation program for executive function skills in children with cancer-related brain injury. Brain Injury, 25(1): 101-112.

Koo, J.W., Labonté, B., Engmann, O., Calipari, E.S., Juarez, B., Lorsch, Z., Walsh, J.J., Friedman, A.K., Yorgason, J.T. and Han, M.-H. 2016. Essential role of mesolimbic brain-derived neurotrophic factor in chronic social stress–induced depressive behaviors. Biological psychiatry, 80(6): 469-478.

Koo, J.W., Mazei-Robison, M.S., LaPlant, Q., Egervari, G., Braunscheidel, K.M., Adank, D.N., Ferguson, D., Feng, J., Sun, H. and Scobie, K.N. 2015. Epigenetic basis of opiate suppression of bdnf gene expression in the ventral tegmental area. Nature neuroscience, 18(3): 415.

Kordi-Tamandani, D.M., Tajoddini, S. and Salimi, F. 2015. Promoter methylation and bdnf and dat1 gene expression profiles in patients with drug addiction. Pathobiology, 82(2): 94-99.

McGough, N.N., He, D.-Y., Logrip, M.L., Jeanblanc, J., Phamluong, K., Luong ,K., Kharazia, V., Janak, P.H. and Ron, D. 2004. Rack1 and brain-derived neurotrophic factor: A homeostatic pathway that regulates alcohol addiction. Journal of Neuroscience, 24(46): 10542-10552.

Pencea, V., Bingaman, K.D., Wiegand, S.J. and Luskin, M.B .2001 .Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new

neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. Journal of Neuroscience, 21(17): 6706-6717.

Ribases, M., Gratacos ,M., Armengol, L., De Cid, R., Badia, A., Jimenez, L., Solano, R., Vallejo, J., Fernandez, F. and Estivill, X. 2003. Met66 in the brain-derived neurotrophic factor (bdnf) precursor is associated with anorexia nervosa restrictive type. Molecular psychiatry. 8(8): 745-751.

Robbins, T., Cardinal, R.N., DiCiano, P., Halligan, P.W., Hellemans, K., Lee, J. and Everitt, B.J. 2007. Neuroscience of drugs and addiction. In: Drugs and the future. Elsevier: pp: 11-87.

Schmidt, H.D., Sangrey, G.R., Darnell, S.B., Schassburger, R.L., Cha, J.H.J., Pierce, R.C. and Sadri-Vakili, G. 2012. Increased brain-derived neurotrophic factor (bdnf) expression in the ventral tegmental area during cocaine abstinence is associated with increased histone acetylation at bdnf exon i-containing promoters. Journal of neurochemistry, 120(2): 202-209.

Toledo-Rodriguez, M., Lotfipour, S., Leonard, G., Perron, M., Richer, L., Veillette, S., Pausova, Z. and Paus, T. 2010. Maternal smoking during pregnancy is associated with epigenetic modifications of the brain-derived neurotrophic factor-6 exon in adolescent offspring. American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics, 153(7): 1350-1354.

West, R. and Brown, J. 2013. Theory of addiction. John Wiley & Sons.

Zigova, T., Pencea, V., Wiegand, S.J. and Luskin, M.B. 1998. Intraventricular administration of bdnf increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. Molecular and Cellular Neuroscience, 11(4): 234-245.

Research in Karyotic Cell &Tissue, Volume 1, Issue 1, 2020, Pages 16-25

Research Article

Evaluating of BDNF Expression in Blood Cells of Opium Recovering Patients with a New Treatment Method: A Molecular Marker

Ani Dezhakam[1], Peyman Hassani Abharian[2*], and Azadeh Hekmat[3]

[1] Observer Congress 60 Human Revivification Society, Tehran, Iran

[2.] Department of neuroscience, Institute for Cognitive Science Studies, Tehran, Iran

[3] Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Correspondence to Peyman Hassani-Abharian, MD, Ph.D., abharian@iricss.org

Received 31st December 2019 Revised 1st January 2020 Accepted 17th March 2020

Abstracts

Introduction and Aim: Opium addiction is one of the most prevalent addiction in Iranian society. Throughout the last two decades, congress 60; a nongovernmental organization; has been operated a taper off treatment of opium associated with a package of psychological treatment group classes. Although the effectiveness of the taper off method in opium addiction has been verified, molecular mechanisms involved in this treatment have not explained. BDNF gene is a brain-derived neurotrophic factor that is associated with numerous molecular mechanisms of the brain including memory.

Methods: In this research, peripheral blood samples from 21 patients were collected from Congress 60. RNA was extracted from each sample, reverse transcribed and amplified via RT-PCR technique, utilizing specific primers for BDNF. The production of BDNF protein was also analyzed employing the western blotting technique.

Results: Our results exhibited considerable down expression of BDNF in addict persons vs. non-psychiatric persons ($P<0.01$). Furthermore, BDNF expression level in addicts increased significantly after the therapy period. Findings showed the effect of opium abuse and taper off treatment on the expression of BDNF.

Conclusion: The present study could help to a better understanding of molecular and neurological mechanisms of opium and taper off treatment. Additionally, BDNF level detection could be a potential marker for screening the effectiveness of various types of addiction treatment.

Keywords: Blood Cells; Molecular Marker; Taper off Treatment; BDNF gene; Real-time PCR