Physiology and Pharmacology, 14 (2), 181 -190
Summer 2010 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Reduction of cell size in amygdaloid complex of the Wistar rat embryos after oral morphine consumption

Mina Ramazani[1], Haleh Ameli[2], Vahid Hakimi Gilani[2], Hossein Bahadoran[3], Hedayat Sahraei[4*]

1. Dept. Biology, School of Science, Islamic AZAD University, Ashtian Branch,Ashtian, Iran
2. Dept. Biology, School of Science, Payame-Noor University,Tehran, Iran
3. Dept. Anatomy, Faculty of Medicine and Behavioral Sciences Research Center, Baqiyatallah (a.s.) University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Dept. Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine and Applied Neuroscience Research Center, Baqiyatallah (a.s.) University of Medical Sciences,Tehran, Iran

Received: 11 Jan 2010 **Accepted: 1 May 2010**

Abstract

Introduction: In the present study, the effects of oral morphine consumption in pregnant female rats on the amygdaloid complex development in the embryos were investigated.

Methods: Female Wistar rats weighing 250-300 g (n=15) were divided into control (n = 8) and experimental groups (n = 7). The experimental group received morphine (0.05 mg/ml) in their tap water. On the 19th day of pregnancy, the animals were killed by chloroform overdose and their embryos were surgically taken out (57 control and 49 experimental embryos). Corticosterone concentration in plasma was determined by an ELISA method. The embryos were fixed in formalin 10% for 90 days, then their length and weight were determined and tissue processing, sectioning and Hematoxylin and Eosin (H&E) staining were preformed. The cases (200 each) were evaluated and analyzed by light microscope and MOTIC software.

Results: Our data showed that the length and weight of the embryos were not different among control and experimental groups. On the other hand, morphine consumption decreased the length and the area of the amygdaloid complex in the experimental group. In addition, the cell size was reduced in the experimental group, but the cell number was increased. Plasma corticosterone levels in control and experimental groups were not different.

Conclusion: It could be concluded that oral morphine consumption during pregnancy could lead to amygdaloid growth retardation in the embryos of the pregnant rats demonstrated by the reduction in the length and area of the amygdaloid complex and the decrease of the cell size in the experimental group.

Key words: Amygdaloid Complex, Morphine, Corticosterone, Embryo, Rat

*Corresponding author e-mail: h.sahraei@bmsu.ac.ir
Available online at www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۴ (۲)، ۱۸۱ – ۱۹۰
تابستان ۱۳۸۹

فیزیولوژی و فارماکولوژی

کاهش اندازه سلولهای کمپلکس آمیگدال در جنین های موش بزرگ آزمایشگاهی نژاد ویستار پس از تجویز مورفین خوراکی

مینا رمضانی[۱]، هاله عاملی[۲]، وحید حکیمی گیلانی[۲]، حسین بهادران[۳]، هدایت صحرائی[۴*]

۱. گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آشتیان، آشتیان

۲. گروه زیست شناسی دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران

۳. گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، و مرکز تحقیقات علوم رفتاری، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران

۴. گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، و مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران

دریافت: ۲۱ دی ۸۸ پذیرش: ۱۱ اردیبهشت ۸۹

چکیده

مقدمه: در این تحقیق تاثیر مصرف خوراکی مورفین در موشهای باردار را بر تکوین کمپلکس آمیگدال جنین آنها بررسی کردیم.

روش‌ها: موش های ماده (۱۵ سر) بالغ نژاد ویستار (۲۵۰–۳۰۰ گرم) به دو گروه کنترل (۸ سر) و آزمایش (۷ سر) تقسیم شدند. حیوانات گروه آزمایش روزانه مورفین (۰/۰۵ mg/ml) خوراکی دریافت کردند. در روز ۱۹ بارداری، جنینها (۵۷ سر در گروه کنترل، ۴۹ سر در گروه آزمایش) از بدن مادر خارج و در فرمالین ۱۰٪ به مدت ۹۰ روز فیکس شدند. مراحل تثبیت، پردازش بافتی، برش گیری و رنگ آمیزی (به روش هماتوکسیلین–ائوزین) انجام و نمونه ها (در هر گروه ۲۰۰ نمونه) با استفاده از میکروسکوپ نوری و نرم افزار موتیک مورد آنالیز قرار گرفتند. خون مادران (۰/۹ CC) پس از جمع آوری در دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول روئی برای اندازه گیری غلظت کورتیکوسترون پلاسما مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: تحقیق ما نشان داد که قد و وزن جنینهای گروه آزمایش تفاوت معنی داری با گروه کنترل نداشت. تجویز مورفین موجب کاهش ابعاد و مساحت کمپلکس آمیگدال در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل شد. اندازه سلولها در این ناحیه در گروه آزمایش کاهش ولی تعداد آنها افزایش یافته بود.تجویز مورفین سبب افزایش سطح پلاسمائی کورتیکوسترون خون موشهای مادر در گروه آزمایش نشد.

نتیجه‌گیری: تجویز خوراکی مورفین با کاهش رشد کمپلکس آمیگدال در جنین موشهای باردار همراه است که با توجه به اهمیت ویژه آمیگدال در بروز رفتارهای مختلف، ممکن است باعث بروز ناهنجاریهای رفتاری در نسل بعد شود.

واژه‌های کلیدی: کمپلکس آمیگدال، مورفین، کورتیکوسترون، جنین، موش بزرگ آزمایشگاهی

مقدمه

تحقیقات انجام شده کمپلکس آمیگدال را مجموعه غیریکنواختی از هسته هائی معرفی کرده است که در کارهای زیادی مانند تعدیل اعمال عصبی–هورمونی، واکنش های احشائی، و الگوهای پیچیده رفتاری مانند دفاع، تغذیه، عصبانیت، تولید مثل، حافظه و یادگیری نقش دارند [۱–۳]. این تعدیل حداقل با همکاری نواحی دیگری در مغز مانند هیپوتالاموس، ساقه مغز، و نخاع شوکی به انجام می رسد. با

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: h.sahraei@bmsu.ac.ir
وبگاه مجله: ww.phypha.ir/ppj

توجه به اینکه هسته های متعددی در کمپلکس آمیگدال شناسائی شده اند، به نظر می رسد که نوعی تخصصی شدن در هسته های آمیگدال بوجود آمده و هر هسته یا تعدادی از آنها با یکی از اعمال آمیگدال سروکار داشته و مرکز جمع بندی آن به شمار می رود [۳]. با این وصف، هرگونه اشکال در تکامل صحیح این مجموعه در هنگام زندگی جنینی ممکن است به بروز رفتارهای ناهنجار در فرد گردد. در همین رابطه، مواد تراتوژن و نیز داروهای مختلف می توانند با ورود به بدن مادر و عبور از سد جفتی بر جنین تاثیر گذاشته و باعث بروز عوارض متعدد شوند. از سوی دیگر، شیوع نسبتا بالای داروهای مخدر در کشور ما [۴]، احتمال ورود این مواد به بدن مادران بارداری را که در تماس نزدیک با افراد معتاد قرار دارند را به همراه دارد و از این رو، همواره خطر تاثیر اوپیوئیدها به عنوان یک دارو بر بدن جنین این مادران وجود دارد. در تحقیقات قبلی مشخص شده است که مورفین به عنوان مهمترین اوپیوئید شناخته شده اثرات مهمی را در بدن موجودات از خود بر جای می گذارد. این ماده به دلیل ساختمان کوچک و حلالیت در چربی به راحتی می تواند از سدهای بیولوژیک مانند جفت عبور کرده و خود را به جنین برساند و همچنین با انقباض عروق جفتی، سبب کاهش خونرسانی به جنین شود [۵-۶]. این اثر به کاهش رشد و نمو جنین و نیز بروز ناهنجاری در مورفولوژی ظاهری جنین منجر می شود. از سوی دیگر، در رابطه با تکوین دستگاه عصبی، مورفین موجب تاخیر در نمو لوله عصبی [۷]، صفحه عصبی [۸]، عقده های قاعده ای [۹]، قشر مخ [۱۰] و پیاز بویائی [۱۱] در جنین موشهای بزرگ آزمایشگاهی شده است. به علاوه، همین تحقیقات نشان داده اند که مصرف مورفین طی دوران حاملگی همچنین منجر به تغییرات مورفومتریک و کاهش وزن و اندازه طول جنین ها می شود. محققان در توجیه اثرات دیده شده از مورفین، کارآئی مورفین در القاء انقباض عروق جفتی و در نتیجه کاهش خون رسانی به جنین (که به کاهش رشد آن منجر می شود) و نیز اثر احتمالی مورفین بر گیرنده های اوپیوئیدی موجود بر سلولهای جنینی را دلیل بروز اثرات دیده شده عنوان کرده اند. در یک تحقیق جدید، تکیه و همکاران [۱۲]، افزایش غلظت کورتیکوسترون پلاسما را در حین تجویز مورفین با دوز بسیار کم نشان داده اند و تاخیر دیده شده در تکوین ناحیه فوآ شبکیه جنین موشهای بزرگ آزمایشگاهی را به این خاصیت مورفین نسبت داده اند. بنابراین، به نظر می رسد که مورفین با فعال کردن مسیرهای متفاوتی در بدن مادر و یا جنین (و یا هر دو؟) اثرات مخرب خود در القاء تاخیر در تکوین بخشهای مختلف دستگاه عصبی را اعمال می کند.

تحقیقات نشان داده اند که اوپیوئیدها (و مورفین) با اثر بر گیرنده های اوپیوئیدی موجود در غشاء سلولی نورونهای دستگاه عصبی مرکزی (و دیگر بافت ها)، اثرات خود را اعمال میکنند. سه نوع مهم از گیرنده های اوپیوئیدی که همگی اعضایی از خانواده گیرنده های متصل به G پروتئین هستند شناخته شده اند که با نامهای مو، کاپا و دلتا نامیده می شوند [۱۳]. تحقیقات نشان داده است که هر سه نوع گیرنده اوپیوئیدی قادرند با مهار آنزیم آدنیلیل سیکلاز، غلظت داخل سلولی آدنوزین منو فسفات حلقوی (cAMP) را در بافت های مختلف کاهش دهند [۱۴].

با توجه به اینکه در تحقیق قبلی نشان داده شده است که مورفین اثر مخربی بر تکامل هیپوکمپ در جنین موش دارد [۱۵]، و با توجه به عملکرد هماهنگ کمپلکس آمیگدال در پردازش اطلاعات حیاتی با هیپوکمپ، که منجر به حفظ بقاء موجود و یا نسل آن می شود [۱]، در این تحقیق اثر مصرف خوراکی مورفین در دوران بارداری بر تکوین کمپلکس آمیگدال جنینها در موش های بزرگ آزمایشگاهی نژاد ویستار بررسی شده است.

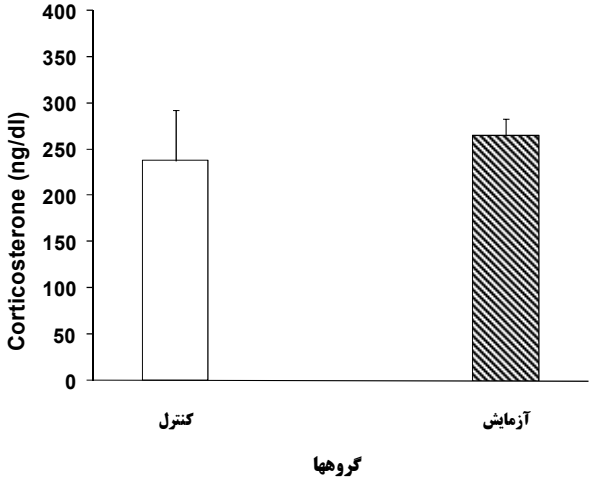
مواد و روش ها

در این مطالعه از سولفات مورفین تهیه شده از شرکت تماد ایران به صورت خوراکی استفاده شد. موشها به دو گروه آزمایش و کنترل تقسیم شدند که گروه کنترل شامل ۸ و گروه آزمایش شامل ۷ سر موش بود. ۱۵ سر موش سالم ماده باکره در گروه‌های دوتایی با یک موش نر بالغ جفت شده و پس از حصول اطمینان از بارداری (با مشاهده توپی واژنی و گسترش واژنی)، صبح روز بعد از موش‌های نر جدا شده ودر همان گروه‌های دو تایی نگهداری شدند. از این زمان به بعد (روز صفر بارداری)، گروه های آزمایشی مقدار ۰/۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مورفین به صورت روزانه دریافت کردند [۷-۱۱]. میزان مورفین

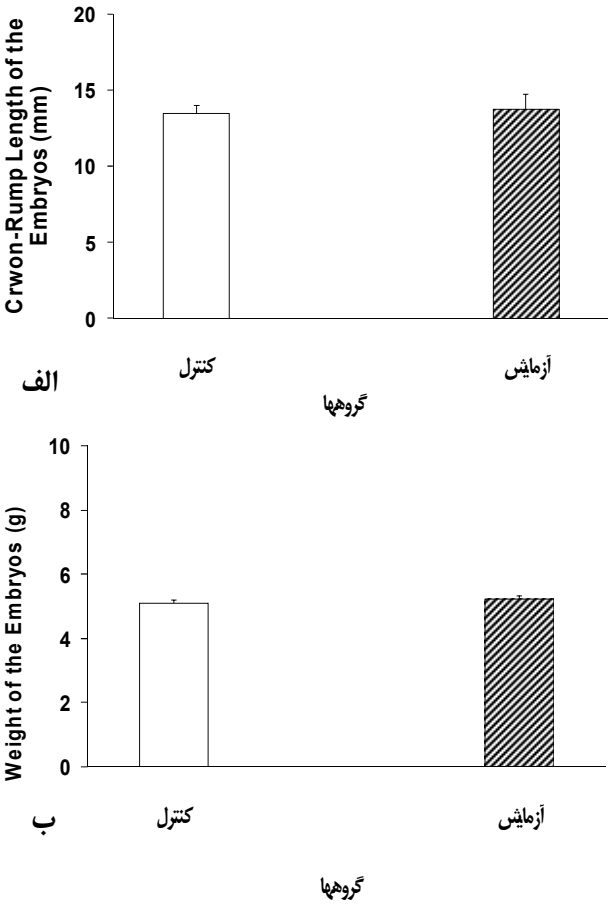
مصرفی برای ۱۴ml آب به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن موش محاسبه گردید اما سعی بر این بود که هر مقدار آب مورد نیاز حیوان بود در اختیار قرار داده شود. لازم به توضیح است که در این روش با توجه به مدت زمان تجویز مورفین و نیز دوز بسیار کم آن نسبت به روش معمول القاء اعتیاد به مورفین به روش خوراکی [۱۶]، حیوانات معتاد محسوب نمی شدند و به همین دلیل این روش تنها به بررسی اثر دارو بر تکوین جنین تمرکز دارد و هیچکدام از الگوهای مصرف مورفین از جمله الگوی ایجاد اعتیاد، الگوی مصرف مزمن، الگوی ضد اضطراب و یا الگوی ضد درد را شامل نمی شود. هرچند که تا حدودی به الگوی مصرف مزمن دارو نزدیک است. در روز ۱۹ بارداری موش‌ها با کلرفرم کشته شده و جنین ها به همراه رحم از بدن موش‌های مادر خارج و به محلول فرمالین ۱۰٪ برای مدت ۹۰ روز انتقال یافتند. تعداد جنینها در گروه کنترل ۵۷ سر و در گروه آزمایش ۴۹ سر بود. همزمان از موشهای مادر مقدار ۰/۹cc خون گرفته شد و در لوله های اپندورف حاوی ۰/۱ cc محلول سیترات سدیم ۵٪ ریخته و پس از سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰ برای مدت ۵ دقیقه، محلول روئی جدا شده و غلظت کورتیکوسترون آن با روش الایزا و در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری شد (کیت الایزا کورتیکوسترون موش بزرگ آزمایشگاهی از شرکت DRG-Germany). پس از این مدت محلول فرمالین جنین‌ها تعویض شده و جنین‌ها از آندومتر رحم جدا گردیده و توسط ترازوی دیجیتالی Sartorius با دقت ۰/۰۰۰۱گرم توزین شدند. سپس به وسیله کولیس (نوعCCCP) با دقت ۰/۰۵ میلی متر طول سری- دمی جنین‌ها اندازه‌گیری شد. سپس جنین‌ها در دستگاه پردازش بافتی قرار گرفته و آماده قالب‌گیری شدند. برای قالب‌گیری، سرجنین‌ها از تنه جدا شده و داخل پارافین قرار گرفتند. سپس مراحل برش‌گیری (سلوئیدین) از بلوک‌ها توسط میکروتوم (ساخت FIST آلمان) انجام شده و برش‌هایی به ضخامت ۷ میکرومتر به صورت سریال تهیه گردید. این برش‌ها سپس روی لام‌ها قرار گرفته (هر لام ۳ برش) و به روش‌های هماتوکسیلین – ائوزین (H&D) رنگ‌آمیزی شدند. با توجه به اندازه کمپلکس آمیگدال، از هر سر جنین تعداد ۲ یا ۳ لام بدست آمد که در کل تعداد ۲۰۰ لام از نظر طول و مساحت ناحیه آمیگدال (با بزرگنمائی X۱۰۰) و نیز تعداد و مساحت سلولهای این ناحیه (با بزرگنمائی X۱۰۰۰) مورد بررسی میکروسکوپی با میکروسکوپ نوری و نرم افزار موتیک قرار گرفتند. لازم به توضیح است که این نرم افزار قادر به تعیین اندازه (طول) و مساحت تصاویر بر اساس بزرگنمائی مشخص شده می باشد. برای بررسی تعداد سلولها از روش شمارش تصادفی (تعداد سلولها در ۵ مربع ۲X۲ سانتی متری در یک مساحت ۱۰X۱۰ سانتی متری) در تصاویری با بزرگنمائی X۴۰۰ استفاده شد. به این منظور پس از تثبیت تصویر و مربع بزرگتر، تعداد سلولها شمارش شد. به منظور بررسی تفاوتهای آماری از نرم افزار SPSS (شماره ۹/۱) و از تست t غیر مزدوج استفاده شد. $P< ۰/۰۵$ مرز معنی دار بودن تفاوتها تعیین شد.

یافته ها

۱- تاثیر مورفین خوراکی بر غلظت کورتیکوسترون پلاسمای خون مادران دریافت کننده مورفین خوراکی: همانطور که در بخش روشها گفته شد، پس از جراحی حیوانات باردار، در روز نوزدهم نمونه های خونی آنها جمع آوری و برای سنجش میزان کورتیکوسترون پلاسمای آنها مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج ما نشان داد که غلظت کورتیکوسترون در گروه شاهد و آزمایش تفاوت معنی داری نداشتند (کنترل=۲۴ ng/ml ± ۲۳۸، آزمایش=۱۵ ng/ml ± ۲۶۶، $P<۰/۱$ ،$t(14)=1.23$،



شکل ۱- تغییرات غلظت کورتیکوسترون پلاسما در خون مادران باردار گروه کنترل و آزمایش در روز نوزدهم بارداری. نتایج نشان دادند که غلظت کورتیکوسترون پلاسما در هر دو گروه از نظر آماری تفاوت معنی داری با هم ندارد.

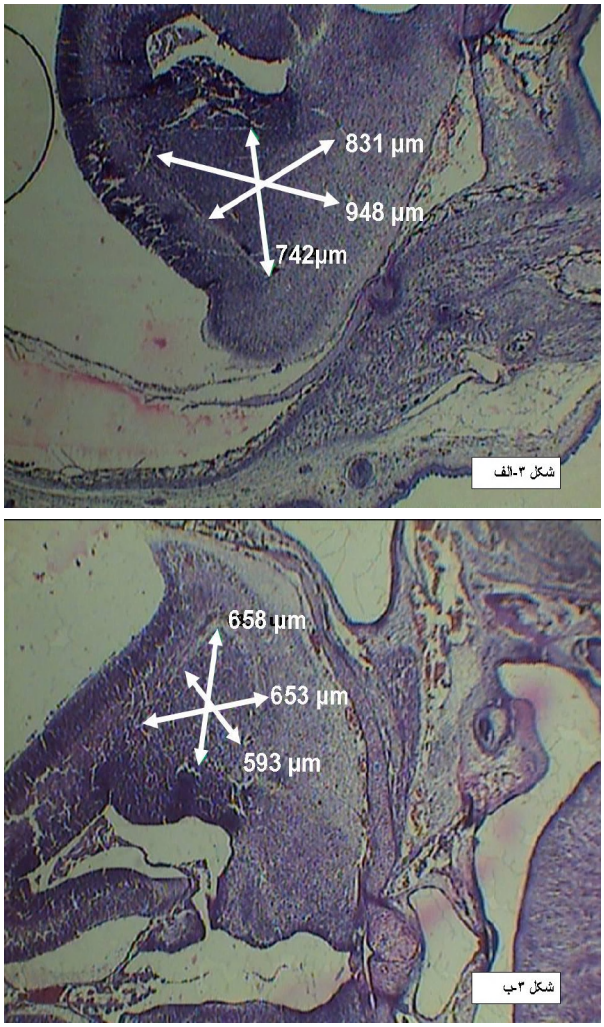


شکل۲- الف: تغییرات اندازه طول سری-دمی جنینهای گروه آزمایش و کنترل. این اندازه گیریها نشان دادند که جنینهای گروه آزمایش و کنترل تفاوت معنی داری از نظر آماری با یکدیگر ندارند. **ب:** تغییرات وزن جنینهای گروه آزمایش و کنترل. این اندازه گیریها نشان دادند که جنینهای گروه آزمایش و کنترل تفاوت معنی داری از نظر آماری با یکدیگر ندارند.

شکل ۱).

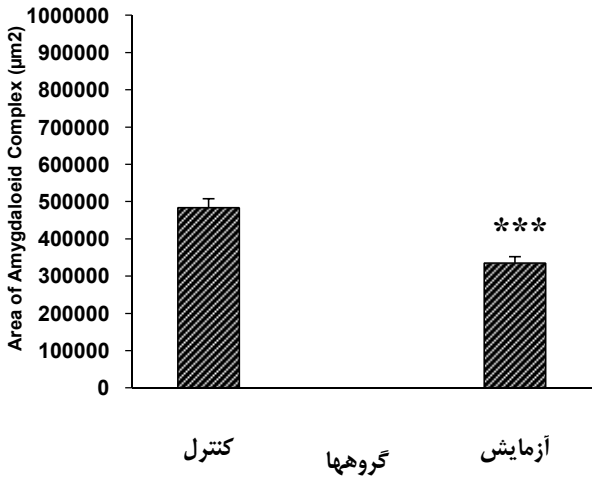
۲- تغییرات کمی ماکروسکوپی (طول سری-دمی و وزن) در جنینهای گروه آزمایش و کنترل: بررسی کمی جنینها (وزن و طول سری-دمی) در گروه آزمایش و کنترل نشان داد که بر اثر مصرف خوراکی مورفین، وزن جنین ها و همینطور طول محور سری-دمی آنها نسبت به گروه کنترل کاهش یا افزایش معنی داری نداشتند (طول محور سری-دمی در گروه کنترل= mm ۱۲/۶۷ ± ۰/۴ و در گروه آزمایش = mm ۱۳/۵ ± ۰/۶ و $t(89)=0.98, P< ۰/۱$، شکل ۲-الف). (وزن جنینها در گروه کنترل= g ۴/۱ ± ۰/۰۵ و در گروه آزمایش = g ۵/۴ ± ۰/۰۶ و $t(89)=1.0021, P< ۰/۱$، شکل ۲-ب)

۳- تغییرات کمی میکروسکوپیک مشاهده شده در ناحیه آمیگدال جنینهای گروه کنترل و آزمایش: همان طور که در



شکل ۳- تصویر تغییرات قطر و مساحت کمپلکس آمیگدال در گروه کنترل (الف) و آزمایش (ب). همچنانکه در شکلها پیداست، تمام قطرهای مربوط به کمپلکس آمیگدال کاهش یافته است. بزرگنمائی۱۰۰ X.

بخش روشها اشاره شد، پس از برشگیری و رنگ آمیزی، تغییرات میرسکوپیک کمپلکس آمیگدال مورد بررسی قرار گرفت. این ناحیه در رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین بصورت مثلثی دیده می شود که بوسیله خطوط حاشیه ای شبکه های کروئید در داخل، قشر مخ در خارج و هیپوکمپ در کنار مشخص می شود (شکل ۳-الف گروه کنترل و شکل ۳-ب گروه آزمایش). اندازه گیری سه محور این مثلث در جنینهای گروه آزمایش و کنترل مشخص کرد که طول هر سه ضلع این مثلث (و در نتیجه مساحت آن) در گروه آزمایش کاهش معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان می دهد (گروه کنترل= μm^2 ۴۸۳۹۴۲ ±۳۵۰۰۰ و در گروه آزمایش = μm^2 ۲۱۳۲۱ ± ۳۳۵۶۳۵ و $t(168)=10.1, P< ۰/۰۰۱$، شکل ۴).



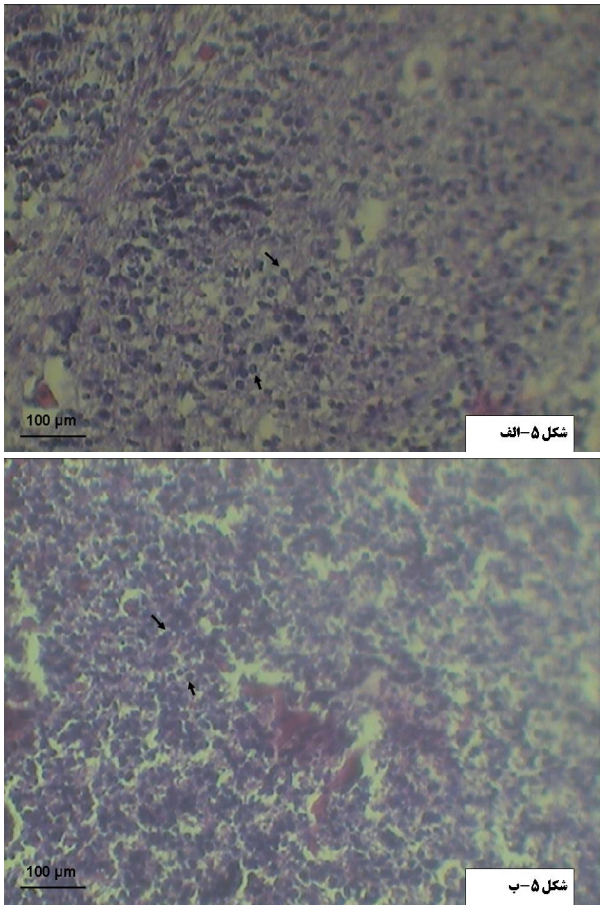
شکل ٤- تغییرات مساحت کلی کمپلکس آمیگدال در گروه آزمایش و کنترل. همچنانکه در شکل پیداست، مساحت کل آمیگدال در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری یافته بود. ۰/۰۰۱ >P*** تفاوت معنی دار گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل است.

۴- تغییرات مورفومتریک سلولهای کمپلکس آمیگدال در جنینهای گروه کنترل و آزمایش: تغییرات مورفولوژیک سلولهای کمپلکس آمیگدال در شکلهای ۵-الف و ۵-ب نشان داده شده است. همچنانکه در شکل مشخص است، اندازه سلولها در گروه کنترل بزرگتر و تعداد آنها کمتر از گروه آزمایش است.

بررسی اندازه های سلول های کمپلکس آمیگدال موش-های گروه آزمایش و کنترل نشان داد که اندازه (مساحت) سلول ها در گروه کنترل نسبت به گروه آزمایش بزرگتر (گروه کنترل= ۰/۰۹ μm^2 ± ۲۷ و در گروه آزمایش = ۰/۰۸ μm^2 ± ۲۱/۳ و ۰/۰۰۱ >P ،t(143)=7.22, شکل ۶-الف)، اما تعداد سلول های این ساختار (کمپلکس آمیگدال) در گروه آزمایش افزایش معنی داری را در واحد سطح نشان می دهند (گروه کنترل= ۱± ۷ و در گروه آزمایش = ۱ ± ۱۰/۱ و ۰/۰۱ >P ،t(143)=6.53, شکل ۶-ب)

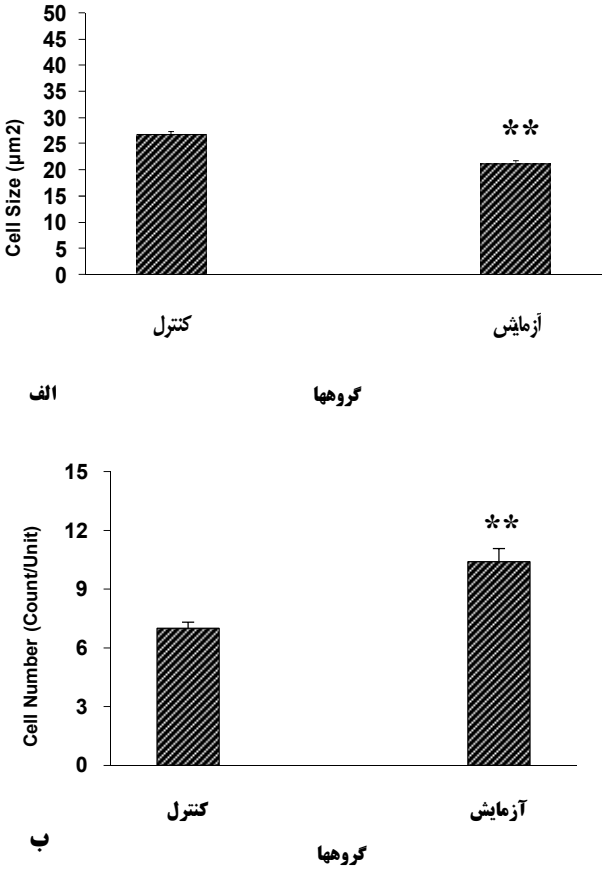
بحث

در این مطالعه، اثر مصرف خوراکی مورفین توسط موشهای باردار را بر تکوین کمپلکس آمیگدال جنین آنها بررسی کردیم. نتایج ما نشان دادند که علی رقم عدم وجود تفاوت در اندازه-های کمی (طول و وزن) بین جنین های گروه کنترل و



شکل ۵- تصویر تغییرات اندازه و تعداد سلولهای ناحیه آمیگدال در گروه کنترل (الف) و آزمایش (ب). بزرگنمائی X۴۰۰ همچنانکه در شکلها پیداست، تعداد سلولها در گروه آزمایش بسیار بیشتر از گروه کنترل ولی اندازه آنها کوچکتر است. پیکانها نشان دهنده سلولهای این ناحیه هستند.

آزمایش، اما تفاوتهای عمیقی بین این دو گروه در شاخصهای اندازه گیری شده در مورد کمپلکس آمیگدال دیده شد. از یک سو تعداد سلولهای این بخش از مغز در گروه آزمایش افزایش یافته بود و از سوی دیگر، اندازه آنها کاهش شدیدی یافته بود. همچنین، اندازه مجموعه آمیگدال نیز در گروه آزمایش کاهش نشان می داد. دو دلیل را برای افزایش تعداد سلولهای ناحیه آمیگدال در گروه آزمایش می توان بیان کرد: اولا ممکن است سلولهای تولید شده در بخش داخلی این ناحیه به طرف نواحی خارجی مهاجرت نکرده باشند، و یا ممکن است تولید این سلولها به هر دلیل (از جمله اثر القائی مورفین) افزایش یافته باشد. در هر حال همین توجیه برای افزایش تعداد سلولها در نواحی ویژه مغزی که در تحقیقات قبلی مورد مطالعه قرار گرفته اند، بیان شده است [۸-۱۲ و ۱۵]. این توجیه با توجه به وجود تعداد بسیار زیاد گیرنده های اوپیوئیدی در کمپلکس آمیگدال



شکل ٦-الف: نمودار تغییرات اندازه سلولهای کمپلکس آمیگدال در گروه آزمایش و کنترل. اندازه گیری مساحت این سلولها که معیاری از اندازه آنهاست نشان داد که اندازه این سلولها در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل کاهش چشمگیری یافته است. ۰/۰۱ >P** تفاوت معنی دار گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل است. **ب:** نمودار تغییرات تعداد سلولهای کمپلکس آمیگدال در گروه آزمایش و کنترل. شمارش این سلولها نشان داد که تعداد این سلولها در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل افزایش چشمگیری یافته است. ۰/۰۱ >P** تفاوت معنی دار گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل است.

[۱۷]، قابل توضیح است. از سوی دیگر، همانطور که می دانیم، جفت بافتی با منشا جنینی است که تقریبا هر دارو یا ماده محیطی که وارد جریان خون مادر می شود باید از آن عبور کرده و به جنین برسد [۱۸]. مطالعات قبلی ثابت کرده اند که مورفین درسیستم رگی جفت، باعث انقباض رگ ها می شود که این به نوبه خود میزان جریان خون را از طریق جفت و به طبع آن در جنین کاهش می دهد [۵-۶]. کاهش خونرسانی به جنین در حال رشد می تواند باعث کاهش میزان مواد مغذی رسیده شده به جنین شود و نیز، میزان اکسیژن رسانی به جنین را کم کند [۵-۷]. این امر ممکن است دلیل بروز ناهنجاری و تغییرات مورفومتریک در کمپلکس آمیگدال در این مطالعه باشد. از طرف دیگر، مورفین با اثرگذاری و تحریک محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (HPA) و تحریک ترشح هورمون کورتیکوسترون موجب افزایش غلظت این هورمون در خون می شود [۱۹]. این افزایش در غلظت پلاسمائی هورمون کورتیکوسترون در مطالعه ما دیده نشد و بنابراین ممکن است این سئوال پیش آید که دلیل افزایش تعداد سلول ها از یکطرف و کاهش اندازه آنها در گروه آزمایش چه بوده است. به نظر می رسد که بایستی دلایل دیگری غیر از توانائی مورفین در تحریک رها شدن هورمون کورتیکوسترون در نتایج دیده شده موثر باشند. در تحقیق قبلی، مشخص شده است که موشهای ماده بارداری که در آب خوراکی خود مورفین ۰/۰۵ میلی گرم در میلی لیتر مصرف می کرده اند، در روز سیزدهم بارداری نسبت به گروه کنترل دارای سطح کورتیکوسترون بالاتری بوده اند [۱۳]. اما تحقیق حاضر نشان داد که غلظت پلاسمائی کورتیکوسترون در گروه شاهد و آزمایش از نظر آماری تفاوت معنی داری ندارد. در توجیه این یافته چند نکته حائز اهمیت است. نخست آنکه تجویز دوز ثابت مورفین می تواند به تحمل نسبت به اثرات آن منجر شود [۱۹]. البته تحقیقاتی که تاکنون بر اثر مورفین بر ترشح کورتیکوسترون (و یا کورتیزول در انسان) تمرکز داشته اند، از اثربخشی این دارو در افزایش غلظت پلاسمائی کورتیکوسترون دلالت دارند [۱۹]. با این حال باید گفت که این تحقیقات بر اثر حاد مورفین تمرکز داشته اند و تاکنون تحقیقی که به بررسی اثر مصرف طولانی مورفین بر تغییرات غلظت کورتیکوسترون پرداخته باشد، انجام نشده است (بنابراین، وجود تحمل به این اثر مورفین هنوز مورد مطالعه واقع نشده است). البته با توجه به ماهیت عملکرد مورفین در سلولهای مختلف و اینکه در تمامی موارد مصرف طولانی مدت و با دوز ثابت مورفین به بروز تحمل منجر می شود [برای مرور مراجعه شود به: ۱۴]، می توان انتظار داشت که با توجه به نتایج این تحقیق و تحقیق قبلی ما [۱۲]، در حیوانات مورد تیمار با مورفین در این آزمایش این امر اتفاق افتاد است. این یافته در حقیقت یک نکته جدید است که نشان دهنده بروز تحمل به اثر دیگری از مورفین یعنی تحریک ترشح کورتیکوسترون از غده فوق کلیه است. البته در این مورد بایستی تحقیقات بیشتری انجام شود. با توجه به اینکه افراد معتاد از نظر بیولوژیک در موقعیت با استرس بالا قرار دارند، این یافته جدید شاید بتواند مورد استفاده در مطالعات مربوط به ترک اعتیاد به اوپیوئیدها نیز

باشد. این گفته می تواند راهگشای عدم وجود تفاوت در اندازه‌های کمی و وجود تفاوت در تکوین آمیگدال باشد. به این معنی که سلولهای آمیگدال (و احتمالا سایر نقاط بدن؟) در روزهای ابتدائی (قبل از بروز تحمل) مصرف مورفین، با بالا رفتن غلظت کورتیکوسترون خون مادر و در نتیجه جنین، اثرات مضر این هورمون مانند القاء تکثیر سلولی و نیز جلوگیری از مهاجرت سلولها اعمال شده است و با کاهش غلظت آن بعد از بروز تحمل نیز این اثر ادامه دارد و هنوز جنین نتوانسته است خود را از زیر بار اثر هورمون رها کند. از سوی دیگر، تحقیقات نشان داده اند که اندازه سلولهای موجود در ناحیه تگمنتوم شکمی و سایر بخشهای دستگاه مزوکورتیکولیمبیک در اثر تجویز مزمن مورفین کاهش می یابد [۲۰]. در تحقیقات قبلی مشخص شده است که این کاهش به دلیل کاهش ماده سوبسترای شماره ۲ گیرنده انسولینی (IRS2) عامل مهمی در کاهش اندازه این سلولها می باشد [۲۰]. در تحقیق حاضر نیز ممکن است بخشی از اثر دیده شده توسط مورفین در کاهش اندازه سلولها به همین دلیل باشد. از سوی دیگر، تحقیقات نشان داده اند که در روزهای پایانی بارداری، غلظت هورمون گلوکوکورتیکوئیدی (کورتیکوسترون در جوندگان، کورتیزول در انسان) در خون مادر باردار بالا رفته و این امر برای تکامل عملکردی دستگاه تنفس و برخی دستگاه های دیگر بدن جنین ضروری است [۱۸]. به همین دلیل ممکن است افزایش ترشح کورتیکوسترون در روزهای آخر بارداری در بدن موشهای گروه کنترل و آزمایش به گونه ای بوده است که تاثیر مورفین را پوشش داده و در نتیجه اثر مورفین در افزایش غلظت کورتیکوسترون پلاسما دچار نوعی همپوشانی شده است. در نهایت، ممکن است به دلیل بیهوش شدن موشها کورتیکوسترون در خون آنها زیاد ترشح شده و این امر اثر مورفین را پوشش داده باشد. بایستی در نظر داشت که تحقیقات مختلف نشان داده است که داروهای بیهوشی مختلف به عنوان یک استرسور قادر به افزایش سطح پلاسمائی کورتیکوسترون در موش هستند [۲۱]. به دلایل ذکر شده فوق، می توان اظهار کرد که ممکن است که اثر دیده شده از مورفین بر اندازه و تعداد سلولهای ناحیه آمیگدال به دلیل تاثیر مورفین بر ترشح کورتیکوسترون از بدن مادر باردار در روزهای قبل از روز نوزدهم بوده است و این اثر تا روز نوزدهم همچنان باقی مانده است در حالیکه غلظت این هورمون در این روز به سطح طبیعی بازگشت کرده است. باید توجه داشت که هورمون کورتیکوسترون با اثر بر عروق جفتی باعث انقباض آنها و در نتیجه کاهش خونرسانی به جنین می شود [۲۲]. این اثر میتواند به کاهش رشد و نمو جنین منجر شود. یک نکته ظریف اما مهم نیز آن است که با تنگ شدن عروق جفتی نه تنها خونرسانی به جنین کاهش می یابد، بلکه برداشت مواد دفعی و زائد از اطراف جنین نیز کاهش یافته و محیط به اصطلاح سمی می شود. این اثر تا کنون مورد بررسی قرار نگرفته است و می تواند در تحقیقات بعدی مورد توجه باشد. نتیجه نهائی هردو این عوامل میتواند به کاهش یا حتی توقف رشد جنین منجر شود و به همین دلیل ممکن است رشد جنین را متوقف کند. اما در تحقیق ما شاخصهای رشد کمی جنین در دو گروه آزمایش و کنترل تغییر معنی داری را نشان ندادند. دلایل متعددی برای این نتایج متصور است. قبل از هر چیز بایستی در نظر داشت که در تحقیقات قبلی نشان داده شده است که تجویز خوراکی مورفین باعث کاهش اندازهای کمی رشد جنین گردیده است [۱۱]. این نتایج با نتایج ما در تناقض است. دلایل این تناقض ممکن است دوز مصرفی مورفین بیشتر در تحقیقات قبلی [۱۱] و یا زمان انجام (فصل) تحقیق باشد. در تحقیق حاضر حیوانات در فصل بهار باردار شدند در حالیکه در تحقیقات قبلی این کار در فصل زمستان انجام گرفته بود [۱۱]. اینکه آیا اثر مورفین وابسته به فصل است یا خیر و اثرات ریتمهای سیرکادین بر کار مورفین چگونه است، در بررسی های مربوط به بی دردی مورد بررسی قرار گرفته است [۲۳]. تحقیقات نشان داده اند که تجویز مورفین با دوز کمتر در هنگام کاهش زمان روشنائی در حیوانات روز خواب موجب بروز بی دردی و برعکس در هنگام افزایش زمان روشنائی باعث کاهش بی دردی می شود [۲۳]. محققان این امر را به اثر طول دوره شبانه روزی بر ترشح هورمونهای جنسی نسبت داده اند که با تداخل با اثر مورفین باعث افزایش بی دردی در حیوان شده است [۲۳]. اینکه آیا اثر مورفین بر تکوین بخشهای مختلف جنین نیز از همین قانون تبعیت می کند یا خیر، هنوز تحقیقی در مورد آن انجام نشده است. باید در نظر داشت که احساس درد و ترشح هورمونهای گلوکوکورتکوئیدی در انسان وابسته به طول شبانه روز متفاوت است و در نقاطی که طول شب بیشتر است (مانند شمال اروپا) انسانها درد کمتری را

بخصوص در ناحیه سر و صورت حس میکنند [۲۴]. مسلما اگر اثری از مورفین دیده می شود قسمتی مربوط به هورمونهای گلوکوکورتیکوئیدی است که با تحریک محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال توسط مورفین انجام می شود [۷].

با توجه به عملکرد مجموعه آمیگدال در دستگاه عصبی که با تنظیم اعمال مهمی نظیر تغذیه، تولید مثل، خشم، ترس، و رفتارهای غیر طبیعی مانند اعتیاد سر و کار دارد، و با توجه به نتایج تحقیق حاضر که نشان دهنده تاثیر مصرف مقادیر بسیار کم مورفین در القاء تغییرات مورفولوزیک و احتمالا عملکردی در نورونهای این ناحیه از دستگاه عصبی است، در یک جمع بندی کلی به نظر می رسد که مورفین با تغییر عملکرد این نورونها ممکن است باعث بروز تغییر در رفتارهای مختلف حیوان از جمله تغذیه، تولید مثل و نیز از همه مهمتر، اعتیاد شود. البته در این تحقیق حیوانات پس از تولد مورد بررسی قرار نگرفتند و نحوه پاسخگوئی آنها به یک داروی اعتیادآور مثل مورفین مورد بررسی قرار نگرفت که می تواند موضوع تحقیق دیگری باشد.

در یک جمع بندی با توجه به تحقیق حاضر و تحقیقات قبلی در این زمینه، به نظر می رسد که تجویز دوزهای بسیار کم مورفین (و احتمالا هر اوپیوئید دیگر) نه تنها مفید نیست بلکه می تواند بسیار خطرناک هم باشد. این تحقیق نشان داد که مورفین حداقل در آمیگدال قادر به القاء تغییرات مورفولوزیک (و احتمالا عملکردی) است که بایستی با تحقیقات دیگری در زمینه رفتاری کامل شود.

سپاسگزاری

این کار با کمک مالی مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) انجام شد.

References

[1] Alheid GF, Delomos, JS. 1999. Amygdala and extended amygdale in Paxinos G (ed). ***The Rat nervous system.*** Second edition. New York, Academic Press. PP. 495-572.

[2] Everrit, BJ, Wolf, M E. Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. ***J Neurosci*** 22 (2002) 3312-3320.

[3] Fowden AL, Forhead AJ, Coan PM, Burton GJ. The placenta and intrauterine programming. ***J Neuroendocrinol*** 20 (2008) 439-50.

[4] Holtman JR, Salon JS, Wala EP. Morphine tolerance in male and female rats. ***Pharmacol Biochem Behav*** 77 (2004) 517-23.

[5] Iranian Drug Control Headquarter. The Year Book of Iranian Drug Control Headquarter, 1st edition. Tehran: NAJA Publisher; 2007, 12-13.

[6] Iyengar S, Mick S, Dilworth V, Michel J, Rao TS, Farah JM, Wood PL. Sigma receptors modulate the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis centrally: evidence for a functional interaction with NMDA receptors, in vivo. ***Neuropharmacology*** 29 (1990) 299-303.

[7] Khalili M, Semnanian S, Fatholahi Y. Caffeine increases paragigantocellularis neuronal firing rate and induces withdrawal signs in morphine dependent rats. ***Eur J Pharmacol*** 412 (2001) 239-45.

[8] Kieffer BL, Evans CJ. Opioid receptors: from binding site to visible molecule in vivo. ***J. Neuropharmacology*** 56 (2009) 205-212.

[9] Le Doux J. The Amygdala. ***Current Biology*** 17 (1999) R868-R874.

[10] Levitt P. Prenatal effects of drug of abuse on brain development. ***Drug and Alcohol Dependenc*** 51 (1998) 109-125.

[11] Nasiraei-Moghadam S, Bahadoran H, Saeedabady S, Shams J, Sahraei H. Oral administration of morphine delay neural plate development of rat embryos. ***Physiology and Pharmacology*** 12 (2009) 314-319.

[12] Nasiraei-Moghadam S, Sahraei H, Sadooghi M, Bahadoran H, Dashtnavard H. Effects of maternal oral morphine consumption on neural tube development in Wistar rats. ***Developmental Brain Res*** 159 (2005) 12-17.

[13] O'Brien CP. Drug addiction and drug abuse. In: Hardman JG, Limbird LE and Goodman Gilman A. *Goodman and Gilman The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill. New York. 2001, pp: 621-42.

[14] Ramazani M, Tekyeh E, Zardooz H, Bahadoran H, Sahraei H. 2009. Oral morphine consumption delayed fovea development in the Wistar rat embryo eyes, possible corticosterone involvement. ***Physiology and Pharmacology*** 13 (2009) In Press.

[15] Ramazani M, Hamidi E, Haji Moghadam Zadeh A, Bahadoran H, Sahraei H. 2010. The effect of oral morphine consumption on hippocampus development in Wistar rats embryo. ***Kowsar Medical Journal*** 15 (2010) In Press.

[16] Raye JR, Dubin JW, Blecher JN. Retardation following maternal morphine administration: nutritional or drug effect? ***Biol Neonal*** 32 (1977) 222-8.

[17] Russo SJ, Bolanos CA, Theoblad DE, et al. IRS2-Akt pathway in midbrain dopamine neurons regulates behavioral and cellular responses to opiates. ***Nature Neuroscience*** 10 (2007) 92-99.

[18] Sadraie SH, Kaka GR, Sahraei H, Dashtnavard H, Bahadoran H, Mofid M, Nasab HM, Jafari F. Effects of maternal oral administration of morphine sulfate on developing rat fetal: a morphometrical evaluation. ***Brain Res*** 1245 (2008) 36-40.

[19] Saeedabadi S, Sadooghi M, Sahraei H, Bahadoran H, Fahanik Babaei J, Jalili C. Effects of oral morphine on the development of olfactory bulb in rat embryo. ***The Scientific Journal of Arak Medical University***, 11 (2008) 1-8.

[20] Sah, P. Faber, E.S. Lopez, M., Power, J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. ***Physiol Rev*** 83 (2003) 803-834.

[21] Schoenen J, Sandor PS. Headache In: Wall PD and Melzack R. ***Text book of Pain***. Churchill Livingstone. USA. 1999, pp: 761-798.

[22] Soleimani M, Sahraei H, Sadooghi M, Maleki P. Effects of prenatal morphine exposure on the basal ganglia development in rat embryo. ***The Scientific Journal of Arak Medical University*** 9 (2006) 53-61.

[23] Van den Bergh BRH, Mulder EJH, Mennes M, Glover V. Antenatal maternal anxiety and stress and the neurobehavioural development of the fetus and child: links and possible mechanism, a review. ***Neuroscience and Biobehavioral Review*** 29 (2005) 237-258.

[24] Zardooz H, Ghalami L, Zarringhalam J. Effects of different anesthetics on plasma glucose, insulin and corticosterone in rats. ***Physiological Res***, In Press.