



## Investigating the effect of methadone on lifespan up to the fourth generation, fertility, whole body malondialdehyde level and brain tissue damage in the first generation of *Drosophila*

Zahra Rostami<sup>1</sup>

Master's degree, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran.  
z.r.mahdia96@gmail.com

Majid Hassanpourezatti<sup>2</sup>

Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran  
(Corresponding author). Hassanpour@shahed.ac.ir

### Abstract

**Objective:** Preliminary documentation shows that the use of opioids can affect the lifespan and function of the reproductive system. In this study, the effect of oral methadone consumption by parents and the first generation on the level of malondialdehyde in the whole body, brain tissue damage in the first generation, and life span, and the fertility of flies and the transmission of the effect up to four generations have been investigated.

**Materials and methods:** During the laying period and the first generation, parent flies (10 of each sex) were treated orally with methadone (0.1, 1, 5, 10 and 100 micromol) and the positive control group was treated with metronidazole (1 and 2 mg in liters) were placed. The number of live flies and offspring in each group were counted weekly for a maximum of 94 days. The concentration of malondialdehyde was measured in whole body homogenates (30 of each gender) using a commercial kit. Areas without cells were counted in brain tissue sections after hematoxylin-eosin staining.

**Findings:** 10 and 100 micromol doses of methadone led to death and 5 micromol doses caused complete sterility of flies. The life span and the number of offspring of flies in a sex-dependent manner decreased after oral administration of doses of 0.1 and 1  $\mu\text{mol/L}$  methadone. The content of malondialdehyde increased to 0.6  $\mu\text{mol/mg}$  only in male flies under the effect of methadone (1  $\mu\text{mol}$ ), and the number of cell-free areas in a section prepared from brain tissue increased to 60 compared to 15 in the control group. The effects observed in female flies were different from males.

**Conclusion:** Using methadone by the parents and the first generation of flies by stimulating the production of fat peroxidation products in the body and brain damage reduces the lifespan and reduces reproduction in the first generation and its transfer to the next generation.

**Keywords:** Methadone, *Drosophila*, Heredity, Malondialdehyde, Fertility, Lifespan, Brain.

Received: 2023/05/03 ; Revised: 2023/06/19 ; Accepted: 2023/07/07 ; Published online: 2023/12/26

Cite: Rostami, Z. & Hassanpourezatti, M. (2023). Investigating the effect of methadone on lifespan up to the fourth generation, fertility, whole body malondialdehyde level and brain tissue damage in the first generation of *Drosophila*. *Applied Biology*, 13(4), p. 37-54.

Article type: Research Article

© the authors

Publisher: Qom Islamic Azad University





## بررسی اثر متادون بر طول عمر تا نسل چهارم، باروری، سطح مالون دی آلدئید کل بدن و آسیب‌های بافتی مغز در نسل اول مگس‌های سرکه

زهرارستمی<sup>۱</sup> | کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران. z.r.mahdia96@gmail.com  
مجید حسن‌پور عزتی<sup>۱</sup> | استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران (نویسنده مسئول). Hassanpour@shahed.ac.ir

### چکیده

**هدف:** مستندات اولیه نشان می‌دهند که مصرف مواد افیونی می‌تواند بر طول عمر و عملکرد دستگاه تولید مثلی تاثیر بگذارد. در این مطالعه، اثر مصرف خوراکی متادون توسط والدین و نسل اول بر سطح مالون دی آلدئید کل بدن، آسیب‌های بافت مغز در نسل اول، و طول عمر، و باروری مگس‌ها و انتقال اثر تا چهار نسل بررسی شده است. **مواد و روش‌ها:** در دوره تخم‌گذاری و نسل اول، مگس والد (۱۰ عدد از هر جنس) تحت درمان خوراکی با متادون (۰،۱، ۰،۵، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومول) و گروه کنترل مثبت تحت درمان با مترونیدازول (۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند. تعداد مگس‌های زنده، و فرزندان در هر گروه حداکثر برای ۹۴ روز به صورت هفتگی شمارش شدند. غلظت مالون دی آلدئید در هموژنای کل بدن (۳۰ عدد از هر جنس) به کمک کیت تجاری اندازه‌گیری شد. نواحی فاقد سلول در برش‌های بافت مغز پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اُئوزین شمارش شدند.

**یافته‌ها:** مصرف دوزهای ۱۰ و ۱۰۰ میکرومول متادون منجر به مرگ و دوز ۵ میکرومول باعث عقیمی کامل مگس‌ها شد. طول عمر و تعداد فرزندان مگس‌ها به صورت وابسته به جنس، بدنبال مصرف خوراکی دوزهای ۰،۱ و ۱ میکرومول در لیتر متادون کاهش یافت. محتوای مالون دی آلدئید فقط در مگس‌های نر تحت اثر متادون (۱ میکرومول) به ۰،۶ میکرومول/میلی‌گرم افزایش یافت و تعداد مناطق بدون سلول در یک مقطع تهیه شده از بافت مغز به ۶۰ عدد در مقایسه با گروه کنترل ۱۵ عدد افزایش یافت. اثرات مشاهده شده در مگس‌های ماده، متفاوت از نر بود.

**نتیجه‌گیری:** مصرف متادون توسط والدین و نسل اول مگس‌ها از طریق تحریک تولید محصول پراکسیداسیون چربی‌ها در بدن و آسیب مغزی باعث کاهش طول عمر و کاهش تولید مثل در نسل اول و انتقال آن به نسل بعدی می‌شود.

**کلیدواژه‌ها:** متادون، مگس سرکه، توارث، مالون‌دی‌آلدئید، باروری، طول عمر، مغز.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۳؛ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۳/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۱۶؛ تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۱۰/۰۵  
استاد به این مقاله: رستمی، زهرا؛ حسن‌پور عزتی، مجید (۱۴۰۲). بررسی اثر متادون بر طول عمر تا نسل چهارم، باروری، سطح مالون دی آلدئید کل بدن و آسیب‌های بافتی مغز در نسل اول مگس‌های سرکه. *بیولوژی کاربردی*، ۱۳(۴)، ص ۳۷-۵۴.

نوع مقاله: پژوهشی

© نویسندگان

ناشر: دانشگاه قم



## ۱. مقدمه

تسریع در فرایند پیری، اختلال در فرایندهای تولیدمثلی، و احتمال انتقال عوارض ناشی از مصرف مواد مخدر به نسل‌های بعدی، از موضوعات نگران‌کننده برای جامعه بشری محسوب می‌شوند (۱-۳). فرضیه تشدید فرایند استرس اکسیداتیو بیان می‌کند که اختلالات فیزیولوژیک در بدن مرتبط با استرس اکسیداتیو سبب افزایش سرعت پدیده پیری خواهند شد (۴). بر این اساس، افزایش سطح مالون دی‌آلدنید بافتی به عنوان محصول پراکسیداسیون چربی‌ها و شدت آسیب‌های وارده به بافت‌های تولیدمثلی، و مغزی، بدنبال مصرف مواد مخدر اپیوئیدی از سوی دیگر، با پدیده پیری زودرس مرتبط هستند (۵-۸). اما نظریه دیگر هم وجود دارد که پیری را حاصل تجمع تدریجی آسیب‌های وارده به ماده ژنتیکی نوروها در مغز و کاهش قدرت ترمیم و بروز تدریجی اختلال در ساختار و عملکرد سیستم عصبی معرفی می‌کند (۹).

متادون، یک آگونیست اپیوئید صناعی با تاثیر طولانی مدت است که به طور متداول در بیش از ۶۰ کشور جهان برای درمان نگهدارنده بیماران مبتلا به سوءمصرف مواد مخدر اپیوئیدی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۰). افزایش استرس اکسیداتیو، التهاب و کاهش عملکردهای شناختی، در بیماران تحت درمان نگهدارنده با این دارو گزارش شده است (۱۱). کوتاه‌شدگی در تلومر گلوبول‌های سفید خون، به عنوان یک علامت ملکولی تسریع فرایند پیری در نظر گرفته می‌شود. چنین اتفاقی در نمونه‌های خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران مصرف‌کننده مواد مخدر اپیوئیدی مشاهده شده است، که خود گواهی بر انتقال بین نسلی اثرات مواد مخدر اپیوئیدی در انسان است (۱۲). نتایج برخی مطالعات انسانی به انتقال اثرات نامطلوب مصرف متادون در طول بارداری از مادران به فرزندان اشاره کرده‌اند (۱۳-۱۵). مستندات نیز دال بر انتقال بین نسلی اثرات نامطلوب ترکیبات اپیوئیدی توسط مصرف‌کنندگان، حتی پس از قطع مصرف این مواد ارائه در دست است (۱۶). تمامی این شواهد، دال بر این نکته هستند که مصرف مواد اپیوئیدی نه تنها بر سلامت مصرف‌کنندگان اثر نامطلوب می‌گذارد و سبب کاهش طول عمر آنها می‌شود، بلکه این اثرات به فرزندان و نسل‌های بعدی نیز انتقال می‌یابند.

مطالعه روی ساختار سلول‌های عصبی مگس سرکه، وجود هر دو نوع گیرنده اپیوئیدی میو و کاپا را در این ساختار تأیید کرده است (۱۷). همچنین، شباهت ساختاری بسیار بالایی بین انواع گیرنده‌های اپیوئیدی شناسایی شده در مگس سرکه با همین گیرنده‌ها در مهره‌داران عالی نشان داده شده است (۱۸).

لذا، در این مطالعه به بررسی اثر مصرف خوراکی متادون در طول دوره آمیزش توسط والدین و نسل اول، بر طول عمر و تعداد زادگان مگس‌های سرکه در همان نسل و تا نسل چهارم به تفکیک جنس پرداخته شده است. به علاوه، سطح مالون دی‌آلدئید در توده بدنی و آسیب‌های وارد به بافت مغزی در نسل اول، به عنوان بیومارکرهای آغازگر پیری مورد بررسی قرار گرفته‌اند. همچنین در این مطالعه، اثرات متادون با اثرات داروی مترونیدازول به عنوان یک داروی استاندارد با عوارض کاهش طول عمر و القاء ناباروری در مگس سرکه مقایسه شد (۱۹). نوآوری این پژوهش مطرح کردن پراکسیداسیون لیپیدی در توده بدنی به عنوان نشانگر زیستی شدت عوارض تولیدمثلی و تشدید پیری و انتقال بین‌نسلی اثرات استفاده از داروی اپیوئیدی متادون است.

## ۲. مواد و روش‌ها

۱-۲- مواد: متادون از شرکت تمد، و مترونیدازول از شرکت پارس دارو تهیه شدند. بقیه مواد برای تهیه محیط کشت همگی از فروشندگان معتبر خریداری شدند. محیط کشت استاندارد مگس‌های سرکه حاوی آرد سفید ۲۵ گرم، شکر ۱۶ گرم، مخمر ۲۵ گرم، آگار ۱۲ گرم، اسید پروپیونیک ۳/۵ سی‌سی بود. محیط کشت حاوی متادون با افزودن متادون، با غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۵، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومول/لیتر به این محیط کشت استاندارد تهیه شدند. انتخاب این دوزها براساس مطالعات قبلی برون تتی (In Vitro) در ارتباط با اثرات نامطلوب متادون بر روی سلول‌های عصبی صورت گرفت (۲۰).

۲-۲- گروه‌های آزمایشی: مدل خوراکی مصرف متادون و مترونیدازول در مگس سرکه مطابق با مدل‌های مطالعاتی قبلی تدوین شد (۲۱، ۲۲). گروه‌بندی مگس‌ها در جدول (۱) آمده است.

جدول ۱- گروه‌بندی مگس‌های سرکه براساس رژیم داروی دریافتی

گروه‌ها	کنترل	درمان	درمان	درمان	درمان	درمان	درمان
تغذیه	محیط کشت استاندارد	متادون ۰٫۱ میکرومولار	متادون ۱ میکرومولار	متادون ۵ میکرومولار	متادون ۱ میکرومولار	متادون ۵ میکرومولار	متادون ۵ میکرومولار
تغذیه	محیط کشت استاندارد	مترونیدازول ۱ میلی‌گرم/لیتر	مترونیدازول ۲ میلی‌گرم/لیتر				

مگس‌های سرکه به تفکیک جنس به گروه‌های (۱) کنترل تغذیه شده با محیط کشت استاندارد، (۲) تغذیه شده با محیط کشت حاوی دوزهای ۰/۱، ۱، ۵ میکرومول/لیتر از متادون و (۳) تغذیه شده با محیط کشت حاوی دوزهای ۱ و ۲ میلی‌گرم/لیتر از مترونیدازول تقسیم‌بندی شدند. تمام

محیط‌های کشت توسط اتوکلاو استریل گردیدند.

**۳-۲. روش بررسی اثر متادون بر طول عمر مگس‌های سرکه تا چهار نسل:** ابتدا ۱۰ عدد مگس از هر جنس به عنوان والدین، به مدت ۳ روز بر روی هر یک از محیط‌های کشت فوق‌نگهداری و پس از تخمگذاری، از محیط کشت خارج شدند. فرزندان نسل اول بدنبال خروج از شفیره به تفکیک جنس در محیط حاوی دوزهای مختلف متادون، مترونیدازول و یا استاندارد تمام طول عمر نگهداری شدند. هر سه روز یکبار محیط‌های کشت با محیط کشت‌های جدید تعویض می‌شدند. تعداد مگس‌های زنده در هر محیط کشت تا آخر روز که مگس‌ها زنده بودند، برای هر کدام از گروه‌ها ثبت می‌شد (۲۳). مگس‌های دریافت‌کننده مترونیدازول فقط برای تعیین اثرات مستقیم مصرف این دارو و فقط برای یک نسل، در روی محیط کشت پرورش یافتند (۲۴). تعداد ۱۰ عدد از هر جنس از مگس‌های نسل اول هر گروه برای پرورش نسل‌های دوم به محیط کشت استاندارد انتقال یافته و پس از تخم‌گذاری مگس‌ها، والدها از محیط کشت حذف شدند (۲۵). مگس‌های نسل دوم در طی روزهای اول تا سوم پس از خروج از شفیره، به تفکیک جنس به ظرف محیط کشت جداگانه‌ای منتقل و تعداد مگس‌های سرکه زنده در هر محیط کشت تا مرگ تمامی آنها در طی روزهای ۱، ۴، ۷، ۱۳، ۱۷، ۲۹، ۳۳، ۳۸، ۴۵، ۵۲، ۵۹، ۶۶، ۷۳، ۸۰، ۸۷ و ۹۴ روز شمارش می‌شدند. نسل‌های سوم و چهارم نیز به همین ترتیب ارزیابی می‌شدند.

**۴-۲. تعیین قدرت باروری مگس‌ها براساس سنجش زادگان در هر نسل:** تعداد کل مگس‌هایی که در پایان چهاردهمین روز در هر نسل، از شفیره خارج می‌شدند، به عنوان تعداد زادگان هر نسل شمارش شدند (۲۶).

**۵-۲. تهیه هموژنای بافت بدن مگس‌ها:** به این منظور تعداد ۳۰ عدد از مگس‌های نسل اول و دوم در هر گروه انتخاب شدند. مگس‌ها توسط سرما کاملاً بیهوش و سر آنها سریع جدا و پیکر آنها برای تهیه هموژنای بافتی مورد استفاده قرار گرفت (۲۷). توده بدنی مگس‌ها در بافر لیز حاوی تریس هیدروکلراید، و تریتون X100 به نسبت ۱ سی سی به ازای هر گرم بافت ریخته و توسط دستگاه هموژنایزر بافتی به مدت ۴۰ ثانیه در مجاورت با یخ سونیکه شد. هموژنای حاصل در ۱۰۰۰ دور/ دقیقه به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ و محلول فوقانی برای سنجش سطح مالون دی‌آلدئید مورد استفاده قرار گرفت. محتوی پروتئین این محلول نیز به روش برادفورد تعیین شد.

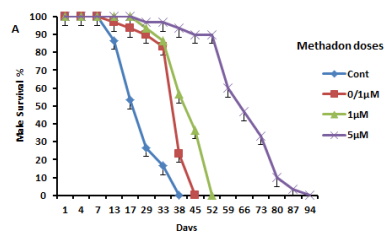
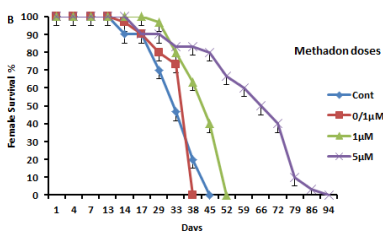
**۶-۲. سنجش میزان مالون دی‌آلدئید:** اندازه‌گیری سطح مالون دی‌آلدئید به کمک کیت (شرکت نوند سلامت. ایران) براساس روش تیوباریتوریک اسید صورت گرفت.

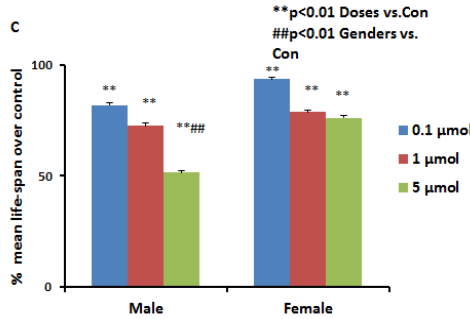
۷-۲. ارزیابی آسیب‌های بافت مغزی: سر مگس‌ها در فرمالین ۱۰ درصد فیکس و برش‌های با ضخامت ۵ میکرون از آن توسط دستگاه کرایوستات تهیه شد (شرکت هیستونونک). برش‌ها به روش هماتوکسیلین-انوزین رنگ‌آمیزی و برای تعیین کیفی بروز تخریب عصبی، تعداد مناطق خالی از سلول در بافت مغزی که قطری بیشتر از ۰/۵ میکرون داشتند، شمارش شدند (۲۸).

۸-۲. روش تجزیه و تحلیل آماری: نرم‌افزار Graphpad prisma 5 برای محاسبات آماری مورد استفاده قرار گرفت. داده‌های طول عمر، توسط آزمون رتبه لگاریتمی (Log rank) ارزیابی شدند (۲۹). مقایسه طول عمر مگس‌ها توسط ANOVA انجام شد (۳۰). اختلاف بین گروه‌ها با  $p < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد. بقای مگس با استفاده از رویکرد کاپلان-مایر محاسبه شد و برای تفاوت‌های معنی‌دار با استفاده از آزمون log-rank تجزیه و تحلیل شد. همبستگی با ضریب همبستگی پیرسون ارزیابی شد. مقایسه چندگانه همه متغیرها با استفاده از تحلیل اثرات مختلط انجام گرفت.

### ۳. یافته‌ها

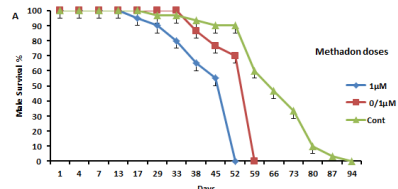
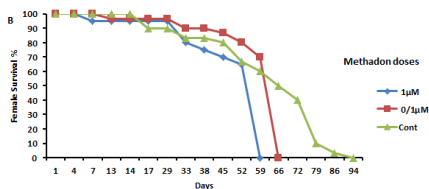
یافته‌ها نشان داد که در نسل اول، حداکثر طول عمر مگس‌های نر و ماده در محیط استاندارد، یکسان و ۵۲ روز است، اما در نسل‌های بعدی این طول عمر متفاوت می‌گردد. مگس‌های مصرف‌کننده متادون در دوز ۱۰۰ و ۱۰ میکرومول در هر دو جنس مردند. مصرف محیط کشت حاوی دوزهای ۰/۵، ۱ و ۵ میکرومول متادون توسط مگس‌های نر سبب کاهش درصد متوسط طول عمر به ترتیب: ۱/۱۸، ۳/۲۷ و ۵/۴۸ و در مگس‌های ماده به ترتیب ۴/۶، ۳/۲۱ و ۹/۲۳ در مقایسه با مگس‌های دریافت‌کننده محیط کشت استاندارد شد. کاهش در تعداد مگس‌های نر در محیط کشت حاوی دوزهای ۰/۵، ۱ و ۵ میکرومول متادون، به ترتیب از روزهای ۷، ۷ و ۱۷، و برای مگس ماده به ترتیب از روزهای ۱۳، ۱۳ و ۲۹ شروع شد. بدین ترتیب، شدت و شروع اثرات مصرف متادون بر کاهش تعداد مگس‌های زنده با دوز متادون، جنس مگس‌ها و مدت زمان مصرف آنها در نسل اول رابطه مستقیم نشان داد.

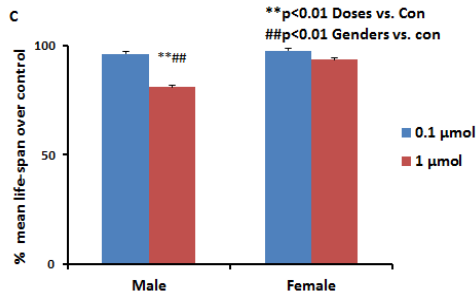




شکل ۱- منحنی‌های بقاء برای مگس‌های سرکه نر و ماده (A و B) و مقایسه نسبت درصد طول عمر مگس‌های دریافت‌کننده متادون (۰/۱، ۱ و ۵ میکرومول) به گروه محیط کشت استاندارد برای جنس نر و ماده <sup>##</sup> داده‌ها توسط آنالیز واریانس دوطرفه و همبستگی داده‌ها توسط آزمون پیرسون بررسی شد. هر نقطه نشان‌دهنده میانگین تعداد مگس‌ها  $\pm$  SEM است.

مگس‌های نسل اولی که دوز ۵ میکرومول متادون را دریافت کرده بودند، هیچ تخم‌گذاری انجام ندادند. بدین ترتیب ارزیابی طول عمر این مگس‌ها در نسل‌های دوم به بعد مقدور نشد. اما، شکل (۲ A و B) منحنی بقای مگس‌های نر و ماده و شکل (۲ C) متوسط درصد مگس‌های سرکه نسل دومی که والدین آنها در نسل اول دوزهای ۱ و ۰/۱ میکرومولار متادون را دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه غذای استاندارد نشان می‌دهد. کاهش تعداد مگس‌های نر برای دوز ۰/۱ میکرومولار از روز ۲۹ و برای دوز ۱ میکرومولار از روز ۱۵ آغاز شد. متوسط درصد کاهش مگس‌های نر متولد شده از والدین دریافت‌کننده دوز ۰/۱ میکرومول، معنی‌دار نبود، ولی دوز ۱ میکرومول از متادون سبب کاهش ۱۹ درصدی در مقایسه با گروه کنترل شد. فرزندان ماده نسل دوم متولد شده از والدین مصرف‌کننده دوز ۰/۱ و ۱ میکرومول متادون، کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نشان ندادند. بقای مگس با استفاده از رویکرد کاپلان-مایر محاسبه شد و برای مشخص کردن تفاوت‌های معنی‌دار با استفاده از آزمون log-rank تجزیه و تحلیل انجام شد. همبستگی با ضریب همبستگی پیرسون نیز ارزیابی گردید. مقایسه چندگانه همه متغیرها با استفاده از تحلیل اثرات مختلط هم انجام شد.



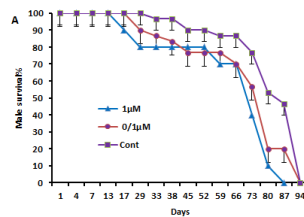
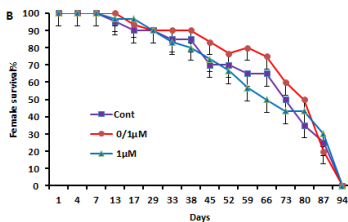


شکل ۲- منحنی بقای (A و B) و میانگین طول عمر (C) مگس‌های سرکه نر و ماده در نسل دوم که والدین آنها در نسل اول دوزهای (۰/۱، ۱ میکرومول) متادون را دریافت کرده‌اند، در مقایسه با گروه کنترل <sup>\*\*</sup>بقای مگس با استفاده از رویکرد کاپلان-مایر محاسبه شد و برای تفاوت‌های معنی‌دار با استفاده از آزمون log-rank تجزیه و تحلیل شد. همبستگی با ضریب همبستگی پیرسون نیز ارزیابی گردید. مقایسه چندگانه همه متغیرها با استفاده از تحلیل اثرات مختلط انجام شد.

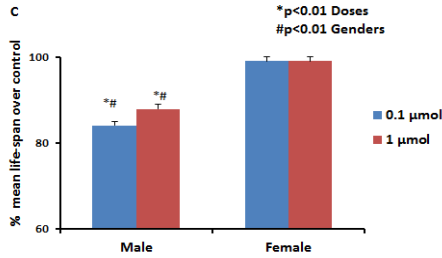
منحنی بقاء و متوسط درصد طول عمر مگس‌های سرکه نسل سوم در مقایسه با گروه کنترل آنها به ترتیب در شکل‌های (A۳ تا C) آمده است.

کاهش تعداد در مگس‌های نر برای دوز ۰/۱ از روز ۲۹ و برای دوز ۱ میکرومول از روز ۲۱ آغاز شد. اما برای مگس‌های ماده این کاهش از روز ۱۸ برای همین دوزها آغاز شد. برای مگس‌های جنس ماده دریافت‌کننده متادون ۰/۱ میکرومول از روز ۱۷ و برای دوز ۱ میکرومول نیز از روز ۱۷ آغاز شد. البته این روند کاهشی در گروه کنترل از روز ۳۳ آغاز شد.

بررسی شکل (۳C) مشخص می‌کند که فقط متوسط طول عمر مگس‌های نر دریافت‌کننده دوز ۱ میکرومول متادون در مقایسه با گروه کنترل نسل سوم کاهش نشان می‌دهد و این نسبت در مگس‌های ماده با کنترل هم‌نسل خودشان تفاوت معنی‌دار ندارند. بقای مگس با استفاده از رویکرد کاپلان-مایر محاسبه شد و برای تفاوت‌های معنی‌دار با استفاده از آزمون log-rank تجزیه و تحلیل انجام شد. همبستگی با ضریب همبستگی پیرسون ارزیابی گردید. مقایسه چندگانه همه متغیرها با استفاده از تحلیل اثرات مختلط انجام شد.

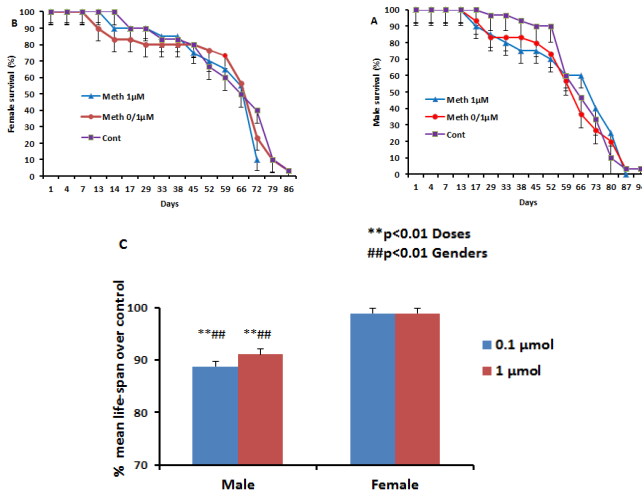






شکل ۳- منحنی بقای مگس‌های (A و B) و میانگین درصد طول عمر (C) سرکه نر و ماده نسبت به گروه کنترل نسل سوم که والدین آنها با محیط کشت پایه و حاوی متادون (۱/۰، ۱ میکرومول) در نسل اول تغذیه شده‌اند. <sup>o</sup>بقای مگس با استفاده از رویکرد کاپلان-مایر محاسبه شد و تفاوت‌های معنی‌دار با استفاده از آزمون log-rank تجزیه و تحلیل شد. همبستگی با ضریب همبستگی پیرسون نیز ارزیابی گردید. مقایسه چندگانه همه متغیرها با استفاده از تحلیل اثرات مختلط انجام شد.

در ادامه منحنی بقاء و درصد متوسط طول عمر نسل چهارم مگس‌ها که والدین آنها در نسل اول متادون دریافت کرده بودند، در شکل (۴ A تا C) نشان داده شده است. این داده‌ها مشخص می‌کنند که روند کاهش تعداد مگس‌های نر دریافت‌کننده هر دو دوز ۰/۱ و ۱ میکرومول، از روز ۱۴ شروع می‌شود. در مگس‌های ماده، روند کاهش برای دوز ۰/۱ از روز ۱۳ و برای دوز ۱ میکرومول از روز ۱۴ در این نسل آغاز شد. همچنین متوسط درصد کاهش طول عمر مگس‌ها در این نسل فقط برای مگس‌های نر دریافت‌کننده دوزهای ۰/۱ و ۱ میکرومول از متادون به ترتیب ۱۱/۲ و ۸/۹ کاهش را در مقایسه با گروه کنترل هم‌نسل نشان داد.



شکل ۴- منحنی بقای و میانگین درصد طول عمر مگس‌ها در نسل چهارم مگس‌هایی که والدین آنها غلظت‌های ۰/۱، و ۱ میکرومول از متادون را در نسل اول دریافت کرده بودند.

\*\*بقای مگس با استفاده از رویکرد کاپلان-مایر محاسبه شد و تفاوت‌های معنی‌دار با استفاده از آزمون log-rank تجزیه و تحلیل گردید. همبستگی نیز با ضریب همبستگی پیرسون ارزیابی شد. مقایسه چندگانه همه متغیرها با استفاده از تحلیل اثرات مختلط انجام شد. تعداد زاده‌ها در نسل اول و دوم در گروه‌های مصرف‌کننده متادون ۱ و ۱/۰ میکرومولار/لیتر نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) نشان داد (جدول ۲). این اثر کاهشی بر تعداد زادگان در نسل سوم و چهارم، در مقایسه با گروه کنترل هم‌نسل دیده نمی‌شود. اما مترونیدازول فقط در دوز ۲ میلی‌گرم/کیلوگرم، بر تعداد زادگان اثر کاهشی داشت.

جدول ۲- نتایج شمارش تعداد مگس‌های حاصل از گروه‌های دریافت‌کننده ۰،۱ و ۱ میکرومول متادون در مقایسه با مترونیدازول (۱ و ۲ میلی‌گرم/لیتر) تا چهار نسل

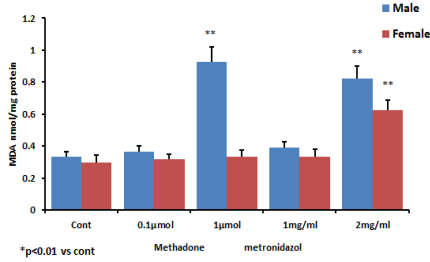
نسل‌ها	کنترل	متادون ۰،۱ میکرومول/لیتر	متادون ۱ میکرومول/لیتر	مترونیدازول ۱ میلی‌گرم/لیتر	مترونیدازول ۲ میلی‌گرم/لیتر
والدین	10	10	10	10	10
نسل اول	80.6 ± 6	52 ± 5**	50 ± 5**	82 ± 7	42 ± 3**
نسل دوم	150 ± 8**	123 ± 9**	60 ± 7**	-	-
نسل سوم	175 ± 11	179 ± 11	179 ± 10**	-	-
نسل چهارم	163 ± 12	153 ± 14	154 ± 14	-	-

\*\*تفاوت معنی‌دار بین نسل‌ها با نسل بعدی در همان گروه  $P < 0.01$

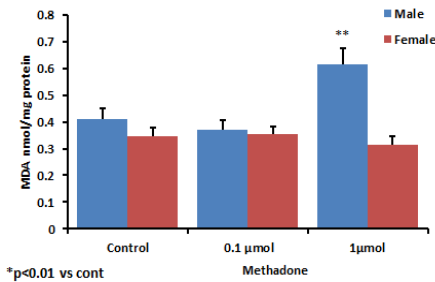
تغییر در سطح محصول پراکسیداسیون لیپیدی، مالون دی‌آلدئید (MDA) در هموژنای کل بدن مگس‌های سرکه در شکل (۵) نشان داده شده است.

در نسل اول، مصرف دوز ۱/۰ میکرومول/لیتر متادون در هر دو جنس بر سطح MDA تأثیری نداشت، ولی دوز ۱ میکرومول/لیتر تنها در مگس‌های سرکه نر باعث افزایش معنی‌دار ( $p < 0.01$ ) در مقایسه با گروه کنترل گردید.

مترونیدازول به عنوان کنترل مثبت، در دوز ۲ میلی‌گرم/لیتر سبب افزایش معنی‌دار سطح MDA در هر دو جنس نر و ماده در مقایسه با کنترل هم‌جنس شد. در نسل دوم، سطح MDA مگس‌های سرکه فقط در گروه دریافت‌کننده متادون ۱ میلی‌مول در نسل اول، در مقایسه با گروه کنترل هم‌جنس به طور معنی‌داری بالاتر بود شکل (۶).

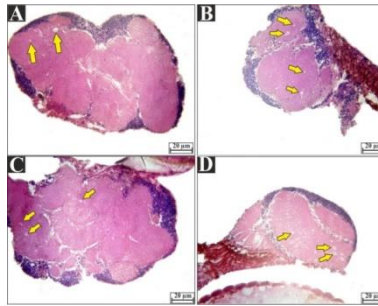


شکل ۵- تغییرات سطح مالون دی آلدئید بدن مگس‌های سرکه نر و ماده در نسل اول که در محیط‌های کشت حاوی متادون، مترونیدازول و کنترل پرورش یافته‌اند. <sup>\*\*</sup> داده‌ها توسط آنالیز واریانس بررسی و  $P < 0.01$  نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل همجنس است. برای مقایسه سطوح MDA در گروه‌های مختلف از آزمون‌های ANOVA یک‌طرفه و تعقیبی دانت (Dunnett's multiple comparison test) استفاده شد.

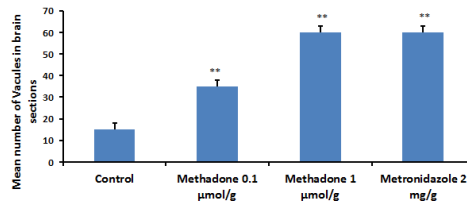


شکل ۶- تغییرات سطح مالون دی آلدئید بدن مگس‌های سرکه نر و ماده در نسل دوم که در محیط کشت حاوی متادون و کنترل پرورش یافته‌اند. <sup>\*\*</sup> داده‌ها توسط آنالیز واریانس دوطرفه بررسی و  $P < 0.01$  نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل همجنس است. برای مقایسه سطوح MDA در گروه‌های مختلف از آزمون‌های ANOVA یک‌طرفه و تعقیبی دانت (Dunnett's multiple comparison test) استفاده شد.

بررسی آسیب وارده به بافت مغز در گروه‌های مختلف در شکل (۷) نشان داده شده است. در این تصاویر، افزایش واکوئیلیسیون به دلیل مرگ و حذف نورون‌های مغز مگس‌های پرورش یافته در محیط‌های کشت گروه کنترل (A) در مقایسه با گروه دریافت‌کننده دوزهای (۱ میکرومول) متادون (B) و مترونیدازول (۱ و ۲ میلی‌گرم/لیتر) (C, D) ارائه شده است. سنجش تعداد کل مناطق بدون سلول و روشن که بزرگ‌تر از ۵ میکرومتر قطر دارند، در قشر مگس‌های گروه درمان شده با متادون و مترونیدازول بیشتر از گروه کنترل است (شکل ۸).



شکل ۷- تصاویر میکروسکوپ نوری از برش مغز مگس‌های سرکه رنگ‌آمیزی شده به روش هماتوکسیلین - ائوزین از گروه درمان با متادون، مترونیدازول و محیط‌کشت پایه (در تصویر فلش‌ها به مکان‌های فاقد سلول‌های عصبی اشاره می‌کنند)



شکل ۸- تعداد حفره‌های شمارش شده در برش‌های بافت مغز مگس‌های سرکه در گروه‌های مختلف (داده‌ها توسط آنالیز واریانس و آزمون متعاقب سنجیده شده‌اند. سطح معنی‌داری بین گروه‌ها  $P < 0.01$  محاسبه شده است)

#### ۴. بحث

براساس تحقیقات انجام شده، مصرف دوزهای بالای متادون باعث مرگ معتادان می‌شود (۳۱). در عین حال، یافته‌های پژوهش حاضر نیز نشان داد که مصرف دوزهای ۱۰ و ۱۰۰ میکرومول از متادون سبب مرگ مگس‌ها می‌شود. تجویز دوزهای کمتر نیز سبب تسریع روند پیری در مگس‌ها شد. بروز نقص‌های فیزیولوژیک خاص و بروز اختلالات عملکردی در چندین ارگان بدن به عنوان دلایل مرگ مصرف‌کنندگان دوزهای بالای متادون عنوان شده است (۳۲). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که مصرف دوزهای ۱ و ۱/۰ میکرومول از متادون در نسل اول، منجر به کاهش طول عمر مگس‌های نر نسل بعدی، در مقایسه با گروه کنترل هم‌نسل می‌شود. دانشمندان متعددی به مطالعه تفاوت‌های وابسته به جنس در طول عمر انسان پرداخته و متذکر شده‌اند که مقاومت جنس ماده در مقابل عوامل کاهش‌دهنده طول عمر، بیشتر از جنس نر است (۳۳، ۳۴). دلیل این کاهش طول عمر می‌تواند بدلیل اثرات متابولیسمی نامطلوب این دارو باشد (۳۵). مطالعات دیگری هم در تأیید یافته‌های حاضر، به عدم درمان نگهدارنده مادام‌العمر یا طولانی مدت معتادان با متادون به دلیل

افزایش خطر مرگ معتادان اشاره کرده‌اند (۳۶). نتایج یک مطالعه اثر متادون بر روی سلول‌های رده سلولی هیبریدی نوروبلاستوما/گلیوما NG108-15 را نشان داد که متادون از طریق کاهش تعداد میتوکندری‌ها، سبب کاهش طول عمر و مرگ سلول‌های عصبی می‌شود (۳۷). شواهدی در دست است که آگونیست‌های اپیوئیدی و از جمله متادون می‌تواند با اثر بر مسیرهای متابولیک اساسی و مسیرهای پیام‌رسان سلولی، طول عمر را تنظیم کند (۳۸). یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که مصرف متادون سبب کاهش زادگان در نسل اول و دوم می‌شود. به علاوه، سطح مالون دی آلدنید در توده بدنی مگس‌ها در نسل‌های اول و دوم، بدن‌بال دریافت متادون افزایش می‌یابد. در تایید یافته‌های پژوهش حاضر، مصرف متادون در بیماران وابسته به مواد مخدر منجر به افزایش سطح محصول پراکسیداسیون چربی‌ها، و مالون دی آلدنید، در آنها شده است (۳۹).

مالون دی آلدنید به عنوان یک سم، باعث از کار افتادن میتوکندری‌ها می‌شود (۴۰). به علاوه، یافته‌های پژوهش حاضر گویای تفاوت در سطح مالون دی آلدنید مگس‌های سرکه نر و ماده شده که این امر توجه‌کننده تفاوت اثرات وابسته به جنس متادون بر طول عمر مگس‌ها است. پژوهشگران متعددی مشابه با مطالعه حاضر، به نقش مالون دی آلدنید در فرایند پیری اشاره کرده‌اند (۴۱). مدت‌ها است که مدارک متعددی در مورد نقش مالون دی آلدنید در القای فرایند پیری و ناباروری ارائه شده‌اند (۴۲، ۴۳). این فرضیه پیری را نتیجه آسیب ناشی از اثر رادیکال‌های آزاد بر پروتئین‌ها به عنوان درشت‌مکول‌های ساختار سلولی و عدم توانایی در متعادل کردن این تغییرات، توسط سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی درون‌زا بدن عنوان کرده‌اند. افزوده شدن غیر آنزیمی مالون دی آلدنید به گروه‌های آمینی پروتئین‌ها منجر به تشکیل مالون دی آلدنید - لیزین می‌شود و تجمع این ترکیب در بافت‌ها نشانگر میزان پیری است (۴۴). هم‌راستا با یافته‌های پژوهش حاضر مشخص شده است که حساسیت جنس نر مگس سرکه به عوامل استرس اکسیداتیو، بیشتر از جنس ماده است (۴۵). روند تخریب عصبی با سطح مالون دی آلدنید محیطی همبستگی را نشان داده است (۴۵). همچنین روند پیری در مدل‌های مختلف پژوهشی با انحطاط پیش‌رونده سیستم عصبی همراه است (۴۶). مصرف متادون توانسته سبب آسیب به ماده خاکستری در مغز معتادان شود (۴۷). مشابه با نتایج مطالعه حاضر، در مگس‌های سرکه نیز مصرف متادون باعث بروز آسیب در بافت مغزی، هم‌زمان با تسریع پیری و تشدید تولید مثل در مگس سرکه شده است. پژوهشگران در توجیه این ارتباط، آسیب‌های ناشی از پراکسیداسیون لپیدی با پیری و تولید مثل در مگس سرکه را مشابه با پستانداران دانسته و آن را وابسته به تجمع این عوامل در بدن گزارش کرده‌اند (۴۸). در این ارتباط افزایش مالون دی آلدنید در ساختار تخمدان‌ها به عنوان یک

مکانیسم افزایش دهنده تخمک‌گذاری مطرح شده است (۴۹). رابطه مستقیمی نیز بین سطح مالون‌دی‌آلدئید در بدن و طول عمر گزارش شده است؛ گرچه مکانیسم دقیق آن کشف نشده باقیمانده است (۵۰). در ادامه یافته‌های پژوهش حاضر، انتقال بین نسلی، اثر متادون بر طول عمر و تولیدمثل مگس‌های سرکه را مشخص کرد. مشابه با مشاهدات تحقیق حاضر، مصرف خوراکی ماده مخدر لایزرژیک اسید دی اتیل آمید به عنوان یک داروی دارای برهمکنش با متادون (۵۱)، می‌تواند بر بیان رنگدانه چشم مگس‌های سرکه اثرگذار باشد و اثرات آن به نسل بعدی نیز منتقل شوند (۵۱، ۵۲). این پژوهش اثر کاهشی متادون بر تعداد مگس‌ها در نسل اول و ادامه این اثرات حتی پس از حذف متادون تا چهار نسل بعدی را نشان داد. مصرف متادون سبب کاهش فاکتورهای تولید مثلی در مردان شده است (۵۳). همچنین امکان احتمال انتقال اختلالات تولیدمثلی به صورت اپی ژنتیکی نیز تایید شده است (۵۴). نتایج این پژوهش تایید می‌کند که تغییرات ناشی از متادون بر کاهش تولیدمثل مگس‌ها می‌تواند به نسل‌های بعدی هم منتقل شود. استفاده از متادون باعث کاهش یکپارچگی ماده سفید مغز در ناحیه پشتی جسم پینه‌ای، تراکم فیبرها، قطر آکسون‌ها و میزان میلینی شدن آکسون‌ها در ماده سفید انسان می‌شود (۵۵). آسیب به سیستم عصبی توسط اپیوئیدها می‌تواند بر عملکردهای تولیدمثلی تاثیر بگذارد (۵۶). مترونیدازول یک ترکیب اکسیدان قوی، دارای خاصیت سمیت سلولی، و اثرات منفی بر تولیدمثل است و تشابه اثرات متادون با مترونیدازول تاییدکننده نظریه پژوهش حاضر دال‌بر میانجی‌گری فرایندهای پراکسیداسیون چربی‌ها در کاهش طول عمر و تشدید قدرت تولیدمثلی مگس‌های سرکه است.

## ۵. نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهند که مصرف متادون در دوران تولیدمثلی و در یک نسل می‌تواند منجر به کوتاه شدن طول عمر به صورت وابسته به جنس، تضعیف باروری، و آسیب‌های مغزی شده و این اثرات تا دو نسل در مگس‌های سرکه از طریق القای فرایند پراکسیداسیون چربی‌ها در بدن انتقال یابد. با این حال، هنوز این سوال که نقش میانجی دیگر و سیستم‌های عصبی تحت تاثیر متادون چیست؟ نامشخص است که نیاز به مطالعه بیشتر دارند.

## ۶. تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد زهرا رستمی، در رشته زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم پایه دانشگاه شاهد است. از خانم سارا خبازان کارشناس آزمایشگاه، برای همکاری در ارائه امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی جهت انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

## References

1. Bachi K, Sierra S, Volkow ND, Goldstein RZ & Alia-Klein N. Is biological aging accelerated in drug addiction? *Current opinion in behavioral sciences*. 2017; 13: 34–39.
2. Hulse GK, Milne E, English DR & Holman CD. The relationship between maternal use of heroin and methadone and infant birth weight. *Addiction*. 1997; 92: 1571-9.
3. Neppl TK, Diggs ON & Cleveland MJ. The intergenerational transmission of harsh parenting, substance use, and emotional distress: Impact on the third-generation child. *Psychology of addictive behaviors: Journal of the Society of Psychologists in Addictive Behaviors*. 2020; 34: 852-863.
4. Sohal RS, Mockett RJ & Orr WC. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free radical biology & medicine*. 2002; 33: 575-586.
5. Ajayi AF & Akhigbe RE. Codeine-induced sperm DNA damage is mediated predominantly by oxidative stress rather than apoptosis. *Redox Rep*. 2020; 25(1): 33-40.
6. Guan Q, Velho RV, Sehouli J & Mechsner S. Endometriosis and opioid receptors: Are opioids a possible/promising treatment for endometriosis? *Int J Mol Sci*. 2023; 24(2): 1633.
7. Kovacs GG, Horvath MC, Majtenyi K, Lutz MI, Hurd YL & Keller E. Heroin abuse exaggerates age-related deposition of hyperphosphorylated tau and p62-positive inclusions. *Neurobiol Aging*. 2015; 36(11): 3100-3107.
8. Gil P, Fariñas F, Casado A & López-Fernández E. Malondialdehyde: a possible marker of ageing. *Gerontology*. 2002; 48(4): 209-14.
9. Rao KS & Loeb LA. DNA damage and repair in brain: relationship to aging. *Mutat Res*. 1992; 275(3-6): 317-29.
10. Khazae-Pool M, Moeeni M, Ponnet K, Fallahi A, Jahangiri L & Pashaei T. Perceived barriers to methadone maintenance treatment among Iranian opioid users. *Int J Equity Health*. 2018; 17(1): 75.
11. Arezoomandan M, Zhiani R, Mehrzad J, Motavalizadehkakhky A, Eshrati S & Arezoomandan R. Inflammatory, oxidative stress and cognitive functions in patients under maintenance treatment with methadone or buprenorphine and healthy subjects. *J Clin Neurosci*. 2022; 101: 57-62.
12. Rahimi Mehdi Abad F, Khalili P, Jalali F, Pirsadeghi A, Esmaeili Nadimi A, Manshoori A & et al. Maternal opioid use is reflected on leukocyte telomere length of male newborns. *PLoS One*. 2021; 16(12): e0261013.
13. Bashore RA, Ketchum JS, Staisch KJ, Barrett CT & Zimmermann EG. Heroin addiction and pregnancy. *West J Med*. 1981; 134(6): 506-514.
14. Farid WO, Dunlop SA, Tait RJ & Hulse GK. The effects of maternally administered methadone, buprenorphine and naltrexone on offspring: review of human and animal data. *Curr Neuropharmacol*. 2008; 6(2): 125-50.
15. Jansson LM, Dipietro J & Elko A. Fetal response to maternal methadone administration. *Am J Obstet Gynecol*. 2005; 193(3 Pt 1): 611-7.

16. Prosser J, Cohen LJ, Steinfeld M, Eisenberg D, London ED & Galynker II. Neuropsychological functioning in opiate-dependent subjects receiving and following methadone maintenance treatment. *Drug Alcohol Depend.* 2006; 84(3): 240-7.
17. Santoro C, Hall LM & Zukin RS. Characterization of two classes of opioid binding sites in *Drosophila melanogaster* head membranes. *J Neurochem.* 1990; 54(1): 164-70.
18. Birgül N, Weise C, Kreienkamp HJ & Richter D. Reverse physiology in *Drosophila*: identification of a novel allatostatin-like neuropeptide and its cognate receptor structurally related to the mammalian somatostatin/galanin/opioid receptor family. *EMBO J.* 1999; 18(21): 5892-900.
19. Obata F, Fons CO & Gould AP. Early-life exposure to low-dose oxidants can increase longevity via microbiome remodelling in *Drosophila*. *Nat Commun.* 2018; 9(1): 975.
20. Wu W, Yao H, Dwivedi I, Negraes PD, Zhao HW, Wang J, Trujillo CA, Muotri AR & Haddad GG. Methadone Suppresses Neuronal Function and Maturation in Human Cortical Organoids. *Front Neurosci.* 2020; 14: 593248.
21. Tekieh E, Kazemi M, Dehghani L, Bahramyian S, Sadogi M, Zardooz H & et al. Effects of Oral Morphine on the Larvae, Pupae and Imago Development in *Drosophila Melanogaster*. *Cell Journal(Yakhteh)*, 2011; 13: 149-154.
22. Cammaerts MC, Cammaerts R & Rachidi Z. Effects of buprenorphine and methadone, two analgesics used for suppressing humans' addiction to morphine; a study using ants as biological models. *Int j pharm Sci. Invent.* 2015; 4: 1-19.
23. Siddique YH, Naz F & Jyoti S. Effect of curcumin on lifespan, activity pattern, oxidative stress, and apoptosis in the brains of transgenic *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 606928.
24. Mossman JA, Mabeza RMS, Blake E, Mehta N & Rand DM. Age of Both Parents Influences Reproduction and Egg Dumping Behavior in *Drosophila melanogaster*. *J Hered.* 2019; 110(3): 300-309.
25. Murashov AK, Pak ES, Mar J, O'Brien K, Fisher-Wellman K & Bhat KM. Paternal Western diet causes transgenerational increase in food consumption in *Drosophila* with parallel alterations in the offspring brain proteome and microRNAs. *FASEB J.* 2023; 37(6): e22966.
26. Chandrashekara KT, Popli S & Shakarad MN. Curcumin enhances parental reproductive lifespan and progeny viability in *Drosophila melanogaster*. *Age (Dordr).* 2014; 36(5): 9702.
27. Trindade de Paula M, Poetini Silva MR, Machado Araujo S, Cardoso Bortolotto V, Barreto Meichtry L, Zemolin AP & et al. High-Fat Diet Induces Oxidative Stress and MPK2 and HSP83 Gene Expression in *Drosophila melanogaster*. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 4018157.
28. Kang J, Shin S, Perrimon N & Shen J. An Evolutionarily Conserved Role of Presenilin in Neuronal Protection in the Aging *Drosophila* Brain. *Genetics.* 2017; 206(3): 1479-1493.
29. Nash TR, Chow ES, Law AD, Fu SD, Fuszara E, Bilaska A & et al. Daily blue-light exposure shortens lifespan and causes brain neurodegeneration in *Drosophila*. *NPJ Aging Mech Dis.* 2019; 5: 8.
30. Ma L, Ma J & Xu K. Effect of spaceflight on the circadian rhythm, lifespan and gene



- expression of *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*. 2015; 10(3): e0121600.
31. Drummer OH, Opeskin K, Syrjanen M & Cordner SM. Methadone toxicity causing death in ten subjects starting on a methadone maintenance program. *Am J Forensic Med Pathol*. 1992; 13(4): 346-50.
  32. Reece AS. Differing age related trajectories of dysfunction in several organ systems in opiate dependence. *Aging Clin Exp Res*. 2012; 24(1): 85-96.
  33. Zarulli V, Barthold Jones JA, Oksuzyan A, Lindahl-Jacobsen R, Christensen K & Vaupel JW. Women live longer than men even during severe famines and epidemics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018; 115(4): E832-E840.
  34. Foo JC, Skorodumov I, Spanagel R & Meinhardt MW. Sex- and age-specific effects on the development of addiction and compulsive-like drinking in rats. *Biol Sex Differ*. 2023; 14(1): 44.
  35. Tahergorabi Z, Rahmani H, Williams J & Moodi M. The effect of methadone on blood glucose, lipids and glucose-modulating hormones in methadone-dependent Wistar rats. *Toxicol Res*. 2019; 36(3): 221-226.
  36. McCance-Katz EF, Sullivan LE & Nallani S. Drug interactions of clinical importance among the opioids, methadone and buprenorphine, and other frequently prescribed medications: a review. *Am J Addict*. 2010; 19(1): 4-16.
  37. Nylander E, Zellerroth S, Nyberg F, Grönbladh A & Hallberg M. The effects of morphine, methadone, and fentanyl on mitochondria: A live cell imaging study. *Brain Res Bull*. 2021; 171: 126-134.
  38. Mazahery C, Valadkhan S & Levine AD. Transcriptomic Analysis Reveals Receptor Subclass-Specific Immune Regulation of CD8+ T Cells by Opioids. *Immunohorizons*. 2020; 4(7): 420-429.
  39. Salarian A, Kakhodaee M, Zahmatkesh M, Seifi B, Bakhshi E, Akhondzadeh S, Adeli S, Askari H & Arbabi M. Opioid Use Disorder Induces Oxidative Stress and Inflammation: The Attenuating Effect of Methadone Maintenance Treatment. *Iran J Psychiatry*. 2018; 13(1): 46-54.
  40. Long J, Wang X, Gao H, Liu Z, Liu C, Miao M & et al. Malonaldehyde acts as a mitochondrial toxin: Inhibitory effects on respiratory function and enzyme activities in isolated rat liver mitochondria. *Life Sci*. 2006; 79(15): 1466-72.
  41. Pinchuk I, Weber D, Kochlik B, Stuetz W, Toussaint O, Debacq-Chainiaux F & et al. Gender- and age-dependencies of oxidative stress, as detected based on the steady state concentrations of different biomarkers in the MARK-AGE study. *Redox Biol*. 2019; 24: 101204.
  42. Mutlu-Türkoğlu U, İlhan E, Öztezcan S, Kuru A, Aykaç-Toker G & Uysal M. Age-related increases in plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in elderly subjects. *Clin Biochem*. 2003; 36(5): 397-400.
  43. Das P, Choudhari AR, Singh AK & Singh R. Correlation among routine semen parameters, sperm viability and malondialdehyde levels in human subjects with different fertility potential. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2009; 53(3): 253-8.

44. Jové M, Mota-Martorell N, Pradas I, Martín-Gari M, Ayala V & Pamplona R. The Advanced Lipoxidation End-Product Malondialdehyde-Lysine in Aging and Longevity. *Antioxidants (Basel)*. 2020; 9(11): 1132.
45. Okada K, Blount JD, Sharma MD, Snook RR & Hosken DJ. Male attractiveness, fertility and susceptibility to oxidative stress are influenced by inbreeding in *Drosophila simulans*. *J Evol Biol*. 2011; 24(2): 363-71.
46. Omelyanchuk LV, Shaposhnikov MV & Moskalev AA. *Drosophila* nervous system as a target of aging and anti-aging interventions. *Front Genet*. 2015; 6: 89.
47. Zhu J, Wang S, Liu Y, Wang F, Li Q, Li Z, Sun Y, Li W & Wang W. The influence of methadone on cerebral gray matter and functional connectivity. *Ann Palliat Med*. 2021; 10(9): 9497-9507.
48. Zheng J, Mutcherson R & Helfand SL. Calorie restriction delays lipid oxidative damage in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell*. 2005; 4(4): 209-16.
49. Yalçinkaya E, Cakiroğlu Y, Doğer E, Budak O, Cekmen M & Çalışkan E. Effect of follicular fluid NO, MDA and GSH levels on in vitro fertilization outcomes. *J Turk Ger Gynecol Assoc*. 2013; 14(3): 136-41.
50. Ayala A, Muñoz MF & Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014: 360438.
51. Ruffing DM & Domino EF. Effects of selected opioid agonists and antagonists on DMT- and LSD-25-induced disruption of food-rewarded bar pressing behavior in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 1981; 75(3): 226-230.
52. Hoyer-Fender S. Transgenerational effect of drug-mediated inhibition of LSD1 on eye pigment expression in *Drosophila*. *BMC Ecol*. 2020; 20(1): 62.
53. Moinaddini F, Amirinejad M, Haghpanah T, Abedini M, Yoosefi F & Nematollahi-Mahani SN. Opioid replacement therapy with methadone or buprenorphine effects on male mice reproduction. *Psychopharmacology (Berl)*. 2023; 240(1): 77-86.  
**DOI:** 10.1007/s00213-022-06274-7
54. Tahmasbpour Marzouni E, Ilkhani H, Beigi Harchegani A, Shafaghatian H, Layali I & et al. Epigenetic Modifications, A New Approach to Male Infertility Etiology: A Review. *Int J Fertil Steril*. 2022; 16(1): 1-9.
55. Wang Y, Li W, Li Q, Yang W, Zhu J & Wang W. White matter impairment in heroin addicts undergoing methadone maintenance treatment and prolonged abstinence: a preliminary DTI study. *Neurosci Lett*. 2011; 494(1): 49-53.
56. Subirán N, Casis L & Irazusta J. Regulation of male fertility by the opioid system. *Mol Med*. 2011; 17(7-8): 846-53.