زیست‌شناسی جانوری، سال چهاردهم، شماره چهارم، تابستان ۱۴۰۱، صفحات ۱۸۰- ۱۷۱

مقاله پژوهشی

تعیین اثرات هروئین بر روی ترکیبات کیسه آمنیوتیک در موش‌های باردار و تخمدان فرزندان آن‌ها

فاطمه اصانلو[۱]، رامین حاجی خانی[۱*]، غلامحسن واعظی[۲*]، مریم بنانج[۱]

۱- گروه زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه زیست شناسی، واحد دامغان دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

*مسئول مکاتبات: gh.vaezi@yahoo.com

DOI: 10.22034/ascij.2022.1940732.1310

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۹

چکیده

هروئین یکی از اعتیادآورترین مواد مخدری است که در حال حاضر در ایران در میان نوجوانان و جوانان مورد سوء مصرف قرار می‌گیرد. از آن‌جا که استفاده از مواد مخدر می‌تواند اثرات زیان‌باری بر روی اعضاء بدن، بافت‌ها، هورمون‌ها، مایع آمنیوتیک، بیان ژن های مؤثر در مادر و جنین، و نیز سایر فاکتورها داشته باشد، بنابراین بررسی اثرات هروئین بر کیسه آمنیون موش‌های باردار و تأثیرات آن بر نسل‌های بعد آن نیز بسیار ضروری می‌باشد. ۶۰ سر موش صحرایی بالغ ماده نژاد ویستار به ۶ گروه کنترل، شم، دریافت کننده دوز ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هروئین، دریافت کننده دوز ۲ میلی‌گرم/کیلوگرم هروئین، دریافت کننده دوز ۳ میلی-گرم/کیلوگرم هروئین و دریافت کننده دوز ٤ میلی‌گرم/کیلوگرم هروئین تقسیم شدند. در انتها، خونگیری از قلب موش‌ها انجام شد و پارامترهای تستوسترون، گلوکز، LH، FSH ، AST، ALT، WBC و RBC اندازه گیری شدند. در ادامه، مایع آمنیوتیک جهت سنجش میزان کربوهیدرات‌ها، فسفولیپید، چربی‌ها، پروتئین و اوره جدا شد. در پایان، داده‌ها از نظر آماری مورد ارزیابی قرار گرفتند. تزریق درون صفاقی هروئین تغییرات قابل توجهی را در میزان پرامترهای تستوسترون و تری‌گلیسیرید نسبت به گروه کنترل ایجاد نمود. این در حالی است که در میزان LH و FSH تغیر قابل توجهی مشاهده نشد. همچنین افزایش بیان ژن‌های در نتیجه افزایش دوز هروئین دیده شد. در این بررسی تزریق هروئین حتی در دوزهای پایین توانست باعث افزایش یا کاهش فعالیت تخمدان و اووژنز و در نتیجه اختلال در بلوغ اووسیت‌ها و کیفیت تخمک‌گذاری گردد.

کلمات کلیدی: هروئین، تخمدان، مایع آمنیوتیک، موش صحرایی.

مقدمه

امروزه در سراسر جهان مصرف طیف وسیعی از انواع مواد مخدر (اوپیوئیدها) در حال افزایش است. هروئین یکی از انواع اوپیوئیدهایی است که به دو فرم خالص و ناخالص وجود دارد (۲۲). هروئین که نام شیمیایی آن دی استیل- مورفین است برای اولین بار در سال ۱۸۷٤ توسط یک دانشمند انگلیسی و با استفاده از عمل تقطیر از مرفین استخراج شد (۳). تجزیه شیمیایی هروئین مصرفی در ایران توسط تیم تحقیقاتی دانشکده داروسازی دانشگاه تهران انجام و مشخص گردید که این ماده از مواد مخدری همچون کدئین، مونواستیل مرفین، کافئین، هروئین و مواد غیر مخدر شیر خشک، گرد آجر، پودر بی کربنات و پودر

گلوکز تشکیل شده است (۲۰، ۲۳). مطالعات متعددی اثرات مواد مخدر بر روی اعضاء مختلف بدن را مورد بررسی قرار داده‌اند (۲۱). گزارش‌های مختلفی در مورد اثر مواد مخدر هروئین و مرفین بر روی جنین مادران معتاد صورت گرفته و مشخص گردیده که مواد مخدر می‌توانند باعث ایجاد بسیاری از ناهنجاری‌های جنین و تغییرات مورفولوژیکی شاخ رحم در موش سوری گردند (۱۹).

مایع آمنیوتیک، نوعی ترکیب پیچیده و حیرت آوری است که درون کیسه آمنیوتیک قرار دارد. این مایع علاوه بر اینکه دارای خواص ضدمیکربی است، محتوی ترکیبات بسیار مهمی هم‌چون هورمون‌ها، مواد مغذی و از همه مهم‌تر فاکتورهای رشد متعددی است که از رشد جنین حمایت می‌کند. پایین بودن حجم مایع آمنیوتیک را اصطلاحاً الیگوهیدرآمنیوس و بالا بودن آن را پلی‌هیدرآمنیوس می‌نامند. این مایع در اواخر دوران بارداری در حفره آمنیون جای داشته و اطراف جنین را نیز احاطه می‌کند. در این مرحله حجم کلی آن به ۵۰۰-۲۵۰۰ میلی‌لیتر می‌رسد (۷).

کمی مایع آمنیوتیک می‌تواند به دلیل نشت مایع از غشای آمنیوتیک، اندازه کوچک کیسه در مرحله خاصی از بارداری یا عدم تحرک مناسب جنین اتفاق بیفتد. در سال ۲۰۰۰ تعداد ۱۲ زن با علائم پلی-هیدرآمنیوس تحت درمان با ایندومتاسین (۳- ۲/۲ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) قرار گرفتند که از این تعداد، ۱۱ مورد به درمان پاسخ دادند و ٦/٤ هفته زایمان آنان به تعویق افتاد. در این مطالعه عارضه جانبی مهمی در نتیجه مصرف ایندومتاسین مشاهده نشد. در مطالعه دیگری، ۸ زن مبتلا به پلی-هیدرآمنیوس در سن حاملگی ۲۸/٦ هفته تحت درمان با ایندومتاسین قرار گرفتند که متوسط زمان ختم حاملگی در آنان ۳۹ هفته بود. در این مطالعه نیز همانند مطالعه قبلی، عارضه جانبی مهمی دیده نشد (۲۳). از آن‌جا که استفاده از مواد مخدر از جمله هروئین می‌تواند تأثیر بالقوه‌ای بر روی بافت‌ها، هورمون‌ها، مایع آمنیوتیک، بیان ژن‌های مؤثر در مادر و جنین و سایر فاکتورها داشته باشد، لذا هدف از پژوهش حاضر تعیین اثرات هروئین بر کیسه آمنیون موش‌های باردار و تأثیرات آن بر نسل‌های بعد آن نیز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

٦۰ سر موش صحرایی بالغ ماده نژاد ویستار، با وزن ۲۲۰-۱۸۰ گرم از مرکز تحقیقاتی پژوهشگاه رویان تهیه و به آزمایشگاه مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد تهران شمال منتقل و آماده مطالعه گردید. تمامی حیوانات در شرایط دسترسی کافی به آب و غذا، سیکل نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی همراه با دمای ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. کلیه‌ی اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی بر اساس دستورالعمل‌های اخلاقی انجمن بین‌المللی، رعایت گردید. این پژوهش طی دو مرحله به صورت ذکر شده در زیر صورت گرفت:

در ابتدا به منظور جفت‌گیری حیوانات، هر رت ماده در کنار یک رت نر در قفسی مجزا قرار گرفت. روز اول بارداری با مشاهده پلاک واژینال مشخص شد. در ادامه، مادران باردار در ٦ گروه به صورت زیر گروه‌بندی شدند:

گروه ۱ (گروه کنترل): شامل رت‌های باردار ماده‌ای که تغذیه طبیعی و نرمال دریافت کردند.

گروه ۲ (گروه شم): شامل رت‌های باردار ماده‌ای که آب مقطر دریافت کردند.

گروه ۳: شامل رت‌های باردار ماده‌ای که هروئین را با دوز ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم طی دو نوبت صبح و عصر دریافت کردند.

گروه ٤: شامل رت‌های باردار ماده‌ای که هروئین را با دوز ۲ میلی‌گرم/کیلوگرم طی دو نوبت صبح و عصر دریافت کردند.

گروه ٥: شامل رت‌های باردار ماده‌ای که هروئین را با دوز ۳ میلی‌گرم/کیلوگرم طی دو نوبت صبح و عصر دریافت کردند.

گروه ٦: شامل رت‌های باردار ماده‌ای که هروئین را با دوز ٤ میلی‌گرم/کیلوگرم طی دو نوبت صبح و عصر دریافت کردند.

سپس نوزادان در ٦ گروه $G1_A$ (فرزندان رت‌هایی با تغذیه طبیعی و نرمال)، $G2_B$ (فرزندان رت‌های دریافت کننده آب مقطر)، $G3_C$ (فرزندان رت‌های دریافت کننده دوز ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم هروئین)، $G4_D$ (فرزندان رت‌های دریافت کننده دوز ۲ میلی-گرم/کیلوگرم هروئین)، $G5_E$ (فرزندان رت‌های دریافت کننده دوز ۳ میلی‌گرم/کیلوگرم هروئین) و $G6_F$ (فرزندان رت‌های دریافت کننده دوز ٤ میلی-گرم/کیلوگرم هروئین) گروه‌بندی شدند.

خون‌گیری و سنجش پارامترهای بیوشیمیایی: پس از پایان دوره آزمایش تمامی حیوانات با استفاده از کتامین و زایلازین بیهوش شده و سپس با استفاده از روش خون‌گیری مستقیم از قلب، خون‌گیری از آن‌ها انجام شد. نمونه‌های خون جمع آوری شده، با دور rpm ۳۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و سرم آن‌ها نیز جدا شد. سپس سرم های جدا شده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان انجام سنجش هورمونی نگهداری شد. سطح هورمون استروئیدی تستوسترون توسط کیت سنجش هورمون ساخت شرکتIBL آلمان ارزیابی شد. همچنین سطح هومون‌های LH, FSH با استفاده از دستگاه Vidas pc ساخت کمپانی بیومریو فرانسه مورد سنجش قرار گرفت. علاوه براین، میزان آنزیم‌های کبدی AST, ALT و هم‌چنین تست گلوکز، RBC و WBC نیز اندازه‌گیری شد (۵). در نهایت، بلافاصله بعد از کشته شدن رت مادر، کیسه آمنیون جداشده، وزن هر یک از آن‌ها محاسبه و محتویات داخل کیسه ذخیره گردید و برای بررسی میزان پروتئین، کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها، فسفولیپید و اوره به آزمایشگاه منتقل شدند (١٤).

سنجش مولکولی: در پژوهش حاضر، RNA تام بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده و به کمک TRIzol استخراج شد. جهت ارزیابی کنترل کیفیRNA استخراج شده، میزان جذب نوری آن در طول موج‌های A260/280 با استفاده از دستگاه بیوفتومتر و قرار دادن روی ژل آگاروز ۲/۵ درصد انجام گرفت. سنتز cDNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت Thermo Fisher انجام گرفت. واکنش Real Time PCR به صورت سه مرحله ای با استفاده از Biofact 2X Master Mix انجام گرفت و به روش سایبرگرین طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. در جدول ۱، پرایمرهای مورد استفاده در آزمایش ذکر شده است (١٤).

محاسبات آماری: اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم افزارSPSS و آزمون Kruskal-wallis Test و sample k-s-1 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. سپس با استفاده از نرم افزارExcel نمودارهای مربوطه ترسیم و سطح معنی‌داری $p \leq$ ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

جدول۱- توالی پرایمرهای ژن های P52 و SOX9

نام پرایمر	نوع پرایمر	توالی پرایمر
SOX9	پیشرو	5'ACGCGCTCGCAGTATGAC3'
SOX9	معکوس	5'TGGGTTCATGTAGGTGAAGGTG3'
P52	پیشرو	5'GAGCCCGCGAAGGTTTTAC3'
P52	معکوس	5'CCTCTTGCAGGGTCGTGAA3'

نتایج

نتایج حاصل از سنجش پارامترهای بیوشیمیایی گروه‌های مورد بررسی در این پژوهش، در جدول۲ و نمودار ۲ آورده شده است. همان‌طور که در جدول ۲ مشخص است در گروه‌های تجربی دریافت کننده‌ی هروئین اختلاف قابل توجهی در سطح تغییرات پلاسمایی هورمون LH و FSH نسبت به گروه کنترل دیده نمی‌شود. در گروه‌های H1-2، H1-3 و H3-2 میزان هورمون FSH یکسان و برابر با ۰/۹۰٦ است. برخلاف هورمون‌های LH و FSH، نتایج حاصل از سنجش هورمون تستوسترون در گروه‌های دریافت کننده هروئین که با استفاده از کیت انجام شده است، نشان دهنده اختلاف قابل توجهی نسبت به گروه کنترل می باشد.

گروه‌های H3-1 و H1-3 به ترتیب دارای بیش‌ترین و کم‌ترین میزان هورمون تستوسترون نسبت به گروه کنترل هستند. میانگین تغییرات هورمون AST در گروه H2 از دیگر گروه‌های دریافت کننده هروئین بیش‌تر است. علاوه براین، میزان هورمون T.G در تمام گروه‌های H، نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان می‌دهد (جدول ۲) و (نمودار ۲).

بررسی نتایج حاصل از سنجش پارامترهای پروتئین و گلوکز نشان دهنده اختلاف معنی‌دار میزان پروتئین موجود در نمونه‌های گروه H دریافت کننده هروئین نسبت به گروه کنترل می‌باشد و بیشترین میزان آن مربوط به گروه H2-3 است. این در حالی است که گروه H1-3 دارای کم‌ترین میزان گلوکز و گروه H4-2 دارای بیشترین میزان گلوکز نسبت به گروه کنترل می‌باشند (جدول ۳ و نمودار ۳).

جهت حصول اطمینان از عدم تجزیه‌ی RNA های استخراج شده، کیفیت آن ها به کمک الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. مشاهده باندهای ۸S و ۱۸S بر روی ژل، بیانگر عدم تجزیه‌ی RNA می‌باشد. پس از سنتز cDNA، PCR معمولی به منظور تأیید پرایمرها انجام شد. در این پژوهش SOX9 و P52، که ژن‌های هدف هستند، به وسیله ژن مرجع GAPDH نرمال شده اند. بیان نسبی ژن‌های هدف، بر روی ۸ رت، در بین گروه‌های آزمایشی H1،S، H2، H3و H4، توسط روش ΔCT و محاسبه $^{\Delta CT}$ ۲ انجام شد. با توجه به داده‌های حاصل از Real- Time PCR، ابتدا CT های ژن‌های SOX9 و P52 در گروه‌های آزمایشی با ژن مرجع مورد مقایسه قرار گرفت. نسبت کلی ژن‌های SOX9 و P52، به GAPDH، به ترتیب ۳/٦٤ و ۳/۲٦ می‌باشد (جدول ٤).

در پنج گروه آزمایشی H1،S، H2، H3و H4 با دوزهای مختلف از هروئین (٤ دوز)، بیان ژن‌های SOX9 و P52 بررسی شد. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش دوز هروئین، بیان این ژن‌ها افزایش می‌یابد. افزایش معنی‌دار در بیان ژن‌های SOX9 و P52 در گروه دریافت کننده هروئین H4 مشاهده می‌شود (نمودار ٤).

جدول ۲- نتایج حاصل از سنجش پارامترهای بیوشیمیایی

Sample	GH (ng/ml)	FSH (mlU/mL)	LH (mlU/mL)	Testos (ng/ml)	SGOT (U/L)	SGPT (U/L)	GLU (mg/dL)
Control sample-1	<۰/۰۵	۰/۸۶۰	۰/۶۵۱	٤/٥٩٦	٦١	٥٦	١٠٣
Control sample-2	<۰/۰۵	۰/۸۳۲	۰/٦٨١	٤/١٢٠	٥٥	٤١	٩٦
H1-1	<۰/۰۵	۰/۸۷۸	۰/٦٨٦	١١/٦٩٠	٤٩	٩٣	٤٢
H1-2	<۰/۰۵	۰/۹۰٦	۰/٦٦١	٥/٦٠٨	٤٠	٨٦	٤٩
H1-3	<۰/۰۵	۰/۹۰٦	۰/٦٧٢	٤/٦٠٣	٨٥	٥٤	٨٤
H2-1	<۰/۰۵	۰/۸۹۳	۰/٦٩٦	٦/٩٤٦	١٣٩	٨٤	٤٠
H2-2	<۰/۰۵	۰/۹۳۹	۰/٦٩٣	٧/٤٣٢	١٦١	٦٢	٧٥
H2-3	<۰/۰۵	۰/۹٦٣	۰/٦٤٥	٨/٣١١	١٥٠	٦٧	٧٩
H3-1	<۰/۰۵	۰/۸۷۱	۰/٥٩٤	١٤/٣٦٢	١٤٧	٣٦	١٠٨
H3-2	<۰/۰۵	۰/۹۰٦	۰/٦٦٩	٨/٤٣٤	١٢٣	٤٣	١١٢
H3-3	<۰/۰۵	۰/۸۹۱	۰/٦٣٥	١٢/٣٠٧	١٣٥	٧١	٧٥
H4-1	<۰/۰۵	۰/۹۰٥	۰/٧٢٥	٩/٠١٨	١٨٢	٦٦	١١٤
H4-2	<۰/۰۵	۰/۹٧۰	۰/٧٠٤	٧/٢٨٨	٩٣	٥٤	١٨٧
H4-3	<۰/۰۵	۰/۹۹۰	۰/٦٣٩	٧/٦٥٢	١٣٧	٤٠	١٣٩

Sample	LDL (mg/L)	HDL (mg/L)	Chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	Ph (mg/dL)	Urea (mg/dL)
Control sample-1	١٦٠	٣٥	٦٨	٣٤٧	٤/١	٤٨
Control sample-2	١٦٩	٣٧	٩٠	٤٩٥	٣/٥	٣٣
H1-1	١١٧	٢٥	٧١	٢٣١	٤/٧	٤٦
H1-2	٩٣	٢٥	٤٥	١٩٩	٧/٦	٦١
H1-3	٥٣	٤٥	٧٦	٩٩	٥/٠	٤٢
H2-1	٤٤	٤٠	٦٩	٦٠	٨/١	٣٦
H2-2	٨٦	٤٥	١٠٠	٢٩٥	٧/٧	٥٨
H2-3	٩٧	٤٥	١٠١	٢٨٥	٧/٥	٦٠
H3-1	٣٥	٢٩	٥٥	٧٠	٧/٢	٢٧
H3-2	١٤٠	٣١	٨٧	٣٥١	٦/١	٤٤
H3-3	٩٠	٣٩	٧٤	٢١١	٥/٩	٤٤
H4-1	٥٠	٣٣	٤٤	٨٨	٨/٢	٦٠
H4-2	١٠٠	٣٠	٨١	٢٩١	٦/١	٣٧
H4-3	٧٠	٢٤	٤٨	١٦٩	٦/٦	٤٣

جدول۳- مقادیر گلوکز و پروتئین موجود در نمونه‌های مایع آمنیوتیک.

نمونه مایع آمنیوتیک	پروتئین	گلوکز
نمونه کنترل ۱	۹۸/۹	٥٦
نمونه کنترل ۲	۹۰/۸	٥١
H1-1	۳۹۳/٦	٤٩
H1-2	۳۹٦/۰	٥٠
H1-3	۳۸٥/۱	٢٣
H2-1	۳۹۱/۹	٤٥
H2-2	۳۸۹/۲	٤٣
H2-3	٤۰۰/۱	٤٢
H3-1	۳۹٦/۳	٤٥
H3-2	۳۷۳	٥١
H3-3	۳۸۱/۹	٤٠
H4-1	۳۹٤/۸	٢٩
H4-2	۳۹۸/۳	٦٢
H4-3	۳۹٥/۷	٢٦

جدول٤- بررسی کمی بیان ژن‌های P52 و SOX9 با استفاده از روش Real-Time PCR

Number of Rat	Treatment	SOX9 ct	P52 ct	GADPH ct	delta ct SOX9	delta ct P52	delta delta ct SOX9	delta delta ct P52	SOX9 ratio	P52 ratio
۱	H1-1	۲۳/۹۶	۲۲/۴۹	۱۸/۳۷	۵/۵۹	۴/۱۲	-۰/۶۸	-۰/۶۴	۱/۶۰۲۱۴	۱/۵۵۸۳۲۹
۲	H1-2	۲۴/۵۶	۲۲/۴۲	۱۸/۹۴	۵/۶۲	۳/۴۸	-۰/۶۵	-۱/۲۸	۱/۵۶۹۱۶۸	۲/۴۲۸۳۹
۳	H2-1	۲۳/۸۳	۲۲/۳۷	۱۹/۰۳	۴/۸	۳/۳۴	-۱/۴۷	-۱/۴۲	۲/۷۷۰۲۱۹	۲/۶۷۵۸۵۵
٤	H2-2	۲۳/۶۲	۲۲/۳۳	۱۸/۵۵	۵/۰۷	۳/۷۸	-۱/۲	-۰/۹۸	۲/۲۹۷۳۹۷	۱/۹۷۲۴۶۵
٥	H3-1	۲۳/۱۲	۲۱/۹۱	۱۸/۲۲	۴/۹	۳/۶۹	-۱/۳۷	-۱/۰۷	۲/۵۸۴۷۰۶	۲/۰۹۹۴۳۳
٦	H3-2	۲۲/۹۱	۲۲/۱۵	۱۹/۱	۳/۸۱	۳/۰۵	-۲/۴۶	-۱/۷۱	۵/۵۰۲۱۶۷	۳/۲۷۱۶۰۸
۷	H4-1	۲۲/۶۶	۲۱/۰۶	۱۸/۹	۳/۷۶	۲/۱۶	-۲/۵۱	-۲/۶	۵/۶۹۶۲۰۱	۶/۰۶۲۸۶۶
۸	H4-2	۲۲/۴۷	۲۱/۲۱	۱۹/۰۴	۳/۴۳	۲/۱۷	-۲/۸۴	-۲/۵۹	۷/۱۶۰۲۰۱	۶/۰۲۰۹۸۷
۹	S	۲۴/۵۳	۲۳/۰۲	۱۸/۲۶	۶/۲۷	۴/۷۶	Total ratio:		۳/۶۴	۳/۲۶

بحث

هروئین همانند سایر اپیوئیدها یکی از انواع ترکیبات مقلد نوروترنسمیترها است که می‌تواند در نتیجه اشغال رسپتورها و هم‌چنین مداومت در مصرف، علاوه بر ایجاد اعتیاد قادر است بر روی سیستم تولیدمثلی اختلالاتی را نیز ایجاد کند (۱۸).

مطالعات متعددی حاکی از آن است که مصرف هروئین اثرات زیان‌باری را بر روی اندام‌های مختلف ازجمله دستگاه تناسلی باقی می‌گذارد (۱۱). در پژوهش حاضر مشخص شد که تزریق درون صفاقی هروئین در دوزهای مختلف مورد بررسی (۱، ۲، ۳ و ٤ میلی گرم بر کیلوگرم) قادر است تغییرات قابل توجهی را در میزان پارامترهای T.G، AST و تستوسترون ایجاد نماید. این در حالی است که هروئین بر روی هورمون‌های LH و FSH تغییرات قابل توجهی را ایجاد نکرده است. این مطالعه با برخی نتایج مطالعات دیگر مطابقت داشت. از طرفی دیگر در این پژوهش، هروئین تغییرات بسیار زیادی را در بافت تخمدان ایجاد کرد که از آن جمله می‌توان به ۱) تخریب و پراکنده شدن سلول‌های زمینه‌ای (کورتکس)، ۲) ایجاد مشکل رشد و نمو در فولیکول-ها، ۳) نازک شدن لایه تکا و جدا شدن آن از فولیکول، ٤) کاهش تعداد سلول‌های گرانولوزا، ٥) به هم ریختگی نظم، ترتیب و شکل سلول‌های موجود برخلاف گروه کنترل اشاره نمود. گنادوتروپ‌ها از نظر فیزیولوژی دارای ساختاری بسیار پیچیده هستند و توسط مکانیسم‌های متعددی هم‌چون هورمون‌ها، نوروترنسمیترها و رسپتورهای مختلفی رخ می‌دهد. از آن‌جا که مواد مخدر دارای ساختاری مشابه با این عوامل هستند بنابراین به سهولت می‌توانند جایگزین شده و اثرات زیان‌بار و مخرب خود را بر روی سیستم تولیدمثلی هم‌چون گامتوژنز و هورمون‌های جنسی اعمال کنند (۱، ٦). در مطالعه‌ای نشان داده شد که تزریق مداوم مورفین در فواصل ٦ ساعت در دوره بارداری با غلظت افزایشی ۲/٥-۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم در هر روز باعث ۳٤٪ سقط و کاهش وزن نوزادان خرگوش‌ها شد (۱۳، ۱۷).

Knigge و همکاران در سال ۱۹۸٤ نشان دادند که اکستازی با گیرنده‌های هیستامین میل ترکیبی بسیار زیادی دارد و از آن‌جا که هیستامین باعث افزایش پاسخ LH به ترشح GnRH می‌شود، بنابراین منجر به پاره‌شدن زودرس فولیکول‌ها و آزاد شدن پیش از هنگام تخمک‌ها می‌گردد (۹).

نتایج به دست آمده از مطالعه‌ای دیگر نشان داد که تجویز مداوم مورفین با دوز افزایشی ٤۰-۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز باعث مرگ ۹٤٪ نوزادان موش صحرایی، ٤۸ ساعت بعد از تولد شده است؛ اما در اندازه نوزادان و نسبت تعداد نوزادان نر به ماده تفاوتی مشاهده نشد (۱٥).

در مطالعه دیگری نشان داده شد که مصرف دوز بالای مورفین (به صورت تزریق زیرجلدی)، در موش سفید CF_1 در روز هشتم بارداری منجر به ایجاد اگزنسفالی و باقی ماندن بیضه در بدن می شود ولی تزریق مورفین در روز نهم بارداری، منجر به ایجاد نقص در ساختار اسکلت محوری بدن نوزادان می‌شود (۱٦). بر اساس دیگر پژوهش‌های صورت گرفته، مشخص شده است که در اندام‌های تولید مثلی و سلول‌های جنسی فرزندان موش صحرایی تیمار شده با مورفین (قبل از بارداری و حین بارداری) ناهنجاری و نواقصی ایجاد می‌شود. علاوه براین نشان داده شده است که مورفین می‌تواند بر تغذیه مادر و رشد جنین خرگوش‌ها تأثیرگذار باشد و باعث کاهش معنی‌دار جذب غذا توسط مادر می‌شود (۲). مطالعات نشان داده اند که بچه‌های مادران معتاد به مواد مخدر در سال اول و دوم زندگی دچار هیپراکتیویتی شده اند.

تجویز ۰/٦٦ میلی‌گرم بر کیلوگرم مورفین به گوسفند حامله، تغییر مهمی در جریان خون نافی یا مصرف اکسیژن جنینی ایجاد نکرد اما میزان گلوکز سیاهرگ نافی کاهش یافت. در واقع تجویز مورفین به مادر، تعادل گلوکز جنینی را به دلیل کاهش نفوذ جفتی تغییر می‌دهد. مورفین قادر است اوولاسیون موش صحرایی را بلوکه کرده و سیکل ماهیانه را در انسان نامنظم می‌کند (۱۰، ۱۲).

نتایج حاصل از مطالعه‌ای بر روی عصاره گیاهانی چون خشخاش، نشان داده شد که این گیاه می‌تواند باعث ایجاد اختلالاتی بر روند تولیدمثلی در هر دو جنس مذکر و مونث شود به طوری‌که نوزادانی که والدین آن‌ها دچار مصرف سوء مواد مخدر هستند، مبتلا به اختلالات ریوی و هورمونی می‌شوند و سلول‌های بافت ریه آن‌ها پس از تولد از بین می روند. علاوه براین نشان داده شد که آن‌ها دچار اختلالات هورمونی در دوران بعد از بلوغ شده و میزان توانایی آن‌ها در تولید مثل در نسل‌های بعدی به شدت کاهش می‌یابد (۸). براساس مطالعات صورت گرفته احتمال می‌رود که اثرات تخریب کنندگی هروئین بر روی بافت تخمدان به دلیل افزایش دمای بدن بوده که ساختار قادر است بافت تخمدان را تحت تأثیر قرار دهد. علاوه بر این، مواد مخدر هم‌چون هروئین می‌توانند در نتیجه‌ی آزاد نمودن نوراپی نفرین از پایانه‌های اعصاب سمپاتیک، منجر به ایجاد تغییراتی در عروق خونی تخمدان شوند و در نهایت باعث آسیب فولیکول‌ها گردد (۱۸).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که مصرف هروئین چه در دوزهای پایین و چه در دوزهای بالا، با مکانیسم‌های مختلفی همچون اتصال به رسپتورها، باعث افزایش یا کاهش فعالیت تخمدان و اووژنز و به دنبال آن ایجاد اختلال در کیفیت تخمک‌گذاری و بلوغ اووسیت‌ها نیز می‌شود.

تشکر و قدردانی

با سپاس فراوان از آزمایشگاه گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد واحد تهران شمال و هم‌چنین کتابخانه این مجموعه و تشکر قدردانی از کارشناسان آزمایشگاه جانوری، هم‌چنین بر خود واجب می‌دانیم تا از معاونت پژوهشی این دانشگاه کمال تشکر و قدردانی را داشته باشیم.

منابع

1. 14-Casteloot I.D., Montel V., Croix D., Laborie C., Camp G.V. (2001). Activities of the pituitary-adrenal and gonadal axes during the estrous cycle in adult female rats prenatally exposed to morphine. *Brain Res*, 902(1): 66-73.

2. 20-Chitwood D.D., Sanchez J., Comerford M., Page J.B., McBride D.C., Kitner K.R. 2000. First injection and current risk factors for HIV among new and long-term injection drug users. *AIDS Care*, 12: 313–320.

3. 2-Dodangeh balakhani, e., Asgari, f. 2004. Inhibitory effect of ascorbic acid on development of dependency to heroin in rats. Koomesh, 6(1):73-82.

4. 8-Haghighi L., Rahmani E. 2002. Indomethacin therapy in severe polyhydramnios. Rjms, 8(26): 411-413.

5. 9-Hatami H, Khajehnasiri N. 2015. The effect of intraperitoneally injection of Crystal meth on pituitary-gonad axis in adult male Rats, Yafteh, 17(2): 81-89. [In Persian]

6. 13-Golan M., Zelinger E., Zohar Y., Levavi-Sivan B. 2015. Architecture of GnRH-Gonadotrope-vasculature reveals a dual mode of gonadotropin regulation in fish. *Endocrinology*, 156 (11):4163-4173.

dependence. University of welfare & rehabilitation sciences [In Persian].

16.19-Razzaghi E.M., Movaghar A.R., Green T.C., Khoshnood K. 2006. Profiles of risk: a qualitative study of injecting drug users in Tehran, Iran. *Harm Reduc J*, 3(12): 1-13.

17.15-Razzaghi E., Rahimi Movaghar A. 2003. Rapid Assessment and Response (RAR). Tehran: World Health Organization, 9-20. [In Persian].

18.11-Safi E., Noori A., Pilehvarian A.A. 2018. The Effect of Methamphetamine Injection during Post-Lactation on the Ovaries of Adult Rats, Qom University of Medical Sciences Journal, 12(7): 32-40. [In Persian]

19.6-Shadkhast M, Tootian Z, Fazelipour S, Bokaii S. (2003). Study of Morphological Changes of Uterine Horn of Surri Mouse Depended to Morphine Before Puberty and DuringPuberty. Tehran Univ Med J; 61(6):475-483. [In Persian]

20.3-Shamberova R., Vathy I. 2002. Gonadal hormone–induced changes in adult male and female rats exposed to early postnatal handling is not altered by prenatal morphine exposure. *Pharmacol Biochem Behav*, 72:22-27.

21.5-Toutian, Z., Fazelipour, S. 2001. The effect of oral administration of heroin on the embryo of addicted balb/c mice. journal of veterinary research, 56(4):73-79. [In Persian]

22.1- Toutian, Z., Fazelipour, S. 2005. Study of the effect of heroin used in iran, on spermatogenesis changes and their development in balb/c mice. tehran university medical journal (tumj), 63(1):24-27. [In Persian]

23.4-Yilmaz B. 1999. Influence of chronic morphine exposure on serum LH, FSH, Testosterone levels and body and testicular weights in the developing male rat. *Physiology*, 43:189–196.

7. 7-Hui L., Bianchi D.W. 2011. Cell-free fetal nucleic acids in amniotic fluid. *Hum Reprod Update*, 17(3): 362-371.

8. 23-Kippler M., Hoque A.M., Raqib R., Ohrvik H., Ekström E.C., Vahter M. 2010. Accumulation of cadmium in human placenta interacts with the transport of micronutrients to the fetus. *Toxicol Lett*, 192:162-168.

9. 17-Knigge U., Wollesen F., Dejgaard A., Larsen K., Christiansen P.M. 1984. Modulation of basal and LRH stimulated gonadotrophin secretion by histamine in normal men. *Neuroendocrinology*, 38 (2):93-95.

10.22-Kosanovic M., Jokanovic M., Jevremovic M., Dobric S., Bokonjic D. (2002). Maternal and fetal cadmium and selenium status in normotensive and hypertensive pregnancy. *Biol Trace Elem Res*, 89:97-103.

11.12-Lal P., Rajeshwari D.K. 1997. Effect of chronic naloxone and morphine treatments on testicular, body weight, and plumage pigmentation cycle of lal munia, estrilda amandava. *Gen Comp Endocrinol*, 107:2–11.

12.21-Ministry of Health and Medical Education of Iran. 2002. [HIV/AIDS in Iran]. Tehran: Deputy of Health. (Persian)

13.16-Mirahmadizadeh A. 2007. Study of effectiveness of substance abuse prevention program among military garrison's conscripts in Fars province. Iranian research center for substance abuse and dependence. University of welfare and rehabilitation sciences, 14-65. [In Persian].

14.10-Mojtahedi F, Mansouri R, Abroun S 2019. The effect of human amniotic fluid on the survival and proliferation of human myeloma cell lines RPMI8226 and U266 in comparison with the fetal bovine serum. RJMS, 26(4): 54-69. [In Persian]

15.18-Raheb G. 2008. Role of social workers in addict and addiction. Iranian research center for substance abuse and

Effect of Heroein on Amniotic Sac Compounds in Pregnant Rats and Ovarian of Their Female Offspring

Fatemeh Osanloo[1], Ramin Hajikhani[*1], Gholam Hassan Vaezi[*2], Maryam Bananaj[1]

1- Department of Biology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran
2- Department of Biology, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran

Abstract

Heroin is one of the most addictive drugs used among adolescents and young people in Iran. Since the use of drugs such as Heroin has detrimental effects on organs, tissues, hormones, amniotic fluid, and expression of genes affecting the mother and fetus, as well as other factors, the aim of this study was to investigate the effects of methamphetamine on the amniotic sac of pregnant rat and its effects on subsequent generations. Sixty adult Wistar female rats were assigned to six groups: control group, sham group, group receiving 1 mg/kg heroin, group receiving 2 mg/kg heroin, group receiving 3 mg/kg heroin and the group receiving 4 mg/kg heroin. At the end of the experimental period, blood samples were taken from the hearts of the mice and the desired parameters such as testosterone, glucose, LH, FSH, AST, ALT, WBC, and RBC were measured. The rats were then dissected; amniotic fluid was isolated to assess the amount of carbohydrates, protein, phospholipids, fats, and urea. Finally, statistical analysis was performed. Intraperitoneal injection of heroin caused significant changes in testosterone and T.G parameters compared to the control group. However, no significant change was observed in LH and FSH levels. In addition, many changes such as weakening and thinning of the theca layer in the graph follicle, destruction of the underlying material and growing follicles following heroin use in the ovarian tissue. Moreover, increased gene expression was seen after increasing the dose of heroin.
In this study, heroin injection, even in low doses, could increase or decrease ovarian activity and oogenesis, resulting in impaired oocyte maturation and ovulation quality.

Keywords: Heroin, Ovary, Amniotic Fluid, Rat