

ارزیابی اثر محافظت جنینی ملاتونین در برابر اثرات آپوپتوتیک متادون در بافت‌های جنینی موش‌های سوری

مریم اکبرزاده^۱، فرخنده نعمتی^{۱*}، فاطمه شکی^۲، عباسعلی دهپوری جویباری^۱، رامین عطایی^{۲،۳*}

مقاله پژوهشی

مقدمه: متادون ترکیبی است که به‌طور وسیع در درمان جایگزین اعتیاد، کاربرد دارد. این مطالعه جهت بررسی خواص محافظتی ملاتونین بر آپوپتوز ناشی از انتقال جفتی متادون طرح‌ریزی شده است.

روش بررسی: موش‌های Bulb-C به وزن ۲۵-۳۰ گرم، در قفسه‌های ۴ تایی (۳ ماده و یک نر) نگهداری شده و هر روز جهت سیکل استرال چک شدند، برای موش‌ها با پلاگ واژینال روز اول بارداری در نظر گرفته شد. پس از تایید بارداری، موش‌های ماده به ۵ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. که شامل گروه کنترل، متادون (۱۰ mg/kg) و گروه‌های ملاتونین در سه دوز (۲، ۴، ۶ mg/kg/day) بوده که به‌صورت تزریق IP نیم‌ساعت قبل از تجویز متادون، انجام شد. که این تجویز برای ۱۰ روز از ابتدای شروع بارداری انجام گرفت. بعد از اینکه نوزادان متولد شدند، کبد، مغز و کلیه‌هاشان خارج شد و برای بررسی بیان پروتئین‌های آپوپتوتیک Bcl2، BAX، Caspase3 تحت آزمایشات مربوطه آپوپتوز به روش ایمونوهیستوشیمی قرار گرفتند. نتایج به‌دست آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS version 16 و تست‌های مجذور کا (کای ۲) و تست فیشر مورد آنالیز قرار گرفت ($P < 0/01$).

نتایج: علی‌رغم اینکه ملاتونین در دوز ۴ و ۶ mg/kg باعث کاهش بیان پروتئین‌های آپوپتوتیک BAX و Caspase9، و افزایش بیان پروتئین آنتی آپوپتوتیک Bcl2 گردید اما این تغییرات از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P > 0/05$) هم‌چنین تزریق ملاتونین در دوز ۲ mg/kg باعث ایجاد تغییر معنی‌دار در بیان پروتئین‌های مذکور نشده است.

نتیجه‌گیری: ملاتونین در کاهش آپوپتوز ناشی از متادون به خصوص افزایش بیان Bcl2 تا حدی موثر بوده اما از لحاظ آماری نتایج معنی‌داری مشاهده نشده است.

واژه‌های کلیدی: متادون، اعتیاد، بارداری، انتقال جنینی، آپوپتوز، ملاتونین، پروتئین‌های آپوپتوتیک، BAX، Caspase9، Bcl2

ارجاع: اکبرزاده مریم، نعمتی فرخنده، شکی فاطمه، دهپوری جویباری عباسعلی، عطایی رامین. ارزیابی اثر محافظت جنینی ملاتونین در برابر اثرات آپوپتوتیک متادون در بافت‌های جنینی موش‌های سوری. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۱؛ ۳۰(۴): ۱۸-۴۷۰۶

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم‌شهر، قائم‌شهر، ایران.

۲- مرکز تحقیقات علوم دارویی، انستیتو هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

۳- مرکز تحقیقات تالاسمی، انستیتو هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

* (نویسنده مسئول اول): تلفن: ۰۹۱۱۳۱۴۰۵۵۹، پست الکترونیکی: farkhondehnamati@gmail.com، صندوق پستی: ۱۶۳

* (نویسنده مسئول دوم): تلفن: ۰۹۱۱۳۲۳۲۸۰۴، پست الکترونیکی: raminataee1349@gmail.com، صندوق پستی: ۴۸۴۷۱۹۱۶۲۶

مقدمه

متادون آگونیست قوی گیرنده- μ اپیوئیدی است و تأثیرات اصلی خود را از این طریق تحریک این گیرنده اعمال می‌کند، و با توجه به اثرات ضعیف‌تر آن نسبت به مورفین و نیمه عمر طولانی در بدن یک داروی نگهدارنده در درمان اعتیاد به حساب می‌آید (۱). هم‌چنین متادون آنتاگونیست گیرنده گلوتاماترژیک (ان متیل-د-آسپاراتات) است که احتمالاً با مهار عملکرد این کانال یونی (دریچه-لیگاندی)، میزان وابستگی به مخدرهای اپیوئیدی را کاهش می‌دهد (۱) قابلیت متادون در مهار اعتیاد به مخدرهای اپیوئیدی ناشی از چند عامل است: کاهش عوارض جسمی و روانی ناشی از ترک، مهار یا کاهش میل به مصرف (عطش)، و هم‌چنین باعث کاهش نشنگی ناشی از مواد مخدر دیگر می‌شود (۱). متادون مانند همه مخدرهای اپیوئیدی ایجاد تحمل و وابستگی می‌کند، تحمل نسبت به اثرات روانی مانند سرخوشی سریع‌تر، و نسبت به اثرات جسمانی مانند دپرسیون تنفسی دیرتر پدید می‌آید متادون در فواصل طولانی مدت باعث توهم که شامل، اختلالات روانی هنگام خواب، عدم اعتماد، می‌گردد. هم‌چنین پوسیدگی دندان‌ها، حساسیت‌های پوستی، هنجار شکنی‌های بیگانه، عدم ثبات شخصیتی و در مواردی میل به خودکشی گزارش شده است که برای رفع این علائم، داروهای (ضدروان‌پریشی) یا آنتی سایکوتیک‌ها کنار متادون پیشنهاد می‌شود (۲). متادون مانند سایر مخدرها اثرات سایر داروهای تضعیف‌کننده سیستم عصب مرکزی را تشدید کرده و احتمال اختلال عملکرد سیستم عصبی مرکزی را افزایش می‌دهد. از جمله داروهای تضعیف‌کننده سیستم عصبی مرکزی شامل: بنزودیازپین‌ها، باریتورات‌ها، الکل، داروهای ضد تشنج، داروهای ضدجنون و ضد افسردگی‌های سه‌حلقه‌ای می‌باشند. هم‌چنین مصرف همزمان داروهای ضد مخدر مانند نالوکسان، نالتراکسان و نالبیفن و هم‌چنین آگونیست‌های نسبی مخدر (بوپرونورفین) و یا داروها آگونیست‌ها-آنتاگونیست مختلط (پنتازوسین) می‌تواند موجب ایجاد علائم قطع مصرف در بیماران مبتلا به وابستگی

به متادون گردد (۲). گزارشاتی از تأثیرات هورمونی و جنینی متادون وجود دارد. در مطالعه‌ای مشخص شد که سن بارداری و بیان گلیکوپروتئین P در انتقال متادون از مادر به جنین نقش دارد و کلیرانس متادون در پره‌ترم (زایمان‌های زودرس که مدت بارداری کامل نبوده و شامل نوزادان نارس است) بین ۱۹٪ +/- ۵/۸ و در ترم (بارداری کامل و زایمان به موقع) ۳۱ +/- ۹/۷ بوده است. ($P < 0.01$) ضریب کلیرانس متادون در پره ترم پلاسنتا (۵۷٪ +/- ۰/۲) کمتر از ترم بوده و بیان گلیکوپروتئین P در ترم پلاسنتا بیشتر از پره ترم بوده است (۳). زنانی که به‌طور مداوم از متادون یا سایر اپیوئیدها استفاده می‌کنند عادت ماهانه خود را از دست داده‌اند. هم‌چنین مواد افیونی احتمال سقط جنین یا تولد کودکان زیر وزن استاندارد یا به صورت نارس را افزایش می‌دهد، هم‌چنین قطع ناگهانی آن‌ها در دوران بارداری ممکن است باعث بروز نشانگان ترک اپیوئید در جنین شود، این سندرم معمولاً در نوزادان تازه متولد شده از مادر معتاد به اپیوئید نیز بروز می‌کند و نیاز به توجه پزشکی دارد (۳). ملاتونین (ان-استیل-۵-متوکسی تیرپتامین) در سال ۱۹۸۷ توسط لرنر (Lerner) و همکارانش شناسایی و جداسازی شد (۴). ملاتونین نقش مهمی در سیستم ساعت بیولوژیک داشته و هم‌چنین دارای خواص آنتی‌اکسیدانتی قوی می‌باشد. میزان ملاتونین در نیمه شب به بالاترین مقدار و در طول روز به کمترین مقدار ممکن می‌رسد (۴). هم‌چنین مطالعات جدید نقش آنتی کانسری برای ملاتونین به‌دلیل خواص آنتی‌اکسیدانتی و محافظت سلولی و انکوستاتیک پیشنهاد نموده است. به طوری که نشان داده شده است که ملاتونین باعث تخفیف علائم بسیاری از کانسرها و مهار آنژیوژنیزس، پرولیفراسیون و متاستازیس می‌گردد (۵،۶). هم‌چنین در برخی مطالعات بالینی نشان داده شده که ملاتونین می‌تواند آثار حفاظت سلولی داشته و باعث افزایش کارایی شیمی‌درمانی کانسر و افزایش امید به زندگی گردد (۷). هم‌چنین براساس بسیاری از مطالعات، اضافه کردن ملاتونین به رژیم شیمی‌درمانی می‌تواند باعث کاهش سمیت شیمی‌درمانی و رادیوتراپی در بیماران دچار کانسر کولورکتال شود (۸). آمارها

نشان می‌دهند از هر ۱۰ نفر مصرف‌کننده مواد مخدر در ایران یک نفرشان زن است و گرایش دختران و زنان نسبت به مصرف مواد مخدر در حال افزایش است و سالانه حدود یک میلیون و ۵۰۰ هزار زن باردار در جامعه داشته و سالانه حدود ۷۰۰۰ کودک معتاد در ایران متولد می‌شود که معادل تولد روزانه ۲۰ کودک معتاد است. لذا با توجه به اثرات حفاظت سلولی ملاتونین و اثرات آنتی اکسیدانت آن، هدف این مطالعه بررسی ملاتونین در مقابل اثرات آپوپتوز متادون به‌عنوان یک داروی کنترل‌کننده اعتیاد در سطح جنینی در مدل موش سوری می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعه یک مطالعه تجربی بوده و معیار ورود موش‌های بارداری بوده که تحت تجویز خوراکی متادون قرار گرفته‌اند و معیار خروج عدم بیماری‌های زمینه‌ای دیگر و مصرف داروهای دیگر در این حیوانات بوده است. پودر ملاتونین از شرکت سیگما (آلمان) و شربت متادون (از اداره کنترل مواد مخدر معاونت غذا و دارو دانشگاه علوم پزشکی مازندران) و آنتی‌بادی‌های اولیه آپوپتوز (Caspase9, Bcl2, BAX) و آنتی‌بادی ثانویه (HRPconjugate) از شرکت سانتاکروز (آمریکا) و بافرهای مورد استفاده همچون PBS، سیترات و tween 80 از شرکت Merk آلمان تهیه گردیدند. موش‌های Bulb-C ماده ۵۰ سر به وزن ۲۵-۳۰ گرم و نر به تعداد ۲۵ عدد از مرکز مجتمع حیوانات علوم پزشکی مازندران تهیه و در قفسه‌های ۴ تایی (۳ ماده و یک نر) نگهداری شده و بعد از ۷ روز روزانه جهت سیکل استرال چک می‌شدند سپس مجدداً هر دو موش ماده با ۱ موش نر در قفس جداگانه به همراه تغذیه روزانه و آب کافی و هم‌چنین دمای مناسب قرار گرفته تا مرحله آمیزش جنسی اتفاق بیفتد سپس موش‌های ماده هر روز برای پلاگ واژینال چک شدند که در صورت مشاهده آن، روز اول بارداری در نظر گرفته شد. پس از آمیزش موش‌ها و اطمینان از وقوع بارداری موش‌های ماده توسط تکنسین مرکز مجتمع نگهداری حیوانات، موش‌های ماده از قفس‌های حاوی موش‌های نر جدا شده و در قفس‌های جداگانه‌ای به تعداد شش موش ماده باردار در هر قفس نگهداری شدند (پنج گروه شش‌تایی از

موش‌های ماده در شش قفس) و به هر گروه مقدار تعیین شده‌ای از شربت متادون رقیق شده بر حسب وزن موش‌ها (طبق پروتکل درمانی) به صورت گاوژ و ملاتونین رقیق شده به صورت تزریق صفاقی تجویز شد. پس از زایمان، نوزادان مربوط به هر گروه جدا شده و پس از کشتن به روش زدن سر و نمونه‌گیری از کبد، کلیه و مغز نوزادان، ابتدا بافت‌ها در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شده و پس از تهیه بلوک پارافینی بافتی و تهیه لام توسط دستگاه میکروتوم، مراحل رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای مارکرهای آپوپتوز Bcl2, BAX, Caspase9، برای هربافت انجام شد. سپس اسلایدها توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰ و ۴۰ بررسی شد.

گروه‌های مورد مطالعه از قرار ذیل است:

- ۱- گروه کنترل منفی شش موش بار دار از روز ۸ تا ۱۸ بارداری تحت تجویز نرمال سالین ۰/۹ درصد (حامل دارو) به‌صورت روزانه به‌صورت صفاقی (IP) قرار گرفتند (کنترل منفی).
 - ۲- گروه کنترل مثبت، شش موش باردار از روز ۸ تا ۱۸ بارداری تحت تجویز فقط متادون تزریق (۱۰ mg/kg) ۰/۳ میلی لیتر متادون به‌صورت گاوژ قرار گرفتند.
 - ۳- گروه تست اول، شش موش باردار از روز ۸ تا ۱۸ بارداری تحت تجویز ملاتونین ۰/۲ mg/kg/day به‌صورت IP (۱۰ mg/kg) و ۰/۳ میلی‌لیتر متادون به‌صورت گاوژ قرار گرفتند (تعیین دوز ملاتونین بر اساس مطالعات قبلی و بررسی‌های پایلوت بوده است) (۸-۱۰).
 - ۴- گروه تست دوم، شش موش باردار از روز ۸ تا ۱۸ بارداری تحت تجویز ملاتونین ۴mg/kg/day به‌صورت IP (۱۰ mg/kg) و ۰/۳ میلی‌لیتر متادون به‌صورت گاوژ قرار گرفتند.
 - ۵- گروه تست سوم، شش موش باردار از روز ۸ تا ۱۸ بارداری تحت تجویز ملاتونین ۶mg/kg/day به‌صورت IP (۱۰ mg/kg) و ۰/۳ میلی‌لیتر متادون به‌صورت گاوژ قرار گرفتند.
- تمام نمونه‌های مورد مطالعه از بافت (کلیه، کبد و مغز) موش‌های نوزاد متولد شده در فرمالین ۱۰٪ فیکس شدند. در ادامه بلوک‌های پارافینی مورد نیاز در بخش پاتولوژی بیمارستان امام خمینی ساری، تهیه و برش‌های بافتی به وسیله

۴۰۰ بررسی اسلایدها و عکس‌برداری صورت پذیرفت، نواحی مثبت به صورت لکه‌های قهوه‌ای در اثر رسوب DAB مشخص گردید و با بررسی و شمارش سلول‌های مثبت در Zone 1 μm^2 میکروسکوپی درصد سلول‌هایی که غشاء یا سیتوپلاسم آن‌ها به وسیله DAB رنگ گرفته بودند به عنوان اندکس ایمونوراکتیویته به صورت کیفی با سه درجه (mild, Moderate, High) تعیین گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به دست آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS version 16 مورد آنالیز قرار گرفتند. و تست فیشر و برای آنالیز ارتباط بین بروز پروتئین با داروهای مورد استفاده شده انجام شد ($P < 0.01$).

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه علوم پزشکی مازندران تایید شده است (کد اخلاق IR.MAZUMS..REC.1398.5488)

نتایج

در شکل‌های ۴-۱ نتایج آزمایش ایمونوهیستوشیمی در غلظت‌های مختلف ملاتونین نشان داده شده است و در جدول یک نتایج آزمون آماری فیشر آمده است. همانطور که در شکل مشخص است متادون در دوز 10 mg/kg ، (شکل 1a)، باعث افزایش بیان پروتئین‌های آپوپتوز گردیده و ملاتونین تقریباً در یک روند وابسته به دوز باعث کاهش بیان پروتئین آپوپتوتوز BAX و افزایش بیان BCl2 گردیده است. به طوری که بیان BAX در دوز 6 mg/kg ملاتونین (شکل a1) نسبت به دوز 4 mg/kg (شکل b1) کمتر شده است (grade++) در مقابل (grade+++). و همچنین بیان پروتئین آنتی آپوپتوز BCl2 در دوز 6 mg/kg ملاتونین (شکل 1G) نسبت به دوز 4 mg/kg (شکل 1H) و 2 mg/kg (شکل 1I) افزایش یافته است (grade+++). و همچنین بیان پروتئین آپوپتوتیک Caspase9 در دوز 6 mg/kg ملاتونین (شکل 1D) در برابر دوز 4 mg/kg (شکل 1b) کاهش یافته است (grade++). در مقابل (Antigen retrieval+++).

میکروتوم تهیه و لام‌های اختصاصی ایمونوهیستوشیمی از این بافت‌ها تهیه گردید (تهیه برش‌های پارافینی ۳ میکرونی از بلوک‌ها).

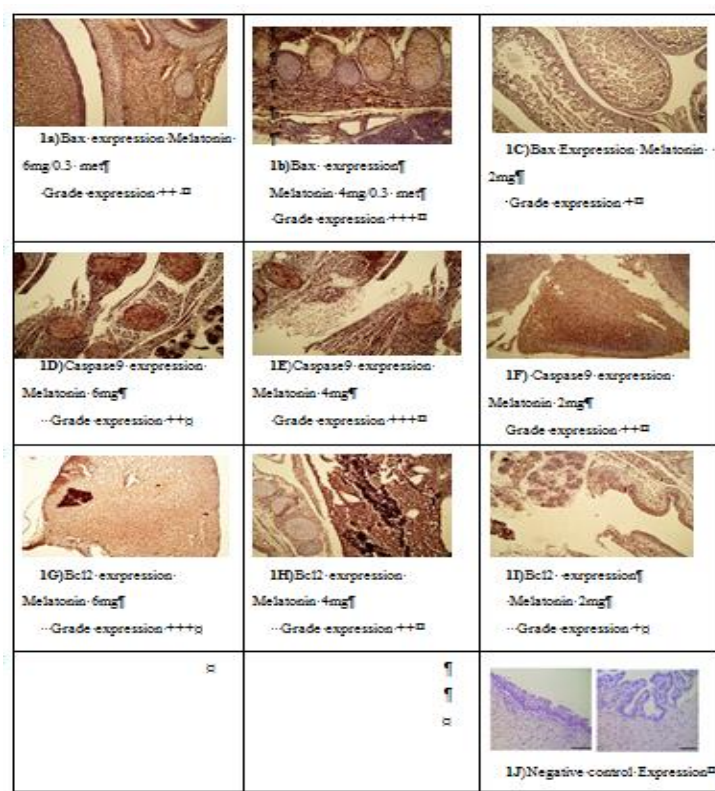
مراحل ایمونوهیستوشیمی به شرح ذیل است:

- دپارافینه شدن اسلایدها توسط گزیلول (غوطه ور کردن سبدها به مدت ۲ دقیقه در گزیلول)
- هیدراته شدن اسلایدها با درجات کاهش الکی (۲ دقیقه به ترتیب در الکل ۵۰، ۷۰، ۹۰، ۱۰۰٪ بافر)
- آشکارسازی آنتی‌ژن: برای این منظور اسلایدها با سیترات بافر (pH 6, 10 mM) انکوبه شده و دوبار در آن میکروویو ۷۵۰ وات به صورت غوطه ور در بافر سیترات حرارت داده شدند (هر بار به مدت ۳ تا ۴ دقیقه)
- بلوک کردن جایگاه‌های آزاد پروتئینی و پراکسیداز اندوژن: برای این منظور اسلایدها پس از شستشو با بافر PBS 1x در محلول حاوی ۱ درصد BSA برای بلوک کردن پروتئین‌های غیر اختصاصی به مدت ۵/۰ تا یک ساعت انکوبه شدند و سپس با ۲ H2O2 برای بلوک کردن پراکسیداز اندوژن به مدت ۵/۰ تا یک ساعت انکوبه شدند.

- برای انکوباسیون آنتی‌بادی‌ها، ابتدا اسلایدها با آنتی‌بادی اولیه (Primary anti Bax or Bcl2 or Caspase9) در رقت ۱/۲۵۰ به مدت ۲۴ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد (در اتاقک مرطوب) انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون اسلایدها به وسیله آنتی‌بادی اولیه، در بافر PBST یک مولار سه بار شستشو شده و سپس با آنتی‌بادی ثانویه (Donkey antigoat IgG HRP conjugate) در رقت ۱/۳۰۰ به مدت یک ساعت در اتاقک مرطوب و در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. سپس، پس از شستشوی اسلایدها در بافر PBST، با سمپلر، محلول حاوی (H2O2+DAB) ۱٪ به میزانی که سطح بافت را فراگیرد به اسلایدها برای ۱۰ دقیقه اضافه گردید. پس از شستشو اسلایدها، نهایتاً بافت‌ها با همتوکسیلین رنگ آمیزی شده و با درجات الکی فزاینده (به ترتیب: ۵۰، ۷۰، ۹۰، ۱۰۰٪ آبگیری و توسط گزیلول شفاف سازی شدند. و به وسیله لامل سطح لام‌ها چسبانیده شد و توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰ و

تفاوت بیان Caspase9 بین غلظت ۶ و ۴ mg/kg به سطح معنی‌داری خیلی نزدیک است $P=0.143$ ، اما معنی‌دار نیست $P<0.05$. در کل نتایج آزمایشات ایمنو‌هیستوشیمی اگرچه از لحاظ آماری معنی‌دار نبوده ولی به‌طور تقریبی بهترین تاثیر ملاتونین در دوز 6 mg/kg در کاهش بیان پروتئین آپوپتوتیک Caspase9 و افزایش بیان پروتئین آنتی آپوپتوتیک Bcl2 بوده است. هم‌چنین شکل‌های ۲ تا ۴ نشان می‌دهند که کاهش بیان پروتئین‌های آپوپتوتیک BAX، Caspase9 و افزایش بیان آنتی آپوپتوتیک Bcl2 به‌خصوص در غلظت‌های ۴ و ۶ mg/kg ملاتونین تا حدودی وابسته به دوز می‌باشد.

جدول ۱-۳، نتایج آزمون آماری فیشر در غلظت‌های مختلف ملاتونین و بیان پروتئین‌های مختلف (Bcl2، BAX، Caspase9)، نشان داده شده است همانطور که در جدول ۱ مشخص است ملاتونین در غلظت ۶mg/kg نسبت به غلظت ۴mg/kg و ۲ mg/kg باعث افزایش بیان Bcl2 که یک پروتئین آنتی آپوپتوز است گردیده است اگرچه این افزایش مشاهده شد اما تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نیست ($P=1$). در جدول ۲ ملاتونین تقریباً در یک روند وابسته به دوز باعث کاهش بیان پروتئین آپوپتوز BAX گردیده است به‌خصوص این تفاوت با توجه به عدد $P=0.052$ بین غلظت ۴ mg/kg و ۲ mg/kg مشهود است. اگرچه از لحاظ آماری معنی‌دار $P<0.05$ در جدول ۳



شکل ۱: نتایج ایمنو‌هیستوشیمی بیان پروتئین‌های مختلف آپوپتوز (BAX، BCL2، Caspase9) در غلظت‌های مختلف ملاتونین (2mg melatonin)، (4mg melatonin)، (6mg melatonin)

کاهش بیان BAX در دوز ۶ mg/kg ملاتونین (شکل a) نسبت به دوز ۴ mg/kg (شکل b) و افزایش بیان پروتئین آنتی آپوپتوز Bcl2 در دوز ۶ mg/kg ملاتونین (شکل G) نسبت به دوز ۴ mg/kg (شکل H) و دوز ۲ mg/kg (شکل I) و کاهش بیان پروتئین آپوپتوز Caspase9 در دوز ۶ mg/kg ملاتونین (شکل D) در برابر دوز 4mg/kg (شکل b)

جدول ۱: نتایج آزمون آماری فیشر در غلظت های مختلف ملاتونین و بیان پروتئین (Bcl2) (بین گروه های درمانی)

درجه معنی داری تست فیشر (دوجهی)	جمع تعداد لام	+++& (بیان متوسط و ضعیف پروتئین Bcl2) تعداد لام	+++ (بیان قوی پروتئین Bcl2) تعداد لام	
	۶	۵	۱	۲ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی لیتر متادون ۴ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی لیتر متادون
۱	۴	۳	۱	۴ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی لیتر متادون ۶ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی لیتر متادون
	۴	۳	۱	۲ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی لیتر متادون ۶ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی لیتر متادون
	۷	۵	۲	۲ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی لیتر متادون ۶ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی لیتر متادون
۰/۴۳	۷	۴	۳	۲ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی لیتر متادون ۶ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی لیتر متادون

آزمون فیشر $P < 0.05$: معنی دار

لازم به ذکر است در مواردی که فراوانی گروهها از ۵ کمتر باشد از آزمون فیشر استفاده می شود که یک آزمون 2×2 یا دوجهی است یعنی گروهها ۲ تا ۲ تا بررسی می شوند

جدول ۲: نتایج آزمون آماری فیشر در غلظت های مختلف ملاتونین و بیان پروتئین (BAX) (بین گروه های درمانی)

درجه معنی داری تست فیشر (دوجهی)	جمع تعداد لام	+++& (بیان متوسط و ضعیف پروتئین BAX) تعداد لام	+++ (بیان قوی پروتئین BAX) تعداد لام	
	۵	۳	۲	۲ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی لیتر متادون
۰/۵۲	۴	۱	۳	۴ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی لیتر متادون

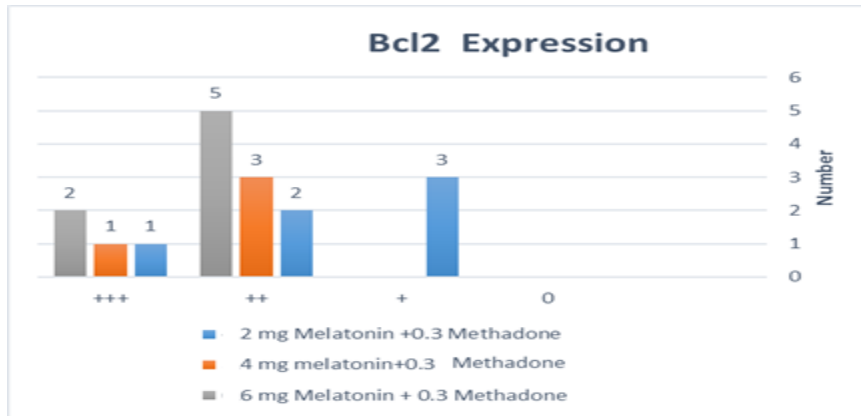
اثر محافظت جنینی ملاتونین علیه متادون

۴ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن متادون +۰/۳ میلی لیتر	۳	۱	۴
۶ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن متادون +۰/۳ میلی لیتر	۴	۲	۶
۲ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن متادون +۰/۳ میلی لیتر	۲	۳	۵
۶ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن متادون +۰/۳ میلی لیتر	۲	۲	۴

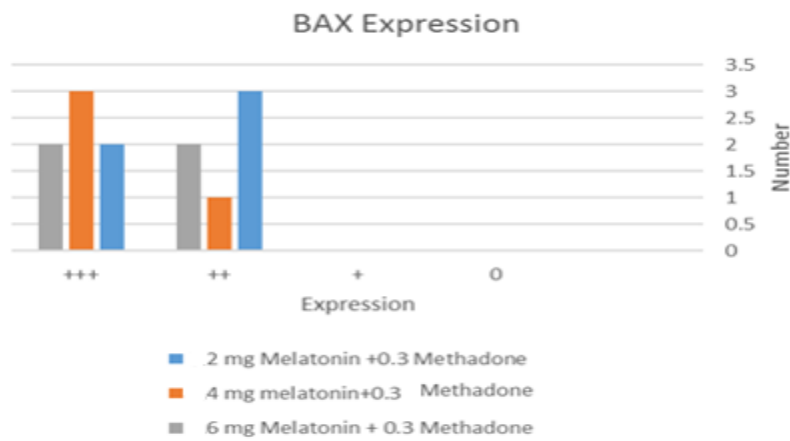
آزمون فیشر $P < 0/05$: معنی دار

جدول ۳: نتایج آزمون آماری فیشر در غلظت‌های مختلف ملاتونین و بیان پروتئین (Caspase) (بین گروه‌های درمانی)

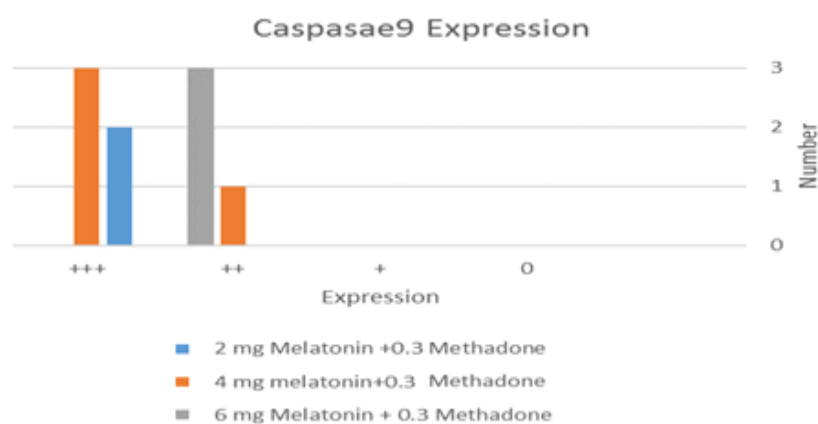
درجه معنی داری تست فیشر (دووجهی)	جمع تعداد لام	+++ (بیان قوی پروتئین Caspase) تعداد لام	++& (بیان متوسط و ضعیف پروتئین Caspase) تعداد لام	درجه معنی داری تست فیشر (دووجهی)
	۲	۰	۲	۲ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی لیتر متادون
۱	۴	۱	۳	۴ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی لیتر متادون
۰/۱۴	۴	۱	۳	۴ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی لیتر متادون
	۳	۳	۰	۶ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی لیتر متادون
۱	۲	۰	۲	۲ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی لیتر متادون
	۳	۳	۰	۶ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی لیتر متادون آزمون فیشر $P < 0/05$: معنی دار



شکل ۲: نتایج بیان Bcl2 در مقادیر مختلف ملاتونین در بافت‌های مختلف، افزایش بیان ملاتونین در غلظت ۶ mg/kg نسبت به غلظت ۴ mg/kg و ۲ mg/kg $P < 0.05$



شکل ۳: نتایج بیان BAX در مقادیر مختلف ملاتونین در بافت‌های مختلف، کاهش بیان پروتئین آپوپتوز BAX در غلظت ۴ mg/kg نسبت به ۲ mg/kg ملاتونین، $P < 0.05$



شکل ۴: نتایج بیان Caspase9 در مقادیر مختلف ملاتونین در بافت‌های مختلف، تفاوت قابل توجه بیان بین غلظت ۶ mg/kg و ۴ mg/kg اما معنی‌دار نیست $P < 0.05$

بحث

تحقیق حاضر به بررسی تاثیر پیشگیری ملاتونین در آپوپتوز ناشی از تاثیر جنینی متادون در موش سوری می پردازد و نتایج این تحقیق نشان می دهد که ملاتونین در یک روند وابسته به دوز باعث کاهش بیان پروتئین های آپوپتوز BAX و Caspase3 و افزایش بیان پروتئین آنتی آپوپتوتیوز Bcl2 می گردد. اگرچه این تاثیرات از لحاظ آزمون آماری فیشر معنی دار نبوده است ($P < 0.05$). براساس مطالعات مختلف مشخص شده که ملاتونین دارای خاصیت انکوستاتیک بر روی کانسر به خصوص کانسرهای وابسته به هورمون است (۸،۹) برخی مطالعات نشان می دهد که فعال شدن غده پینه آل یا افزایش جذب ملاتونین باعث کاهش رشد سرعت تومورهای پستانداران می گردد. در حالی که برداشتن غده پینه آل pinealectomy با کاهش تولید ملاتونین باعث تحریک تومور در پستانداران گردیده است. مشخص شده که ملاتونین باعث کاهش شیوع سرطان پستان با کاهش سنتز برخی هورمون ها که برای رشد نرمال غدد پستان لازم است می گردد. (۷،۱۰). همچنین ملاتونین توانسته اثرات مستقیم بر سلول های توموری داشته باشد (۱۱،۱۵). برخی یافته ها از مطالعات محققان در مدل های حیوانی و یا رده های سلولی کانسر پستان دلالت بر این موضوع دارد که آثار ضد سرطانی ملاتونین بر تومورهای وابسته به هورمون عمدتاً وابسته به کارایی شان از طریق مسیرهای استروژنیک است (۱۲ و ۱۳) عمدتاً، آثار ملاتونین بر سلول های کانسری نه تنها به وسیله مکانیسم های وابسته به اتصالشان به رسپتور به اثبات رسیده (در غشا یا هسته)، بلکه از طریق غیر وابسته به رسپتور از طریق اتصال به کالمودولین و یا آثار آنتی اکسیدانسی می تواند بوجود آید (۱۶،۱۷). شواهدی در رابطه با فعالیت ملاتونین در غشاء معدی روده ای نشان داده شده است. بطوریکه آن ها ثابت کرده اند که ملاتونین می تواند باعث کاهش انقباض خویه خود روده ها گردد (۱۸ و ۱۹). اخیراً مشخص شده است که ملاتونین نه تنها در غشاء گوارشی وجود دارد بلکه برخی یافته ها دلالت بر این موضوع دارند که این

ماده به طور موضعی به وسیله دو آنزیم AANAT و HIOMT تولید می شود که این آنزیم ها در غشاء اپیتلیال رودی بیان می شوند. همچنین نشان داده شده است که غلظت ملاتونین در روده ۱۰۰-۱۰ بار بیشتر از سرم است (۱۸،۱۹) ملاتونین هم چنین می تواند تحریک ترشح بی کربنات موکوسی را با تحریک رهاسازی کلسیم در سلول های انتروکرومافین رودی را سبب شود (۱۹) ملاتونین از این طریق هم چنین می تواند بیان $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ، $\text{TNF-}\alpha$ ، $\text{IL-1}\beta$ و STAT3 را کنترل کند. ملاتونین هم چنین از طرق دیگر می تواند سیستم لنفوسیت و منوسیت/ ماکروفاژ را فعال کرده که از این طریق می تواند به عنوان یک عامل کنترلی ایمنی Immunosurveillant. برای پیشگیری از پیشرفت تومور عمل کند (۲۰). در مطالعه ای جدید در بیماری کبد چرب غیر الکل تاثیر ملاتونین در مسیر اپوپتوز-signal (ASK1) regulating kinase بررسی شد و هم چنین نشان داده شد با اینکه ملاتونین باعث تغییری در جذب غذا نمی شود اما به طور علامتی باعث تسکین علائم کبد چرب همچون افزایش وزن و حساسیت به انسولین و تجمع چربی کبدی می شود (۲۱) در یک مطالعه هیستولوژیک به وسیله رژیم ترکیبی متفورمین و ملاتونین در مقابل آسیب ناشی از تشعشع رادیواکتیو در ایلئوم و کولون مشخص شد که ملاتونین باعث حفاظت قابل توجه در ایلئوم گردیده و ترکیب متفورمین و ایلئوم اثر محافظتی بیشتر در کولون دارد (۲۲) در مطالعه ای جدید در خصوص اثرات محافظتی جنینی ملاتونین در موش صحرایی نر F1 در برابر آلودگی محیطی بیس فنول A bisphenol A (BPA) (مشخص شد که ملاتونین از آسیب عملکرد تولید مثلی در نوزادان نر در مادرانی که در معرض این آلودگی قرار گرفته بودند جلوگیری کرده و باعث کاهش پارامترهای استرس اکسیداتیو و جلوگیری از کاهش تستسترون در جنین موش و نقصان عملکرد اسپرم می گردد که از طریق عملکرد مستقیم آنتی اکسیدانت و مهار نکرز بافتی این عملکرد محافظتی انجام می گردد (۲۳). در مطالعه اخیر توسط Eunsoo Won و همکاران پیشنهاد شده است

نتیجه‌گیری

در کل می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از ملاتونین در زنان باردار که در دوران ترک اعتیاد می‌باشد احتمالاً بتواند به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی و یک جاروب کننده رادیکال‌های آزاد و یک ترکیب آنتی آپوپتوز تا حدودی از تاثیرات آپوپتوز متادون در جنین جلوگیری نماید اگر چه طبق این مطالعه این تاثیرات معنی‌دار نبوده و نیاز به بررسی دقیق‌تر تاثیر حفاظتی ملاتونین در جنین و بیان ژن‌های التهابی مانند NFkB، TNF α و COX می‌باشد هم‌چنین نیاز به بررسی اثرات آنتی ترانژنسیسته ملاتونین در برابر متادون و دیگر ترکیبات اپیوئیدی و بررسی دقیق سطح خونی متادون و ملاتونین در جنین می‌باشد.

حامی مالی: معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران
تعارض در منافع: وجود ندارد.

که ملاتونین به عنوان یک داروی با پتانسیل بالای محافظت سلولی و عصبی بوده و نشان داده که باعث تحریک تمام مراحل نوروپلاستیستی در مدل‌های حیوانی می‌گردد (۲۴). توانایی ملاتونین در مهار پاسخ‌های التهابی از طریق عملکرد ایمونولوژیک و غیر ایمونولوژیک می‌تواند فرایندهای التهابی و سمیت عصبی را تحت تاثیر قرار دهد، از طرفی تغییرات در نواحی از مغز که در افسردگی دخیلند می‌تواند توصیف‌گر خواص ضد افسردگی ملاتونین باشد (۲۴). مطالعه ما همسو با مطالعه Olukole SG (۲۳) و Eunsoo Won (۲۴) نشان داده که ملاتونین تا حدودی اثرات محافظتی در بافت‌های جنینی داشته و تا حدودی باعث کاهش شاخص‌های آپوپتوز گردیده است و مطالعه ناهمسویی مشاهده نشده است. اگرچه در این تحقیق، کاهش بیان پروتئین آپوپتوز و افزایش بیان پروتئین آنتی آپوپتوز در بافت‌های جنینی تحت تاثیر متادون مشاهده گردیده اما این تاثیرات معنی‌دار نبوده و نیاز به مطالعات دقیق‌تر با حجم نمونه بیشتر بر روی این ژن‌ها و پروتئین‌ها و دیگر مارکرها می‌باشد.

References:

- 1-Farmani F, Farhadi H, Mohammadi Y. *Associated Factors of Maintenance in Patients under Treatment with Methadone: A Comprehensive Systematic Review and Meta-Analysis*. Addict Health 2018; 10: 41-51.
- 2-Talka R, Salminen O, Tuominen RK. *Methadone is a Non-Competitive Antagonist at the A4 β 2 and A3* Nicotinic Acetylcholine Receptors and an Agonist at the A7 Nicotinic Acetylcholine Receptor*. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2015; 116(4): 321-8.
- 3-Nanovskaya TN1, Nekhayeva IA, Hankins GD, Ahmed MS. *Transfer of Methadone across the Dually Perfused Preterm Human Placental Lobule*. Am J Obstet Gynecol 2008; 198: 126.e1-4.
- 4-Naghbi S, Maleki MJ, Ostovan Z. *The Effect of Melatonin Supplementation on Cardiac Function after Exhaustive Exercise in Elderly*. Sport Physiology 2018; 10: 35-48
- 5-Slominski R, Reiter R, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom A R, Slominski A. *Melatonin Membrane Receptors in Peripheral Tissues: Distribution and Functions*. Mol Cell Endocrinol 2012; 351(2): 152-56.
- 6-Mehraii F, Negahdar F. *Morphological Changes in Acriminal Glands and Ocular Epithelial after*

- Melatonin Injection.** Iranian Journal of Anatomical Sciences 2011; 34(9): 58-62. [Persian]
- 7-Miller SC, Pandi-Perumal SR, Esquifino AI, Cardinali DP, Maestroni GJ. *The Role of Melatonin in Immuno-Enhancement: Potential Application in Cancer.* Int J Exp Pathol 2006; 87(2): 81-7
- 8-Slominski R, Reiter R, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom A R, Slominski A. *Melatonin Membrane Receptors in Peripheral Tissues: Distribution and Functions.* Molecular and Cellular Endocrinology 2012; 351(2): 153-56.
- 9-Claustrat B, Leston J. *Melatonin: Physiological Effects in Humans.* Neurochirurgie 2015; 61(2-3): 77-84.
- 10-Oishi A, Gbahou F, Jockers R. *Melatonin Receptors, Brain Functions, and Therapies.* Handb Clin Neurol 2021; 179: 345-56.
- 11-Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Tan DX, Acuna-Castroviejo D, Qin L, Yang SF, Xu K. *Melatonin, A Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis.* Int J Mol Sci 2017; 18(4): 843.
- 12-González-González A, Mediavilla MD, Sánchez-Barceló EJ. *Melatonin: A Molecule for Reducing Breast Cancer Risk.* Molecules 2018; 23(2): 336.
- 13-Blask DE, Hill SM, Dauchy RT, Xiang S, Yuan L, Duplessis T, et al. *Circadian Regulation of Molecular, Dietary, and Metabolic Signaling Mechanisms of Human Breast Cancer Growth by the Nocturnal Melatonin Signal and the Consequences of Its Disruption by Light at Night.* J Pineal Res 2011; 51(3): 259-69.
- 14-Sanchez-Barcelo EJ, Cos S, Fernandez R. *Melatonin and Mammary Cancer: A Short Review.* Endocr Relat Cancer 2003; 10(2): 153-59.
- 15-Sanchez-Barcelo EJ, Cos S, Mediavilla MD, Martinez-Campa C, Gonzalez A, Alonso-Gonzalez C. *Melatonin-Estrogen Interactions in Breast Cancer.* J Pineal Res 2005; 38: 217-22.
- 16-Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, et al. *Pineal Gland Hormone melatonin Binds and Activates an Orphan of the Nuclear Receptor Superfamily.* J Biol Chem 1994; 269(46): 28531-34.
- 17-Wang X, Docanto MM, Sasano H, Lo C, Simpson ER, Brown KA. *Prostaglandin E2 Inhibits P53 in Human Breast Adipose Stromal Cells: A Novel Mechanism for the Regulation of Aromatase in Obesity and Breast Cancer.* Cancer Res 2015; 75(4): 645-55.
- 18-Quastel MR, Rahamimoff R. *Effect of Melatonin on Spontaneous Contractions and Response to 5-Hydroxytryptamine of Rat Isolated Duodenum.* Br J Pharmacol. Chemother 1995; 24(2): 455-61.
- 19-Sjoblom M, Safsten B, Flemstrom G. *Melatonin-Induced Calcium Signaling in Clusters of Human and Rat Duodenal Enterocytes.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2003; 284(6): G1034-G44.
- 20-Chen CQ, Fichna J, Bashashati M, Li YY, Storr M. *Distribution, Function and Physiological Role of Melatonin in the Lower Gut.* World J Gastroenterol 2011; 17(34): 3888-98.
- 21-Li DJ, Tong J, Li YH, Meng HB, Ji QX, Zhang GY, et al. *Melatonin Safeguards Against Fatty Liver by Antagonizing TGF- β -Mediated ASK1 Ubiquitination and Stabilization in a B-Arrestin-1*

- Dependent Manner*. J Pineal Res 2019; 67(4): e12611.
- 22-Najafi M, Cheki M, Hassanzadeh G, Amini P, Shabeeb D, Elejo Musa A. *Protection from Radiation-Induced Damage in Rat's Ileum and Colon by Combined Regimens of Melatonin and Metformin: A Histopathological Study*. Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem 2019; 19(2): 180-9.
- 23-Olukole SG, Lanipekun DO, Ola-Davies EO, Oke BO. *Maternal Exposure to Environmentally Relevant Doses of Bisphenol a Causes Reproductive Dysfunction in F1 Adult Male Rats: Protective Role of Melatonin*. Environ Sci Pollut Res Int 2019; 26: 28940-950.
- 24-Eunsoo W, Kyoung S Na, Yong-Ku K. *Associations between Melatonin, Neuroinflammation, and Brain Alterations in Depression*. Int J Mol Sci 2022; 23(1): 305.

Evaluation of Embryonal Protective Effect of Melatonin against Apoptotic Effect of Methadone in Embryo Tissues of Mice

Maryam Akbarzadeh¹, Farkhondeh Nemati^{*1}, Fatemeh Shaki²,
Abbas Ali Dehpouri Gouibari¹, Ramin Ataee^{†2,3}

Original Article

Introduction: Methadone is a substance that is widely used in the substitution treatment of opiate addiction. This study aimed to evaluate the protective effects of melatonin on apoptosis induced by transfer of transplacental methadone in mice.

Methods: This study was an experimental study aimed to assay apoptotic effect of placenta transferred methadone on brain, liver and kidney tissues and to study protective effect of melatonin in an embryo model in mice. Bulb-C mice weighing 25-30 g were kept in four shelves (3 females and one male) and checked daily for the sterile cycle. For mice with vaginal plugs, the first day of pregnancy was considered. After confirmation of pregnancy, female mice were divided into 5 groups of 6, which included the control group, methadone (10 mg / kg) and melatonin groups in three doses (2, 4, 6 mg / kg / day) by IP injection for half an hour before prescribing methadone. This prescription was given for 10 days from the beginning of pregnancy. After the infants were born, their liver, brain, and kidneys were removed and they underwent immunohistochemical tests for apoptotic expression of Bcl2, BAX, and Caspase3 proteins. The results were analyzed by SPSS version 22 statistical software and Chi-square (Chi 2) and Fisher tests (P <0.01).

Results: This study showed that melatonin at dose 4 and 6mg/kg has decreased apoptotic protein BAX and Caspase9 and increased anti-apoptotic protein, Bcl2 expression approximately, but these results were not significant statistically (P>0.05). In addition, for dose of 0.2 mg/kg of melatonin, there was not any apoptotic effect.

Conclusion: Our findings showed that melatonin has almost a protective effect against apoptotic effect induced by placental transfer of methadone especially via its increasing effects on Bcl2, but this anti-apoptotic effect was not significant and needed for more precise studies.

Keywords: Methadone, Addiction, Pregnancy, Placental transfer, Apoptosis, Melatonin, Apoptotic proteins, BAX, Caspase 9, Bcl2.

Citation: Akbarzadeh M, Nemati F, Shaki F, Dehpouri Gouibari AA, Ataee R. **Evaluation of Embryonal Protective Effect of Melatonin against Apoptotic Effect of Methadone in Embryo Tissues of Mice.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2022; 30(4): 4706-18.

¹Biology Department, Faculty of Basic Sciences, Azad University, Qemshahr Branch, Qaemshahr, Iran.

²Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

^{2,3}Thalassemia Research Center, Hemoglobinopathy Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

*Corresponding author: Tel: 0911 314 0559, email: farkhondehnemati@gmail.com. raminataee1349@gmail.com