● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ دوازدهم، شمارهٔ ۳، ص ۱۸۰-۱۷۴، ۱۳۸۴

مقالهٔ پژوهشی

# اثر وابستگی به مرفین بر روند فولیکول‌زایی تخمدان موش سوری پس از تحریک تخمک‌گذاری

دکتر سید نورالدین نعمت‌اللهی ماهانی*[۱]، سارا امینی[۲]، دکتر محمدعلی امامی‌میبدی[۳]، دکتر فاطمه نبی‌پور[٤] و دکتر سیدحسن افتخارواقفی[٥]

**خلاصه**

**مقدمه:** مواد افیونی با اثر بر ترشح هورمون آزادکننده گونادوتروپین (GnRH) و محور هیپوتالاموس- هیپوفیز - تخمدان می‌توانند بر عملکرد دستگاه تولید مثل اثر بگذارند.

**هدف:** پژوهش حاضر به منظور بررسی اثرات وابستگی به مرفین در فولیکول‌زایی تخمدان به دنبال تحریک تخمک‌گذاری با هورمون محرک تخمدان (PMSG) از طریق مطالعات مورفولوژیک و مورفومتریک انجام شده است.

**روش:** در این مطالعه از ۲۰ موش آزمایشگاهی نژاد NMRI استفاده شد که در مرحله نهایی در دو گروه ۶ تایی شاهد و تیمار بررسی شدند. مرفین خوراکی از طریق آب آشامیدنی به مدت ۲۱ روز در اختیار حیوانات قرار داده شد. پس از تأیید اعتیاد به کمک نالوکسان، با تزریق داخل صفاقی ۱۰ واحد PMSG، تخمک‌گذاری تحریک شد و بعد از ۴۸ ساعت موش‌ها کشته شدند. تخمدان‌ها از بدن حیوانات جدا و از بافت‌های اطراف پاکسازی شدند. تخمدان‌های هر موش جداگانه توزین و سپس فیکس شدند. پس از آماده‌سازی بافتی، برش‌های سریال ۵ میکرونی از تخمدان‌ها تهیه و به روش هماتوکسیلین وائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. ده درصد برش‌ها به‌طور غیرتصادفی انتخاب و توسط میکروسکوپ، تعداد فولیکول‌های کوچک، در حال رشد، آنترال و فولیکول‌های در حال تحلیل شمارش شدند. همچنین قطر فولیکول‌های آنترال و تخمک آنها اندازه‌گیری و حجم تخمدان نیز به روش cavalieri محاسبه شد.

**یافته‌ها:** حجم و وزن تخمدان در دو گروه تغییر معنی‌داری نداشت. در حالی که درصد فولیکول‌های کوچک و فولیکول‌های آترتیک در گروه تیمار نسبت به شاهد به طور معنی‌داری اختلاف داشت ($P<0/001$).

**نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج به دست آمده می‌توان گفت مرفین خوراکی موجب افزایش غیر معنی‌دار اندازه تخمدان و تغییر در نسبت انواع فولیکول‌های تخمدان گردیده است ولی به نظر می‌رسد با توجه به عدم افزایش درصد فولیکول‌های آترتیک گروه تیمار تغییرات ساختاری غیرقابل برگشتی در تخمدان‌ها رخ نداده است.

**واژه‌های کلیدی:** وابستگی به مرفین، تخمدان، فولیکول‌زایی، موش، ریخت‌شناسی

۱- استادیار گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان، ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم تشریح، ۳- دانشیار گروه علوم تشریح، ٤- استادیار گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی ٥- استادیار گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی –درمانی کرمان

* **نویسنده مسؤول:** کرمان ـ دانشکده پزشکی افضلی‌پور، گروه علوم تشریحی ● **آدرس پست الکترونیک:** nnematollahi@kmu.ac.ir

**دریافت مقاله:** ۱۳۸٤/۲/۱۸ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۸٤/۸/۱۱ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۴/۸/۲۰

**مقدمه**

استعمال داروهای مخدر در جوامع بشری متأسفانه در حال گسترش بوده و بیشترین استعمال آن در افراد سنین باروری است که دارای زندگی مشترک می‌باشند (۳ و ۲). تحقیقات نشان داده که بیشتر مواد افیونی با کاهش تحریک فیزیکی، کاهش توانایی رسیدن به ارگاسم و میل جنسی، انزال‌های زودرس و...، اثر منفی بر رفتار جنسی گذاشته که این امر می‌تواند نظام خانواده را به مخاطره بیاندازد (۱۰).

اپیوئیدها سرکوب‌کننده سیستم عصبی مرکزی هستند که می‌توانند سبب تسکین درد و آرامش شوند. همین خواص اپیوئیدها عامل مهم روی آوردن به آنها می‌باشد. اپیوئیدها بر روی طیفی از نوروترانسمیترهای مغز از جمله اندورفین‌ها (مواد شبه‌مرفینی که به‌طور طبیعی در بدن تولید می‌شوند) عمل می‌کنند (۱۶). اپیوئیدها با دور کردن گردش خون از ناحیه تناسلی باعث سوءعملکرد دستگاه تناسلی می‌شوند (۱۰). مرفین و اپیوئیدهای درون‌زا احتمالاً از طریق نوروترانسمیترهای هیپوتالاموسی بر رهاشدن هورمون‌های هیپوتالاموسی به داخل عروق پورت هیپوفیزی اثر می‌گذارند. همچنین ممکن است از طریق کاهش متابولیسم دوپامین و افزایش متابولیسم سروتونین در هیپوتالاموس، عملاً همه اثراتشان را بر ترشح هورمون‌های هیپوفیزی اعمال کنند (۱۸).

در برخی مطالعات، مصرف مرفین در موش صحرایی در دوران بارداری موجب به تعویق افتادن بلوغ جنسی در نوزادان ماده متولد شده از این موش‌ها گردیده و از طرف دیگر سبب قطع سیکل تخمدانی در ۵۰٪ موش‌های ماده شده است. به تعویق افتادن فعالیت تولید مثلی در فرزندان به علت تأثیر مرفین بر تکامل مکانیسم‌های نورآدرنرژیکی در مغز آنان بوده است (۲۲،۲۵). از سویی مرفین به شدت شانس بارداری را در موش‌های سوری‌نژاد balb/c کاهش داده است (۱). همچنین تجویز دوز بالای اپیوئیدها به موش‌های صحرایی ماده موجب قطع تخمک‌گذاری آنان شده است (۱۹). در میمون تجویز کوکائین منجر به اختلال در ضرباهنگ ترشح گونادوتروپین‌ها و اختلال رشد فولیکول‌های تخمدان شده است (۸). از سویی در خزندگان تجویز مواد شبه مرفین (بتا - اندورفین) باعث اختلال در سیکل جنسی شده، لیکن شدت این اختلال با تجویز FSH کاهش یافته است (۱۲).

در انسان نیز سوء مصرف مواد افیونی به تغییر و اختلال در روند اسپرماتوژنز در مردان و تخمک‌گذاری در زنان منجر شده است. اما این که آیا این اختلال فیزیولوژیک با اختلال ساختاری تخمدان همراه می‌باشد و این که در صورت تجویز هورمون‌های محرک فولیکول‌زایی، بافت تخمدان چه پاسخی خواهد داد تاکنون بررسی نشده است. لذا در مطالعه حاضر تلاش شده است تأثیر مصرف طولانی مدت مرفین بر روند فولیکول زایی تخمدان موش آزمایشگاهی نژادNMRI پس از تحریک تخمدان به کمک هورمون PMSG بررسی شود.

**روش بررسی**

**حیوانات**: تعداد ۲۰ سر موش ماده نژاد NMRI با سن ۲۱ روز و وزن تقریبی ۱۵-۱۲ گرم مورد استفاده قرار گرفت .شرایط نگهداری موش‌ها به صورت شبانه‌روزی (۱۲ ساعت روز- ۱۲ساعت شب) بود. غذا و آب کافی در دسترس حیوانات قرار داشت. دمای محیط ۲۵-۲۱ درجه سانتی‌گراد و رطوبت به میزان مناسب وجود داشت. پس از سه هفته، موش‌ها مجدداً با ترازوی حساس ۰/۰۱ گرم توزین و آنهایی که در محدوده وزنی ۲۵-۲۱ گرم بودند انتخاب و به صورت تصادفی به دو گروه شاهد و تیمار تقسیم شدند.

**داروها**: در پژوهش حاضر از پودر سولفات مرفین (تماد - ایران)، نالوکسان، PMSG، (INTERVET) و قرص بافر فسفات PBS (سیگما) استفاده شد.

**روش القاء وابستگی به مرفین**: برای این منظور در ۴۸ ساعت اول به ازای هر میلی‌لیتر آب آشامیدنی ۰/۱ mg پودر سولفات مرفین همراه با کمی ساکاروز (جهت رفع تلخی) در اختیار موش‌ها قرار گرفت. در روزهای بعد ساکارز حذف و هر ۴۸ ساعت ۰/۱ mg/ml مرفین به غلظت قبلی آب افزوده شد تا به غلظت نهایی ۰/۴ mg/ml رسید و همین غلظت تا آخر دوره (۲۱ روز) ثابت نگهداشته شد (۱).

**روش تعیین اعتیاد**: از تجویز داخل صفاقی نالوکسان به میزان ۲ میلی‌گرم/کیلوگرم استفاده شد. بدین صورت که یک سوم موش‌ها در دو گروه (۳ موش در هر گروه) به طور تصادفی انتخاب و پس از تزریق داخل صفاقی نالوکسان، به مدت ۴۵ دقیقه جهت بررسی علائم سندرم ترک از قبیل اسهال، بی‌قراری، پرش‌های عضلانی و ...کنترل گردیدند. پس از تأیید وابستگی موش‌های مورد آزمایش و تعمیم آن به موش‌های هم گروه، ۶ موش در هر گروه (۱۳،۲۱) جهت ادامه آزمایشات استفاده شدند.

**روش تحریک تخمک‌گذاری:** برای هم سیکل شدن موش‌های مورد آزمایش، از روش موسوم به Whitten effect استفاده شد (۹). بدین ترتیب که موش‌های هر دو گروه شانزده روز پس از شروع مصرف مرفین به طور جداگانه در قفس‌هایی که توسط تور سیمی به دو قسمت شده بود قرار داده شدند و در سمت دیگر تور سیمی موش‌های نر قرار گرفتند. پس از پنج روز که سن موش‌ها به شش هفته رسیده بود (موش‌های ماده در ۵ تا ۶ هفتگی بالغ می‌شوند)، هر دو گروه با تزریق داخل صفاقی ۱۰ واحد PMSG تحریک تخمک‌گذاری و ۴۸ ساعت بعد با جابه‌جایی گردن کشته شدند.

**اندازه‌گیری وزن:** تخمدان از بدن حیوان جدا و در پلیت حاوی PBS قرار گرفت و زیر میکروسکوپ استریو(zeiss) چربی‌ها و بافت هم‌بند همراه تخمدان پاکسازی شد و باکمک کاغذ صافی تخمدان هر موش خشک و با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱میلی‌گرم توزین و در محلول فیکساتیو - بوئن قرار گرفت.

**روش آماده‌سازی بافت:** جهت شمارش تعداد فولیکول‌های تخمدان، ابتدا تخمدان‌ها به مدت یک هفته در محلول فیکساتیو بوئن نگهداری شدند. پس از انجام مراحل پاساژ بافتی رایج، توسط میکروتوم برش‌های ۵ میکرونی از آنها تهیه و به صورت سریال بر روی لام چسبانده و به روش هماتوکسیلین وائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند (۴).

**انتخاب برش‌های تخمدان:** بدین منظور از ۱۰٪ غیرتصادفی برش‌های سریال استفاده شد (۷). به طور خلاصه، از اولین برشی که فولیکول ها قابل رؤیت بودند (سومین - چهارمین) شمارش به تفکیک نوع فولیکول ها انجام و تعداد آنها ثبت شد سپس دهمین برش بعد از آن (سیزدهمین- چهاردهمین) انتخاب و مجدداً شمارش انجام و این کار تا شمارش آخرین دهمین برش تخمدان ادامه یافت و اعداد به دست آمده جمع گردید و بدین ترتیب ۱۰ درصد غیرتصادفی کل برش‌ها شمارش گردید. همچنین قطر فولیکول‌های آنترال و تخمک درون آنها توسط اوکولومتر از قبل تنظیم شده اندازه‌گیری شد.

**ویژگی‌های افتراقی فولیکول‌های تخمدان:** در این پژوهش فولیکول‌ها به چهار دسته به شرح زیر تقسیم شدند:

فولیکول کوچک (small follicle) شامل تخمک احاطه شده توسط یک لایه از سلول‌های گرانولوزا بود. فولیکول در حال رشد (growing follicle) شامل تخمک احاطه شده توسط چندین لایه متراکم از سلول‌های گرانولوزا بود. فولیکول حفره‌دار (antral follicle) شامل تخمک مرکزی محصور شده با فضای پر از مایع که توسط چندین لایه سلول‌های گرانولوزا احاطه شده بود و فولیکول در حال تحلیل (atretic follicle) فولیکولی با تخمک پیگمانته، قطعه‌قطعه شدن تخمک، ریزش سلول‌های گرانولوزا به داخل مایع آنترال، پاره شدن غشاء سیتوپلاسمی و به هم ریختگی آرایش سلول‌های گرانولوزا بود. همچنین قطر فولیکول ها از حاشیه بیرونی سلول‌های گرانولوزا (تکا داخلی) و قطر تخمک از حاشیه بیرونی منطقه شفاف با کمک اکولومتر کالیبر شده و عدسی شیئی (با بزرگ‌نمایی ۴ برابر) اندازه‌گیری شد.

**روش اندازه‌گیری حجم:** حجم تخمدان به روش کاوالیری (cavalieri) به‌دست آمد. بدین طریق که اولین یا دومین برش سالم با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به drawing tube مشاهده و تصویرآن بر روی کاغذ شطرنجی رسم می‌شد. سپس دهمین برش بعد از آن نیز رسم شد و این رویه تا اتمام آخرین دهمین برش سریال ادامه یافت. بدین ترتیب ۱۰٪ کل برش‌های یک تخمدان رسم شد. سپس مساحت تک‌تک اشکال (a) محاسبه و با هم جمع شد (∑a). با توجه به بزرگ‌نمایی عدسی شیئی (۴ x) وعدسی چشمی (۱۰ x) و drawing tube (۱/۵x) مساحت واقعی (A) محاسبه و حجم (v) به دست آمد. همچنین با توجه به اینکه فرمالین موجود در محلول بوئن موجب کاهش ۳۳٪ از آب بافتی می‌گردد، لذا حجم واقعی (V) نیز به دست آمد. در انجام محاسبات از فرمول‌های زیر استفاده شد:

$\sum a = a_1+a_2+a_3+a_4+\dots$

$d=4\times 10\times 1/5=60$

$A=\sum a\backslash d^2$

$v=A\times h\times 10$ h=ضخامت برش=۰/۰۰۵ mm

$V=v+(v\times 0/33)$

جهت آنالیز آماری از ویرایش یازدهم نرم‌افزار SPSS استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین± انحراف معیار گزارش گردید و تجزیه وتحلیل آماری حجم، وزن، قطر تخمک و قطر فولیکول با t-test و برای شاخص درصد تعداد فولیکول‌های مختلف از روش chi-square استفاده شد. حد معنی‌داری آزمون‌ها P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

## نتایج

میانگین حجم تخمدان در گروه شاهد ۵/۷±۰/۹۶ میکرولیتر و در گروه تیمار۶/۷۲±۱/۳۷ میکرولیتر بود که اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. میانگین وزن تخمدان در گروه شاهد

۷/۵±۱/۱ میلی‌گرم و در گروه تیمار ۹/۲±۲/۱ میلی‌گرم بود که اختلاف آنها نیز معنی‌دار نبود. در مجموع ۱۵۰۲ فولیکول در گروه شاهد و ۱۸۳۰ فولیکول در گروه تیمار شمرده شد (اطلاعات مربوط به فولیکول ها در جدول ۱ آمده است). میانگین درصد فولیکول‌های کوچک در گروه شاهد ۵/۵±۱۷ بود که از نظر آماری با گروه تیمار ۸/۳ ±۲۲/۷ اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۰۱).

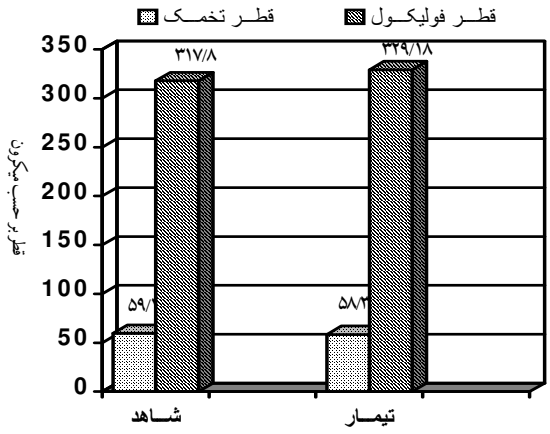
از سویی میانگین درصد فولیکول‌های آنترال در گروه شاهد ۳/۷±۷/۰ و در گروه تیمار ۲/۴±۸/۵ بود که این اختلاف معنی‌دار نبود. همچنین میانگین درصد فولیکول‌های در حال تحلیل در گروه شاهد ۸/۴۴±۳۷ و در گروه تیمار ۱۱/۱۴±۳۱/۸ بود که اختلاف‌شان معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱). تعداد ۱۰۶ فولیکول آنترال در گروه شاهد و ۱۵۵ فولیکول آنترال در گروه تیمار اندازه‌گیری شد. میانگین قطر فولیکول‌های آنترال و میانگین قطر تخمک درون فولیکول‌های آنترال در گروه شاهد با گروه تیمار نیز معنی‌دار نبود ( نمودار ۱).

**جدول ۱:** *پراکندگی فولیکول‌های تخمدان در گروه شاهد و تیمار*

| نوع فولیکول / گروه | تعداد فولیکول (٪) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | کوچک | در حال رشد | آنترال | آترتیک | جمع |
| **شاهد** | ۲۵۶ (۱۷)* | ۵۸۱(۳۸/۶) | ۱۰۶ (۷) | ۵۶۳(۳۷/۵) | ۱۵۰۶(۱۰۰) |
| **تیمار** | ٤١٥(۲۲/۷) | ٦٧٧(۳۷) | ۱۵۵(۸/۵) | ۵۸۲(۳۱/۸)* | ۱۸۳۰(۱۰۰) |

اطلاعات از ٦ آزمایش جداگانه جمع‌آوری شده است.

*: P<۰/۰۰۱




**نمودار ۱:** *مقایسه میانگین قطر فولیکول‌های آنترال و تخمک آنها بر* حسب میکرون

## بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر تغییر معنی‌داری در حجم و وزن تخمدان گروه تیمار نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد. ولی به هر حال وزن و حجم تخمدان گروه تیمار بیشتر از گروه شاهد بود که این امر با توجه به تعداد بیشتر فولیکول‌ها در گروه تیمار (۱۸۳۰) نسبت به شاهد (۱۵۰۶) دور از انتظار نیست. از آنجا که تعداد فولیکول ها در هر تخمدان در بدو تولد مشخص می‌شود و پس از تولد تغییر نمی‌کند [البته گزارش Johnson's در سال ۲۰۰۴ حاکی از قابلیت تخمدان در تولید تخمک‌های جدید است (۱۵)]، امکان تغییر در تعداد فولیکول‌های گروه تیمار متعاقب دریافت مرفین به احتمال قوی مردود است و این تفاوت را نباید به مصرف مرفین مربوط دانست.

تخمدان یک عضو وابسته به هورمون است و علاوه بر هورمون‌های FSH و LH بتااندورفین‌ها نیز بر آن تأثیر می‌گذارند (۲۰). مصرف مرفین در مادران باعث اختلال در تولید اسپرم نوزادان نر (۲۵) و سیکل‌های جنسی نوزادان ماده شده است (۱۱). دیده شده که میزان بتااندورفین در مایع فولیکولی فولیکول‌های کوچک خوک چندین برابر فولیکول‌های متوسط است (۱۴). از طرفی افزودن بتااندورفین به محیط کشت سلول‌های گرانولوزا که هورمون LH دریافت کرده بودند باعث کاهش ترشح پروژسترون در همه فولیکول ها و مهار ترشح استرادیول درفولیکول‌ها به خصوص فولیکول‌های کوچک شده‌است (۲۵). اگونیست‌های گیرنده مو -که بیشترین تأثیر مواد اوپیوئیدی از طریق آنها اعمال می‌شود، با مهار ترشح استرادیول و تستوسترون در سلول‌های گرانولوزای خوک در غیاب LH به تنظیم روند فولیکول‌زایی کمک می‌کنند (۱۷). از طرفی تجویزاپیوئیدها، فولیکول‌های کوچک را بیشتر تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۵) و می‌توان گفت اندورفین‌ها به طور مستقیم نیز بر روند رشد فولیکول‌های تخمدان تأثیر می‌گذارند. نتایج مطالعه حاضر حاکی از تغییر معنی‌دار در نسبت فولیکول‌های کوچک در گروه تیمار بود. به بیان دیگر می‌توان گفت مصرف مزمن مرفین به کند شدن روند ورود فولیکول‌های کوچک به چرخه فولیکول‌زایی منجر شده است.

تغییر سیکل‌های تخمدانی از اختلالات شایع متعاقب مصرف اوپیوئیدهاست (۶). از آنجا که گنادها نیز در کنترل اپیوئیدی ترشح LH نقش دارند و استرادیول و عمدتاً پروژسترون از طریق اپیوئیدها ترشح LH را کنترل می کنند، لذا با تحریک تخمک‌گذاری می‌توان تأثیر اپیوئیدها را بر GnRH و LH خنثی و سیکل تخمدانی را اصلاح نمود (۱۳). در یکی از مطالعات انجام شده، تجویز دوزهای مختلف کوکائین و به دنبال آن hcG به خرگوش‌های ماده تغییری در نسبت فولیکول‌های قبل از تخمک‌گذاری، تعداد تخمک‌های مرحله میوز۲ (MII) و نسبت لقاح ایجاد نکرده بود ولی مقدار پروژسترون سرم را کاهش و استرادیول مایع فولیکولی را کاهش داده است (۲۳). نتایج مطالعهٔ حاضر نیز نشان می‌دهد که تجویز مزمن مرفین درصورتی که با تحریک تخمدان به کمک PMSG همراه باشد بر نسبت فولیکول‌های در حال رشد و فولیکول‌های آنترال تأثیرنمی‌گذارد. چنین نتایجی به دنبال تجویز FSH به مارمولک‌هایی که اندورفین دریافت کرده بودند نیز مشاهده شده است (۱۲).

نسبت فولیکول‌های در حال تحلیل در گروه تیمار به طور معنی‌داری نسبت به موش‌هایی که مرفین دریافت نکرده بودند کاهش یافته بود که این موضوع با توجه به اینکه روند تحلیل عمدتاً در طی مرحله رشد یعنی زمانی که فولیکول‌ها تحت تأثیر محور H-P-G قرار دارند، اتفاق می‌افتد و با توجه به اینکه تعداد کمتری فولیکول کوچک در موش‌هایی که مرفین مصرف کرده بودند می‌توانستند وارد مرحله بعدی تکامل و متعاقب آن دچار آترزی شوند، قابل توجیه است.

با توجه به اینکه با تحریک تخمک‌گذاری می‌توان اختلال هورمونی چرخه تخمدانی را اصلاح نمود، در آزمایشات مانیز که حیوانات با تزریق PMSG تحریک تخمک‌گذاری شده بودند گروه تیمار از نظر درصد فولیکول‌های آنترال با گروه شاهد تفاوتی نداشت و لذا می‌توان احتمال داد که در زنان معتاد به مخدرها که به دلیل اختلال سیکل‌های تخمدانی از ناباروری رنج می‌برند (۵،۶) با القاء تخمک‌گذاری بتوان به رفع مشکل آنان کمک کرد. البته مطالعات تکمیلی بعدی که فراساختار سلول‌های گرانولوزا و تخمک را در حیواناتی که مرفین مصرف کرده باشند، بررسی کند می‌تواند به روشن شدن بیشتر نتایج حاصل از پژوهش حاضر کمک کند.

## تقدیر و تشکر

مقاله حاضر قسمتی از نتایج طرح تحقیقاتی شماره ع/۲۱-۸۲ مصوب مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان است. بخشی از آزمایش‌ها در مرکز تحقیقات علوم اعصاب و قسمتی در گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی افضلی‌پور انجام شده است. نویسندگان مقاله از بخش انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان و آقای امین‌زاده برای در اختیار گزاردن drawing tube تشکر می‌کنند.

## Summary

### Effects of Morphine Dependency on the Ovarian Folliculogenesis Following Superovulation in Mice

Nematollahi Mahani N., Ph.D.[1], Amini S., B.Sc.[2], Imami Meibodi M.A., Ph.D.[3], Nabipour F. Ph.D.[4] and Eftekhar Vaghefi H. Ph.D.[5]

1. Assistant Professor of Anatomy, Afzalipour School of Medicine and Neuroscience Research Center, 2. M.Sc. Student of Anatomy,
3. Associate Professor of Anatomy, 4. Assistant Professor of Pathology, 5. Assistant Professor of Anatomy, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran

***Background:*** *Opioids may affect hypothalamic GnRH secretion and Hypothalamic-Pituitary- Gonad axis, resulting in reproductive disturbances. Current study investigates the effects of morphine on structure of ovary following superovulalion through morphologic/morphometric studies.*

***Methods:*** *Twelve young female NMRI mice were allocated into treatment and control groups. Treatment group received oral morphine at final dose of 0.4mg/ml for 21 days. Physical dependency was proved by injection of naloxone (2mg/kg ip). The mice were superovulated by 10 iu PMSG (ip) and 48 hours later were sacrificed by cervical dislocation. Ovaries were removed and H&E staining was done. Every $10^{th}$ serial section, which represents nonrandom 10 percent sample was counted. Follicles were classified into small, growing, antral and atretic according to the diameter and number of follicular cell layers surrounding oocytes. The volume and the weight of ovaries were recorded. In addition, the diameter of the antral follicles and oocytes was carefully measured by a calibrated oculometer.*

***Results:*** *The volume and the weight of ovaries showed no significant alterations in the two groups. The proportion of small and atretic follicles was statistically different in treatment and control groups ($P<0.001$).*

***Conclusion:*** *According to our data, oral morphine did not alter the volume and the weight of the ovary. However, folliculogenesis was moderately affected by morphine and following superovulation the behavior of ovaries in the treatment group is comparable to the control group.*

***Key words:*** *Morphine dependency, Mouse, Folliculogenesis, Ovary, Morphology*

*Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2005; 12(3): 174-180*

## References

۱. صحرایی هدایت، کاکا غلامرضا؛ قشونی، حسن؛ شمس لاهیجانی، مریم و رمضانی، مینا: اثر تجویز خوراکی مرفین بر باروری موش سوری نـژاد Balb/c. فـصل‌نامـه باروری و ناباروری. ۱۳۸۱، دوره ٤، شماره ۱۱، ص ۱۰-٤.

1. Ahmadi J, Arabi H and Mansouri Y. Prevalence of substance use among offspring of opioid addicts. *Addict Behav* 2003; 28(3): 591-595.
2. Ahmadi J and Hasani M. Prevalence of substance use among Iranian high school students. *Addict Behav* 2003; 28(2):375-79.
3. Bancroft J.D, Steven A. Theory and practice of Histological techniques. 1990; chapter 2, page 28.
4. Brambilla F, Zanoboni A, Zanoboni-Muciaccia W and De Maio D. Growth hormone response to thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone stimulation in heroin addicts. *Neuropsychobiology* 1980; 6(3):152-8.
5. Brambilla F, Resele L, De Maio D and Nobile p. Gonadotropin response to synthetic gonadotropin hormone-releasing hormone (GnRH) in heorine addicts. *Am J Psychiatry* 1979; 136(3):314-7.
6. Bucci TJ, Bolon B, Warbritton AR, Chen JJ and Heindel JJ. Influence of sampling on the Reproducibility of ovarian Follicle counts in mouse toxicity studies. *Reprod Toxicol* 1997; 11(5):689-96.
7. Chen EC, Samuels MH, Luther MF, *et al.* Cocaine impairs follicular phase pulsatile gonadotropin secretion in rhesus monkeys. *J Soc Gynecol Investig* 1998; 5(6): 311-316.
8. Dalal SJ, Estep JS, Valentin-Bon IE and Jerse AE. Standardization of the Whitten Effect to induce susceptibility to Neisseria gonorrhoeae in female mice. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2001; 40(2):13-7.

9. El-Bassel N, Gilbert L and Rajah V. The relationship between drug abuse and sexual performance among women on methadone. Heightening the risk of sexual intimate violence and HIV. *Addict Behav* 2003; 28(8): 1385-1403.
10. Faletti A, Jawerbaum A, Viggiano J and Gimeno MA. Naltrexone enhances ovulation and prostaglandin synthesis in the rat ovary. *Prostaglandins* 1997; 54(3): 665–675.
11. Ganesh CB and Yajurvedi HN. Beta-endorphin disrupts seasonal and FSH-induced ovarian recrudescence in the lizard Mabuya carinata. *Gen Comp Endocrinol* 2003; 133(3): 305–313
12. Genazzani AR and Petraglia F. Opioid control of luteinizing hormone secretion in humans. *J steroid Biochem* 1989; 33(4B):751-5.
13. Gregoraszczuk EL and Slomczynska M. Beta-endorphine inhibition of progesterone secretion by porcine granulosa cells during follicle development. *Reprod Nutr Dev*1998; 38(3):227-34.
14. Hulse GK and Coleman GJ. The effects of morphine sulfate on ovulation in the immature rat treated with PMSG. *Pharmacol Biochem Behav* 1983; 19(2):269-273.
15. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK and Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the post natal mammalian ovary. *Nature* 2004; 428(6979): 140-150.
16. Kaminski T, Siawrys C, Bogacka I, Okrasa S and Przala J. The influence of opioid peptides on steroidogenesis in porcine granulosa cells. *Reprod Domest Anim* 2004; 39(1):25-32.
17. Kaminski, Siawrys G, Bogacka I and Przala J. The physiological role of beta-endorphin in porcine ovarian follicles. *Reprod Nutr Dev* 2000; 40(1):63-75.
18. Kaufmann RA, Savoy-Moore AT, Sacco AG and Subramanian MG. The effect of cocaine on oocyte development and the follicular microenvironment in the rabbit. *Fertil Steril* 1990; 54(5): 921-6.
19. Meites J, Bruni J.F, Van Vugt D.A and Smith A.F. Relation of endogenouse opioid peptides and morphine to neuroendocrine functions. *Life Sci* 1979; 24(15):1325-36.
20. Myers M, Britt KL, Wreford NG, Ebling FJ and Kerr JB. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction* 2004; 127(5):569-80.
21. Nieto MM, Wilson J, Cupo A, Roques BP and Noble F. Chronic morphine treatment modulates the extracellular levels of endogenous enkephalins in rat brain structures involved in opiate dependence: A microdialysis study. *J Neurosci* 2002; 22(3):1034-41.
22. Richter TA, Spackman DS, Robinson JE, *et al*. Role of endogenous opioid peptides in mediating progesterone-induced disruption of the activation and transmission stages of the GnRH surge induction process. *Endocrinology* 2001; 142(12): 5212-9.
23. Siddiqui A, Haq S and Shah BH. Pevinatal exposure to morphine disrupts brain norepinephrine, ovarian cyclicity and sexual receptivity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1997; 58(1):243-48.
24. Tong GX, Zhao BG,Wang ZX, Gu Dy, luo LG and Cheng ZP. Effect of opioid peptides on progesterone production by rat luteal cells *in vitro. Sheng Li Xue Bao*1992; 44(3):269-74.
25. Yilmaz B, Konar V, Kutlu S, *et al.* Influence of chronic morphine exposure on serum LH, FSH, testosterone levels and body and testicular weights in the developing male rats. *Arch Androl* 1999; 43(3):189-96.