مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۵، شماره۵، آذر و دی ۱۳۹۹(شماره پی در پی ۱۴۲)

تأثیر مورفین بر مراحل نهایی میوز تخمک در محیط کشت و لقاح در موش سوری

سید نورالدین نعمت الهی ماهانی[۱]، سارا امینی[۲*]، فاطمه نبی پور[۳]، سید حسن افتخار واقفی[۱]

[۱] گروه علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران، [۲]گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی کردستان، کردستان، ایران،[۳]گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۸/۱۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۰۲

چکیده:

زمینه و هدف: مواد اعتیادآور با تأثیر بر محور هیپوتالاموس ـ هیپوفیز ـ تخمدان می‌توانند بر دستگاه تولید مثل اثر بگذارند و ترشح گنادوتروپین‌ها را تحت تأثیر قرار دهند. مورفین موجب کاهش چشمگیر سطح LH پلاسما می‌شود. مورفین با ایجاد تغییرات غیر طبیعی در ساختار سلول و بافت پوششی اندومتر باروری و بارداری را مورد تهدید جدی قرار می‌دهد. لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی تأثیر مورفین بر مراحل نهایی میوز تخمک در محیط کشت و لقاح آزمایشگاهی در موش سوری بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۲ در دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام شد، ۱۶ سر موش ماده با میانگین وزن ۲۴ـ۲۰ گرم در دو گروه تیمار و شاهد قرار گرفتند. در طی سه هفته گروه تیمار دسترسی آزاد به آب آغشته با سولفات مورفین با(۰/٤ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) داشت. به منظور تحریک تخمک‌گذاری، گنادوتروپین سرم مادیان باردار تزریق و پس از ٤٨ ساعت حیوانات قربانی شدند. مجموعه کومولوس ـ ائوفوروس از تخمدان‌ها استخراج و به محیط کشت غنی شده انتقال یافتند. پس از ٢٤ ساعت تعداد اووسیت‌های حاوی اولین جسم قطبی(تخمک متافاز دو) ثبت و به محیط لقاح انتقال یافتند. اسپرماتوزوئیدها از وازودفران موش نر استخراج و پس از انجام مراحل مقدماتی از قبیل سانتریفیوژ و نگهداری در انکوباتور با شرایط مناسب به محیط لقاح انتقال یافتند و سرانجام اووسیت‌های دارای دومین جسم قطبی و تخمک دو سلولی به عنوان لقاح مثبت، یادداشت شدند. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری تی تست و مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: میانگین وزن تخمدان گروه شاهد و تیمار به ترتیب ذکر ٦/٧ و ٧/٣ میلی‌گرم بود(p=۰/۷). در گروه شاهد از مجموع ۱۲۸ تخمک متافاز I تعداد ۸۹ تخمک متافازII (۶۹/۵۳ درصد) و در گروه تیمار از ۱٤۰ تخمک متافاز I تعداد ۹۹ تخمک متافازII (۷۰/۷۱ درصد)استحصال شد(p=۰/۰۵۱). گروه شاهد از ۸۹ تخمک متافاز II تعداد لقاح مثبت ۲۹ مورد(۳۲/۵۷ درصد) و گروه تیمار از مجموع ۹۹ تخمک متافاز II تعداد لقاح مثبت ۳۱ مورد(۳۱/۳۱ درصد)بود(p=۰/۲۱).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد علی‌رغم وابستگی حیوان، مورفین موجب اختلال در از سرگیری و تکمیل تقسیم میوز نشده است و به موجب آن توانائی باروری تخمک در محیط کشت آسیب ندیده است.

واژه‌های کلیدی: مورفین، تقسیم میوز، تخمک، باروری، موش

* **نویسنده مسئول: سارا امینی**، کردستان، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، گروه علوم تشریح

Email:sara.amini@muk.ac.ir

مقدمه

مـواد اعتیـادآور از طریـق تـأثیر بـر محـور هیپوتالاموس ـ هیپوفیز- تخمدان، ترشح هورمون های لوتئینیزه کننده و تحریک کننده سلول هـای فولیکـولی را تحت تأثیر قرار داده و عملکرد دستگاه تولیـد مثـل را مختل می‌کنند(۱).

افیون‌ها با مهار ترشح فاکتورهـای آزاد کننـده گنادوتروپین‌ها، تولید گنـادوتروپین‌هـا را تحـت تـأثیر خود قرار می‌دهند(۲). بتا اندورفین به صورت وابسـته بـه دوز و مـورفین بـه عنـوان مشـتقی از آن، تولیـد پروژسـترون را از سـلول‌هـای گرانولـوزای تخمـدان موش صحرایی افزایش می‌دهند(۳). در افراد معتاد بـه نارکوتیک‌هـا، تغییـر عملکـرد جنسـی و کـاهش سـطح هورمون پدیـده شـایعی اسـت(۴). در افـراد معتـاد بـه هروئین، سطح پایه هورمون‌های FSH و LH پایین‌تر از افراد غیر معتاد است. و لذا در تعدادی از مردان معتـاد اولیگوسپرمی، نکروسپرمی و استنوسپرمی و در زنان معتاد، سیکل‌های قاعـدگی نـامنظم و آمنـوره گـزارش شده است. مورفین در همه رده‌هـای سـنی زن و مـرد موجب کاهش چشمگیر سطح هورمون لوتئینیزه کننده در پلاسمای خون می‌شود(۶ و۵). بیشتر داروهای غیر مجاز و افیون‌هـا و از جملـه مـورفین، موجـب کـاهش محرک های فیزیکی، کاهش میل جنسی، کاهش توانایی در رسیدن به ارگاسم در زنان معتاد و در مـردان نیـز موجب تأخیر و یا توقف انزال می‌شوند(۷ و۶).

استعمال حـاد مـورفین هـیچ تـاثیری بـر روی پارامترهای لقاح(پلاک واژینال –بـارداری) نداشـته بـر رفتار جنسی حیوان بی تاثیر بوده اسـت امـا عـوارض متعـددی روی جنـین داشـته اسـت. تولـه هـای مـوش صحرایی به طور قابل ملاحظه‌ای کوچک و مرگ و میر بـه طـور محسوسـی بیشـتر از گـروه کنتـرل بـوده اسـت(۸). مـورفین بـه طـور معنـی‌داری سـطح تستوسترون را در حیوانات نر تیمار شـده کـاهش داد و همچنین موجب غیرطبیعی شدن پارامترهای اسـپرم شد(۹).

مورفین موجب تغییرات غیر طبیعی در ساختار سلول و بافت پوششی اندومتر می‌شـود کـه بـه نوبـه خود می‌تواند باروری و بارداری را مورد تهدید جـدی قرار دهد(۱۰). که این خود می‌توانـد بنیـان خـانواده را مـورد تهدیـد جـدی قـرار دهـد. مـورفین یـک اپیوئیـد آلکالوئیـد بـوده و در حـال حاضـر مـؤثرترین و کاربردی‌ترین نارکوتیک در دسترس می باشـد کـه در مراکـز درمـانی بـرای تسـکین دردهـای بعـد از عمـل جراحی و همچنین در بیماران صـعب‌العـلاج بـه طـور مکرر استفاده می‌شود که خود احتمال وابستگی فـرد دریافت کننده دارو را افزایش داده و احتمـال اسـتفاده آنان را بعد از ترک مرکز درمانی افزایش می‌دهد.

علی‌رغم پژوهش‌های زیاد که بر روی مورفین انجام شده است، امـا تـیم تحقیـق مطالعـه حاضـر، بـه مقالـه‌ای در خصـوص تـأثیر مـورفین بـر تخمـک در محیط کشت دست نیافتند، لذا این مطالعـه بـه بررسـی تأثیر مورفین بر مراحل نهایی میوز تخمـک در محـیط کشت و لقاح آزمایشگاهی در مـوش سـوری پرداختـه است.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که در سال ۹۲ در دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام شد، ۱۶ سر موش ماده نابالغ با سن ۳ هفته و ۱۰ سر موش نر با قدرت باروری مثبت استفاده شد. موش‌های ماده به مدت ۲ هفته در قفس مشترک و با شرایط مناسب دما، نور و رطوبت قرار گرفتند و در ادامه حیوانات به طور تصادفی به دو گروه شاهد و تیمار تقسیم شدند. در گروه تیمار، آب آشامیدنی آغشته به سولفات مورفین با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، همراه با کمی‌ساکاروز(به منظور رفع تلخی مورفین) در اختیار حیوانات قرار گرفت. سپس هر دو روز یکبار ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سولفات مورفین به غلظت قبلی افزوده شد تا به غلظت نهایی ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رسید و تا آخر مطالعه(۳ هفته) غلظت مورفین ثابت ماند(۱۱).

در تمام دوره مطالعه حیوانات طبق پروتکل معاونت مذکور نگهداری و مورد بهره برداری قرار گرفتند.

به منظور تأیید اعتیاد حیوانات، از تزریق داخل صفاقی نالوکسان به میزان ۲ میلی‌گرم بر کیلو وزن بدن استفاده شد و در صورت عدم رؤیت علایم ترک، حیوان از مطالعه خارج می‌شد(۱۳ و ۱۲). همچنین برای یکسان‌سازی سیکل استروس، حیوانات هر گروه به مدت یک شبانه روز در معرض موش نر(که با جدار توری از موش نر جدا بودند) قرار گرفتند. سپس به منظور تحریک تخمک‌گذاری از تزریق داخل صفاقی ۱۰ واحد بین‌المللی گنادوتروپین سرم مادیان باردار[1] استفاده شد و پس از ۴۸ ساعت، موش‌ها با استنشاق کلروفورم و جا به جایی مهره‌های گردن قربانی شدند(۱۴). شرایط مطالعه(به غیر از آب آشامیدنی و تزریق نالوکسان) برای هر دو گروه یکسان بود.

معیار ورود به مطالعه، موش با وزن بین ۲۱ تا ۲۴ گرم، موش با سندرم ترک اعتیاد مثبت بودند.

معیار خروج از این مطالعه، موش‌های با وزن بالاتر از ۲۴ گرم، موش‌های با وزن پایین‌تر از ۲۱ گرم، موش فاقد سندرم ترک اعتیاد و موش بیمار بود. همچنین به منظور جلوگیری از سوءگیری پس از استخراج تخمدان‌ها از فردی خارج از مطالعه خواسته شد پلیت‌های حاوی تخمدان‌های گروه‌ها را با علایمی اختصاری مشخص نماید و مشخصات را نزد خود تا پایان مطالعه نگهدارد، لذا محققان تا زمان بررسی آماری از شاهد یا تیمار بودن نمونه‌ها مطلع نبودند.

پس از قربانی شدن حیوان، شکم باز شده و تحت شرایط استریل تخمدان‌های هر موش استخراج و از بافت‌های پیرامون پاکسازی و با کاغذ صافی خشک شد. سپس با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرمی توزین و به محیط کشت حاوی فسفات بافر سالین و آلبومین سرم گاوی انتقال یافت و تحت میکروسکوپ استریو با سرسوزن استریل شماره ۲۵ نقاط برجسته تخمدان خراش داده شد تا کمپلکس‌های

1-Pregnant Mare Serum Gonadotropin(PMSG)

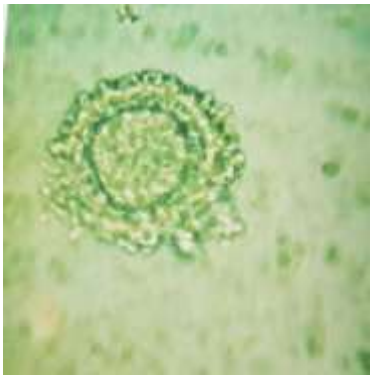
کومولوس ـائوفوروس[1] در محیط کشت رها شوند و در زیر میکروسکوپ اینورت، اووسیت‌هایی که به وسیله سلول‌های کومولوس احاطه شده بودند و هم‌چنین کمپلکس‌های فاقد جسم قطبی و اووسیت‌های فاقد غشاء هسته به عنوان تخمک در مرحله متافاز یک استحصال و به قطرات محیط کشت[2] غنی شده باسلنیوم- ترانسفرین- انسولین[3]، سرم جنین گاو[4]، آلبومین سرم گاو[5]، LH و FSH انتقال یافته و تعداد کمپلکس‌های(شکل۱) هر گروه یادداشت شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه و CO_2 ۵ درصد و رطوبت مناسب) قرار گرفتند. پس از ۱۲ ساعت مجدداً کومولوس ائوفوروس‌ها بررسی و تعداد آنها و تخمک‌هایی که دارای جسم قطبی(شکل ۲) بودند به عنوان تخمک در مرحله متافاز دو ثبت و به محیط لقاح انتقال یافتند. حدود ۳ الی ۴ ساعت قبل از لقاح، موش نر با استنشاق کلروفورم و جا به جایی مهره‌های گردن حیوان قربانی و تحت شرایط استریل دم اپیدیدیم و وازودفران از بیضه و بافت‌های مجاور جدا و به محیط حاوی مایع لوله رحم انسان[6] و اتیلن دی آمین تترااستیک اسید[7]هیدروکسی اتیل پیپرازین اتان سولفونیک اسید[8]،آلبومین سرم گاو انتقال یافته و در زیر هود و با پنس محتویات وازودفران در محیط تخلیه می‌شد و پس از بررسی کیفیت اسپرم‌ها محتویات پلیت به لوله استریل انتقال یافته و با دور ۱۵۰۰ به مدت ۷ دقیقه سانتریفوژ شد و به ته‌نشین آن ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت افزوده شد و به مدت ۱ الی ۱/۵ ساعت در انکوباتور با شرایط مساعد قرار داده شد تا اسپرم‌های فعال به فاز بالایی مهاجرت کنند. در هر قطره محیط لقاح آزمایشگاهی(حاوی مایع لوله رحم انسان و آلبومین سرم گاو با استفاده از پیپت پاستور ۳ الی ۴ تخمک قرار داده شد، سپس مقدار کافی از اسپرم به قطرات انتقال یافت تا ۳ الی ۴ ساعت در معرض تخمک‌ها باشند. سپس تخمک را شستشو داده و به محیط کشت تازه انتقال یافتند و پس از ۱۶ـ۱۲ ساعت تخمک‌های با دومین جسم قطبی(شکل۳) و یا دوسلولی(شکل۴) به عنوان لقاح مثبت گزارش گردید.

محیط α-MEM و محیط HTF طبق دستورالعمل شرکت سازنده(سیگما) به طور هفتگی تهیه می‌شد و در پلیت‌ها قطرات محیط بلوغ و محیط لقاح به وسیله روغن معدنی پوشانده شده و پلیت‌ها پس از ۲۴ ساعت نگهداری در انکوباتور با شرایط مناسب مورد استفاده قرار می‌گرفت.

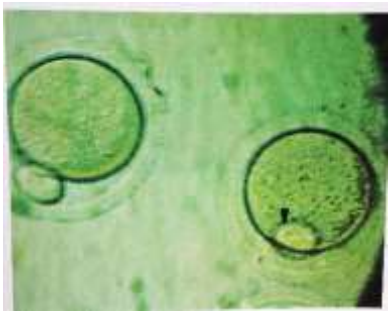
هم‌چنین از هر گروه ۱۰ تخمک متافاز دو برای بررسی بکرزایی در محیط لقاح به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور نگهداری شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری تی‌تست و مجذور کای تجزیه و تحلیل شدند.

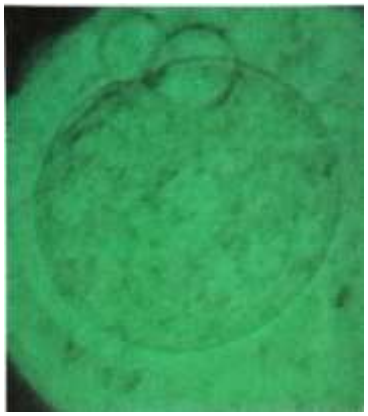
1-Cumulus Oophorus Complexs(Cocs)
2-Alpha Minimum Essential Medium.(α-MEM)
3-Insulin –Transferrin- Selenium(ITS)
4-Fetal Bovine Serum(FBS)
5-Bovine Serum Albumin(BSA)
6-Human Tubal Fluid(HTF)
7-Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid(EDTA)
8-Hydroxy Ethyl Piperazine Ethan Sulfunic Acid(HEPES)



شکل۱ : کمپلکس کومولوس ـ ائوفوروس استحصال شده از تخمدان موش گروه شاهد را در محیط کشت نشان می‌دهد که فاقد غشاء هسته بوده و در مرحله متافاز I قرار دارد. میکروسکوپ اینورت با نور فلورسنت سبز و بزرگنمایی ۲۰۰×



شکل ۲: تصویر دو تخمک همراه با اولین جسم قطبی(سر فلش) متعلق به گروه شاهد را در محیط لقاح نشان می‌دهد که در مرحله متافاز II قرار دارند. میکروسکوپ اینورت با نور فلورسنت سبز و بزرگنمایی ۲۰۰×



شکل ۳: تصویر حاصل از تخمک گروه تیمار با خروج همراه با دومین جسم قطبی دیده می‌شود. میکروسکوپ اینورت با نور فلورسنت سبز و بزرگنمایی ۲۰۰×

شکل ۴: تصویر تخم دو سلولی متعلق به گروه شاهد را پس از شستشو و انتقال به محیط کشت نشان می‌دهد.میکروسکوپ اینورت با نورفلورسنت سبز و بزرگنمائی ۲۰۰×

یافته‌ها

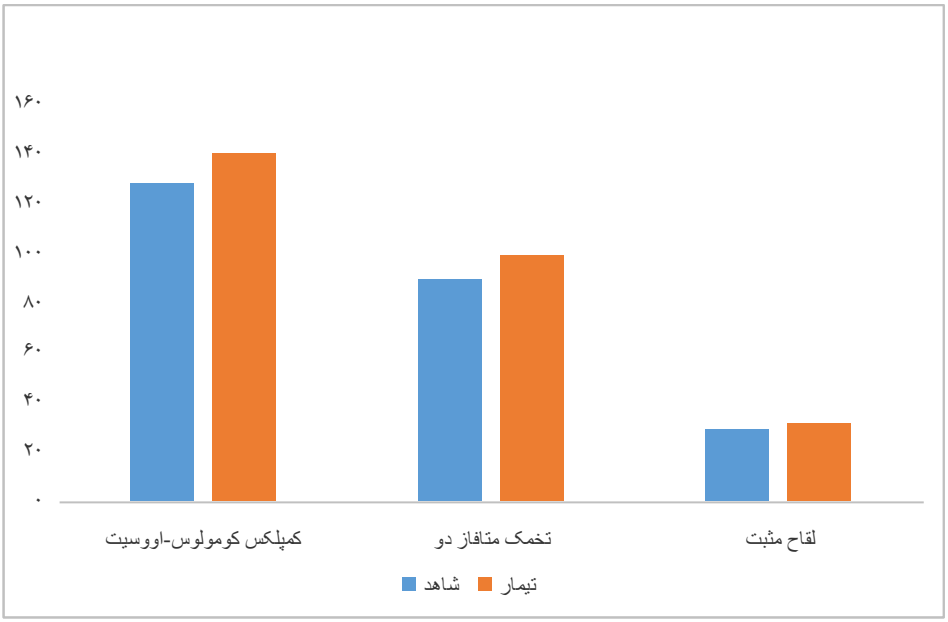
در گروه شاهد میانگین وزن تخمدان ۸ سر موش ۶/۷ میلی‌گرم و میانگین وزن تخمدان ۸ سر موش گروه تیمار ۷/۳ میلی گرم بود که اختلاف بین دو گروه معنی‌دار نبود(p=۰/۷).

در گروه شاهد از مجموع ۱۲۸ تخمک متافازا تعداد ۸۹ تخمک متافاز II (۶۹/۵۳ درصد) و در گروه تیمار از مجموع ۱۴۰ تخمک متافاز I تعداد ۹۹ تخمک متافاز II (۷۰/۷۱ درصد)استحصال شد که تفاوت معنی‌دار نبود(p=۰/۰۵۱). همچنین در گروه شاهد از ۸۹ تخمک متافاز II تعداد لقاح مثبت ۲۹ مورد(۳۲/۵۸ درصد) و در گروه تیمار از مجموع ۹۹ تخمک متافاز II تعداد لقاح مثبت ۳۱ مورد(۳۱/۳۱ درصد) بود و تفاوت معنی‌دار نبود(p=۰/۲۱)و نمودار ذیل.

در گروه شاهد از مجموع ۱۰ تخمک متافاز دو یک سلول تخم دو سلولی استحصال شد و در گروه تیمار نیز چنین بود، لذا اختلافی بین دو گروه وجود نداشت.

بحث

تغییرات تخمدان در جریان دوره‌های جنسی وابسته به هورمون‌های گنادوتروپینی مترشحه از هیپوفیز قدامی است که به نوبه خود تحت کنترل هیپوتالاموس می‌باشد(۱). به نظر می‌رسد مورفین اثراتی مشابه اپیوئیدهای برونزا در چرخه هیپوتالاموس ـ هیپوفیزـ تخمدان داشته باشد(٦). با توجه به کاربرد رایج درمانی مورفین در تسکین درد، اطلاعات کمی در خصوص نقش آن در بلوغ نهایی تخمک و شایستگی باروری وجود دارد، لذا هدف از این مطالعه بررسی تأثیر مصرف مزمن مورفین بر مراحل نهایی میوز تخمک در محیط کشت و لقاح آزمایشگاهی بود.



نمودار ۱: میانگین تعداد استحصال کمپلکس کومولوس ـ اووسیت، تخمک متافاز مثبت در دو گروه شاهد و تیمار

در مطالعه حاضر وزن تخمدان در دو گروه اختلاف معنی‌داری با هم نداشت. در مطالعه غلامرضا کاکا و همکاران مصرف خوراکی مورفین موجب کاهش وزن تخمدان شد(۱۵). در مطالعه کرمی و همکاران تزریق داخل صفاقی مورفین سبب ایجاد تخمدان پلی کیستیک شد(۱۶) و نتیجه ضمنی آن افزایش حجم و وزن تخمدان بود که مغایرتی با نتیجه مطالعه حاضر نداشت. مطالعه دیگری مصرف طولانی مدت مورفین تأثیری بر وزن بیضه حیوان نداشت(۱۷). تخمدان به عنوان غده جنسی عمدتاً حاوی سلول‌های جنسی در مراحل مختلف تکاملی بوده و بیشتر وزن تخمدان را به خود اختصاص داده است. به نظر می‌رسد عدم اختلاف در وزن تخمدان در دو گروه به دلیل عدم تأثیر مورفین بر ظرفیت سلول‌های جنسی تخمدان‌ها باشد. به هر حال هیپوگنادیسم یکی از عوارض مصرف کنندگان مخدرها می‌باشد و با توجه به این که ارتباط مستقیمی بین وزن و حجم وجود دارد، لذا به نظر می‌رسد در این مطالعه مورفین موجب هیپوگنادیسم در حیوانات ماده نشده است. در مطالعه‌ای افزودن بتا اندورفین به محیط بلوغ تخمک گاو در محیط آزمایشگاهی که با هورمون غنی شده بود، بر میزان رسیدن تخمک به مرحله متافاز دو بی‌تأثیر بود و در محیط عاری از هورمون، به شدت رسیدن تخمکها را به همان مرحله تحت تأثیر قرار داده بود و تخمکها در مرحله متافاز یک ماندند(۱۸). در مطالعه پیلوت ما مجموعه کومولوس ـ اووسیت در مرحله تجزیه غشاء هسته(متافازا) انتخاب شده و به مدت ۱۸ تا ۲۰ ساعت در محیط کشت نگهداری شدند که درصد استحصال تخمک متافازII کمتر از ۲۰ درصد بودند، لذا به منظور افزایش تعداد اووسیت MII به محیط کشت تخمک HcG اضافه شد که میزان تشکیل تخمک MII به بالا ۴۰ درصد رسید. در مطالعه اصلی نیز کمپلکس کومولوس ـ ائوفوروس که در مرحله تجزیه غشاء هسته(GVB) در محیط کشت غنی

شده باHcG قرار گرفتند، درصد پیشرفت اووسیت از مرحله MI به مرحله MII در گروه شاهد و تیمار به ترتیب ذکر ۶۹/۵۳ و ۷۰/۷۱ درصد بود و تفاوت معنی‌داری در رسیدن سلول‌ها به مرحله MII بین دو گروه وجود نداشت که در راستای نتایج مطالعه فوق‌الذکر بود.

در مطالعه‌ای اثر گنادوتروپین‌ها در بلوغ تخمک در محیط‌های کشت بدون گنادوتروپین‌ها و حاوی گنادوتروپین‌ها بررسی شد که بالاترین درصد بلوغ تخمک مربوط به محیط حاوی هر دو گنادوتروپین و کمترین درصد مربوط به محیط فاقد گنادوتروپین بوده است(۱۹). در مطالعه پیلوت حاضر تخمک‌ها در محیط کشت فاقد گناتروپین قرار گرفتند که درصد استحصال MII کمتر از ۲۰ درصد بود، اما در مطالعه اصلی، محیط بلوغ تخمک با گنادوتروپین‌ها غنی شد و در هر دو گروه درصد استحصال بهبود یافت. هورمون FSH بلوغ هسته را تحریک کرده، ولی موجب کاهش پیشرفت میوز می‌شود و در مقابل LH مسئول از سرگیری تقسیم میوز است. از طرف دیگر حضور LH به تنهایی هیچ تأثیری بر پتانسیل تکامل تخمک گاو نداشته است. به نظر می‌رسد استفاده همزمان از هردو گنادوتروپین بیشترین تأثیر را بر بلوغ تخمک داشته باشد(۱۹). در مطالعه حاضر از ترکیب هر دو گنادوتروپین در محیط کشت هر دو گروه تیمار و شاهد استفاده شد و درصد استحصال تخمک MII اصلاح شد که با مطالعه مذکور همخوانی داشت. FSH در محیط کشت موجب افزایش نسبت تخمک‌های لقاح یافته، جنین‌های پرسلولی و بلاستوسیست می‌شود(۲۰). بلوغ هسته تخمک موش پس از رسیدن به مرحله MI متوقف می‌شود، ولی بلوغ سیتوپلاسمی ادامه می‌یابد و صلاحیت رسیدن به مرحله MII را کسب می‌کند. تخمک پس از خروج اولین جسم قطبی(MII) و قبل از فعال شدن مجدد، احتمالاً به منظور تعادل بین عناصر کنترل کننده سیکل سلولی نیاز به وقفه‌ای دارد. با توجه به این که مراحل تکاملی حرکتی پویا و دینامیک می‌باشد و تخمک متافاز II پس از لقاح تقسیمات میوزی را از سر می‌گیرد، لذا تشکیل تخمک MII و قابلیت باروری در ارتباط مستقیم با هم هستند(۲۱ و۱۸). مطالعه حاضر علی‌رغم بهبود درصد تشکیل تخمک MII، درصد تشکیل تخم در حد انتظار نبود که شاید به دلیل فاصله زیاد محیط لقاح آزمایشگاهی(invitro) با شرایط محیط بدن موجود زنده(invivo) باشد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد مورفین موجب اختلال در از سرگیری تقسیم میوز اووسیت در محیط کشت و شایستگی باروری تخمک نشده است.

محدودیت‌های طرح، در مطالعه حاضر در ابتدا تعداد لقاح مثبت بسیار اندک بود و تا کسب تعداد مناسب لقاح بارها مطالعه پیلوت انجام شد و غلظت‌های اجزاء سازنده محیط کشت تغییر داده شد تا محیط لقاح مناسب به دست آمد و سپس مطالعه اصلی شروع شد. لذا پیشنهاد می‌شود در مطالعه دیگری مدت زمان تیمار با مورفین افزایش یابد و یا از دوز بالاتری استفاده شود، همچنین گروهی از

کمپلکس‌های تخمک و کومولوس در محیط کشت فاقد گنادوتروپین‌ها بررسی شوند. هم‌چنین بهتر است برای رعایت حقوق حیوان، حیوانات گروه تیمار به آب ساده دسترسی داشته باشند و برای القاء اعتیاد از روش گاواژ و یا نوع تزریقی مورفین استفاده شود.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر بخشی از طرح تحقیقاتی به شماره ۹۲/۱۲/ع مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان می‌باشد که با حمایت آن دانشگاه انجام شد و از کارکنان مرکز تحقیقات معاونت مذکور تقدیر و تشکر به عمل بیاورند.

REFERENCES

1.Bondanelli M, Ambrosio MR, Franceschetti P, Guerrini R, Valentini D, Uberti E. Effect of delta-opioid receptor agonist deltrophin on circulating concentrations of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in healthy fertile women. Human Reprod 1998;13(5):1159-62.
2.Vincent P, Christos M, Dominque Croix R, Salzet M, Douy JP, Poulain P, Beauivillian George B. Morphine and anandamide coupling to nitric oxide stimulates GnRH and CRF release from rat median eminence: neurovascular regulation. Brain Reseaarch 1998; 790(1-2): 236-44.
3.Tong GX, Zhao BG, Wang ZX, GU Dy, Luo LG, Cheng ZP, et al. Effects of opioid peptides on progestron production by rat luteal cells invitro. Article in Chinese 1992; 44(3): 269-74.
4.Roberto M, Federica P, Luciano M, Flavio P. Characterization of functional opioid delta receptor in a luteinizing hormone releasing hormone-producing neuronal cell line. Endocrinology 1995; 136(1): 289-94.
5.Genazzain AR, Petralgia F. Opioid control of lutenizing hormone secretion in humans. J Steroid Biochem 1989; 33(48): 751-5.
6.Dutriez Casteloot I, Montel V, Croix D, Laborie C, Van Camp G, Beauvilliain JC, et al. Activities of the pituitary-adrenal and gnadal axes during the estrus cycle in adult female rats prenataly exposed to morphine. Brain Res 2001; 902(1): 66-73.
7.Eileen C, Mary H, Samuels Michale F, Thomas S, King Carlton A, Eddy CA, et al. Cocaine impaires follicular phase pulsative Gonadotropin secretion in Rhesus monkeys. J Soc Gynecol Invest 1998; 5: 311-6.
8.Theodore J. Cicero, Bruce Nock, Lynn O,Connor, Michael Adams and Edward R, Meyer. Adverse effects of paternal opiate exposure on offspring development and sensitivity to morphine-induced analgesia.The J. of pharcol and Exp Thrap.1995;273(1):386-392.
9.Roshankhah SH, Salahshoor MR, Aryanfar S, Jalili F, Sohrabil M, Jalili C. Effacts of curcumine on sperm parameters abnormalities induced by morphine in rat.Afri J.Oniline2017;vol6(2).
10.Dehghan M, Jafarpour M, Mahmoudian A. The effect of morphine administration on structure and ultrastructure of uterus in pregnant mice. I JRM 2010; 8(3): 111-8.
11.Leung CM, Dai S, Ogle CW. Rapid induction of dependence to morphine in rats. Neuropharm 1986; 25: 305-7.
12.Ezzatabadipour M, Majidi M, Malekpour afshar R, Eftekharvaghefi SH, Nematollahi mahani SN. The effects of morphine on tissue structure of the growth plate in male Rats. Iranian J of Basic Medi Sci 2011; 14(6): 514-20.
13.Sahraei H, Kaka G, Ghoshooni H, Shams Lahijani M, Ramezani M. Effect of oral morphine administration on fertility of Balb/c mice. J Rep and Infer 2002; 3(3): 4-10.
14.Nematollahi Mahani SN, Amini S, Imami Meibodi MA, Nabipour F, Eftekhar Vaghefi SH. Effects of morphine dependency on the ovarian folliculogenesis following superovulation in mice .J of Kerman Univ of Med Sci 2005; 12(3): 174-80.
15.Sahraei H, Kaka GH, Ghoshooni H, Shams Lahijani M, Ramezani M. Effect of oral morphine administration on fertility of Balb/c mice**.** J of Rep and Infert 2002; 3(3): 4-11.
16.Karami M, Jafarian Dehkordi A, Darban Fuladi M, Jalali Nadoshan MR. Induction of polycystic ovary in the rat by morphine**.** DMed 2015, 23(5): 45-52.
17.Yilmaz B, Konar V, Kutlu S, Sandal S, Canpolta S, Gezen MR, et al. Fluence of chronic morphine exposure on serum LH, FSH, Testostrone level and body and texticular weights in the developing male rat. Archieve of Andrology 1994; 43: 189-96.
18.Dell Aquia ME, Casavola V, Reshkin SJ, Albrizio M, Guerra L, Maritato F, Minoa P. Effect of beta endorphin and naloxone on invitro maturation of bovine Oocytes. Mol Reprod Dev, 2002; 63(2): 210-22.
19.Schoevers EJ, Kidson A, Verheijden JHM, Bevers MM. Effect of FSH on nuclear and cytoplasmic maturation of sow Oocyte in vitro. Theriogenology 2003;59(9):2017-28.
20.Ye J, Campbell KH, Craigon J, Luck MR. Dynamic changed in meiotic progression and improvement of developmental competence of pig Oocytes invitro by FSH and cycloheximide. Biol Reprod 2005; 72(2): 399-406.
21.Polanski Z. Activation of invitro matured mouse Oocytes arrested at first or second meiotic metaphase. Int J Dev Biol 1995; 39(6): 1015-20.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Sciences Journal (YUMSJ) Original Article Medical

The Effect of Morphine on the Final Stages of Oocyte Meiosis in Culture and Fertilization Media in Mice

Nemat Elahi Mahani SN[1], Amini S[2*], Nabipour F[3], Iftikhar Vaqefi SH[1]

[1]Department of Anatomy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran, [2]Department of Anatomy, Kurdistan University of Medical Sciences, Kurdistan, Iran, [3]Department of Pathology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Received: 18 Feb 2020 Accepted: 23 Aug 2020

Abstract

Background & aim: Addictive substances by disturbing the hypothalamic-pituitary-ovarian axis can affect the reproductive system and affect the secretion of gonadotropins. Morphine significantly reduces plasma LH levels. This poses a serious threat to fertility and pregnancy by causing abnormal changes in the cell structure and endometrial tissue. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effect of morphine consumption on the final stages of oocyte meiosis in culture and in vitro fertilization in mice.

Methods: In the present experimental study conducted at Kerman University of Medical Sciences in 2013, sixteen female mice weighing an average of 20-24 g were divided into treatment and control groups. During three weeks, the treatment group had free access to water impregnated with morphine sulfate (0.4 mg / ml). To stimulate ovulation, serum gonadotropin was injected into pregnant mares and the animals were sacrificed after 48 hours. The cumulus-euphorus complex was extracted from the ovaries and transferred to the enriched medium. After 24 hours, the number of oocytes containing the first polar body (metaphase II egg) was recorded and transferred to the fertilization medium. Sperms were extracted from vas deferens of male mice and after preliminary steps such as centrifugation and incubation, they were transferred to the fertilization medium under appropriate conditions. Data were analyzed using t-test and chi-square statistical tests.

Results: The mean ovarian weight of the control and treatment groups were 6.7 and 7.3 mg, respectively (p=0.7) in the control group out of 128 metaphase I eggs, 89 metaphase II eggs (69.53%) and in treatment group out of 140 metaphase I, 99 metaphase II oocytes (70.71%) were extracted (p = 0.051). The control group had 29 cases of positive fertilization out of 89 metaphase II eggs (32.57%) and the treatment group had 31 positive fertilization cases (31.31%) out of 99 metaphase II eggs (p = 0.21).

Conclusion: It seems that despite the dependence of the animal, morphine did not interfere with the resumption and completion of meiosis and thus the ability of the egg to reproduce in the culture medium was not impaired.

Keywords: Morphine, Meiosis, Oocyte, Fertility, Mice

[*]**Corresponding author: Amini S,** Department of Anatomy, Kurdistan University of Medical Sciences, Kurdistan, Iran.
Email: sara.amini@muk.ac.ir

Please cite this article as follows:
Nemat Elahi Mahani SN, Amini S, Nabipour F, Iftikhar Vaqefi SH. The Effect of Morphine on the Final Stages of Oocyte Meiosis in Culture and Fertilization Media in Mice. Armaghane-danesh 2020; 25(5): 603-613.