مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره سی، شماره چهار، تیر ۱۴۰۱
تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۷/۲۴
تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۰۹/۱۰

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 ۳۰- ۲۵ گرم، در قفسه‌های ۴تایی (۳ماده 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 تزریقIP 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 BAX،Bcl2 وCaspase3 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 <۰/۰۱).

نتایج: علی رغم اینکه ملاتونین دردو دوز۴و۶ 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> ۰/۰۵) هم‌چنین تزریق ملاتونین در دوز ۲mg/kg باعث ایجاد تغییر معنی‌دار در بیان پروتین‌های 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، پروتین‌های 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 یزد۱۴۰۱؛۳۰(۴):۱۸-۴۷۰۶

۱- گروه زیست شناسی، 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): تلفن۰۹۱۱۳۱۴۰۵۵۹، پست الکترونیکی:farkhondehnemati@gmail.com ، صندوق پستی:۱۶۳
*(نویسنده مسئول دوم): تلفن: ۰۹۱۱۳۲۳۲۸۰۴، پست الکترونیکی: raminataee1349@gmail.com، صندوق پستی:۴۸۴۷۱۹۱۶۲۶

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]

[DOI: 10.18502/ssu.v30i4.9893]

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-آسپارتات) ست 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 نشئگی 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 بیگاه، 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، باربیتورات‌ها، الکل، داروهای ضد تشنج، داروهای ضدجنون و ضد افسردگی‌های سه‌حلقه‌ای می‌باشند. هم‌چنین مصرف همزمان داروهای ضد مخدر مانند نالوکسان، نالترکسان 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 تاثیرات 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 <۰/۰۱) ضریب کلیرانس متادون در پره ترم پلاسنتا (۰/۵۷+/-۰/۲٪) کمتر از ترم بوده و بیان گلیکوپروتئین P در ترم پلاسنتا بیشتر ازپره 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 تیریپتامین) در سال ۱۹۸۷ توسط لرنر (Learner) 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 طوری‌که نشان داده شده است که ملاتونین باعث تخفیف علائم بسیاری از کانسرها و مهار آنژیوژنزیس، پرولیفراسیون و متاستازیس می‌گردد (۵،۶). هم‌چنین در برخی مطالعات بالینی نشان داده شده که ملاتونین می‌تواند آثار حفاظت سلولی داشته و باعث افزایش کارائی 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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]

[DOI: 10.18502/ssu.v30i4.9893]

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.

روش‌بررسی

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 (BAX ,Bcl2 Caspase9) 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 ۳۰-۲۵ 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 موش‌نر 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 درماتی) به صورت گاواژ 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 BAX،BCl2، و 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 گاواژ 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 گاواژ 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 گاواژ قرار گرفتند.

۵-گروه تست سوم، شش موش باردار از روز ۸ تا ۱۸ بارداری تحت تجویز ملاتونین ۶mg/kg/day به‌صورتIP (۱۰ mg/kg) و ۰/۳ میلی‌لیتر متادون به‌صورت گاواژ 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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]

[DOI: 10.18502/ssu.v30i4.9893]

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

مراحل ایمونو هیستوشیمی به شرح ذیل است:

- دپارافینه شدن اسلایدها توسط گزیلول (غوطه ور کردن سبد اسلایدها به مدت ۲ دقیقه درگزیلول)

- هیدراته شدن اسلایدها با درجات کاهشی الکلی (۲ دقیقه به‌ترتیب در الکل ۱۰۰،۹۰،۷۰،۵۰،بافر)

-آشکارسازی آنتی‌ژن: برای این منظور اسلایدها با سیترات بافر (۱۰mM ,۶pH) انکوبه شده و دوبار در آون میکروویو ۷۵۰ وات به صورت غوطه ور در بافر سیترات حرارت داده شدند (هر بار به مدت ۳ تا ۴ دقیقه)

- بلوکه کردن جایگاه‌های آزاد پروتئینی و پراکسیداز اندوژن: برای این منظور اسلایدها پس از شستشو با بافر PBS 1x در محلول حاوی۱ درصد BSA برای بلوکه کردن پروتئین‌های غیر اختصاصی به مدت ۰/۵ تا یکساعت انکوبه شدند و سپس با٪ H2O2 2 برای بلوک کردن پراکسیداز اندوژن به مدت ۰/۵ تا یک‌ساعت انکوبه شدند.

-برای انکوباسیون آنتی‌بادی‌ها، ابتدا اسلایدها با آنتی‌بادی اولیه (Primary anti Bax orBcl2 or Caspase9) در رقت ۱/۲۵۰ به‌مدت ۲۴ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد (در اتاقک مرطوب) انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون اسلایدها به‌وسیله آنتی‌بادی اولیه، در بافر PBST یک مولار سه بار شستشو شده و سپس با آنتی بادی ثانویه (Donkey antigoat IgG HRP conjugate) در رقت ۱/۳۰۰ به مدت یک‌ساعت در اتاق مرطوب و در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. سپس، پس از شستشوی اسلایدها در بافر PBST، با سمپلر، محلول حاوی (H2O2+DAB) ٪1 به میزانی که سطح بافت را فراگیرد به اسلایدها برای ۱۰ دقیقه اضافه گردید. پس از شستشو اسلایدها، نهایتاً بافت‌ها با هماتوکسیلین رنگ آمیزی شده و با درجات الکلی فزاینده (به ترتیب: ۵۰،۷۰،۹۰،۱۰۰) آبگیری و توسط گزیلول شفاف سازی شدند. و به‌وسیله لامل سطح لام‌ها چسبانیده شد و توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمائی ۱۰۰ و ۴۰۰ بررسی اسلایدها و عکس‌برداری صورت پذیرفت، نواحی مثبت به‌صورت لکه‌های قهوه‌ای در اثر رسوب DAB مشخص گردید و با بررسی و شمارش سلول‌های مثبت در Zone 1 µm2 میکروسکوپی درصد سلول‌هایی که غشاء یا سیتوپلاسم آن‌ها به‌وسیله DAB رنگ گرفته بودند به‌عنوان اندکس ایمونوراکتیویته به‌صورت کیفی با سه درجه (mild,Moderate,High) تعیین گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به‌دست 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 <$۰/۰۱).

ملاحظات اخلاقی

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

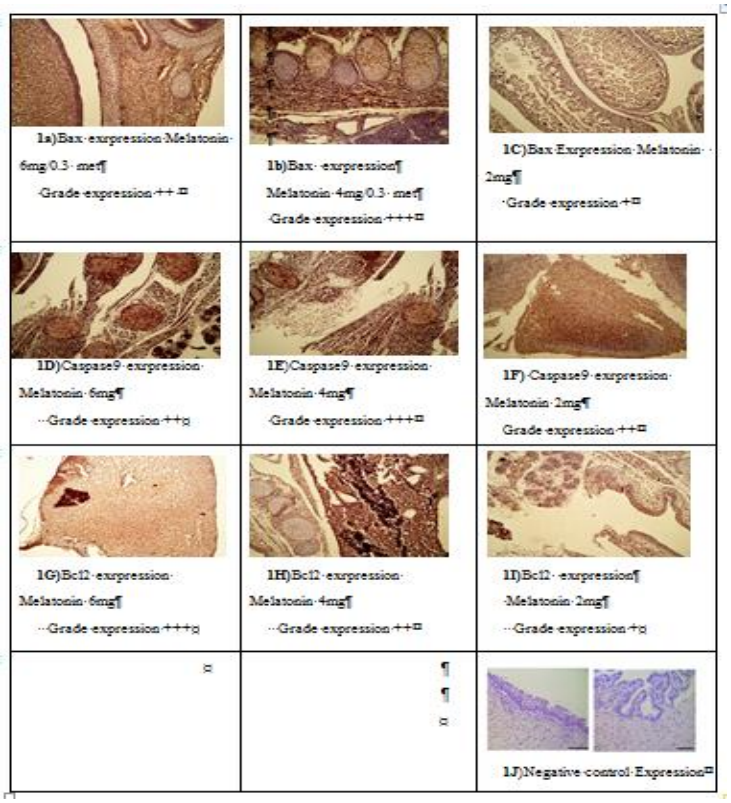
نتایج

درشکل‌های ۴-۱ نتایج آزمایش ایمونوهیستوشیمی در غلظت‌های مختلف ملاتونین نشان داده شده است و درجدول یک نتایج آزمون آماری فیشر آمده است. همانطور که در شکل مشخص است متادون در دوز ۱۰mg/kg، (شکل 1a)، باعث افزایش بیان پروتئین‌های آپوپتوتز گردیده و ملاتونین تقریباً در یک روند وابسته به دوز باعث کاهش بیان پروتئین اپوپتوتوز BAX و افزایش بیان BCl2 گردیده است. به‌طوری که بیان BAX در دوز ۶ mg/kg ملاتونین (شکل a۱) نسبت به دوز 4mg/kg (شکل b۱) کمتر شده است (grade++) در مقابل (grade +++) و هم‌چنین بیان پروتئین آنتی آپوپتوز BCl2 در دوز ۶mg/kg ملاتونین(شکل 1G) نسبت به دوز mg/kg ۴(شکل 1H) و ۲mg/kg (شکل 1I) افزایش یافته است (grade +++) در مقابل (grade++). و هم‌چنین بیان پروتئین آپوپتوتیک Caspase9 در دوز ۶ mg/kg ملاتونین (شکل 1D) در برابر دوز ۴ mg/kg (شکل 1b) کاهش یافته است (grade ++) در مقابل (grade+++). ۱Antigen retrieval- در

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]

[DOI: 10.18502/ssu.v30i4.9893]

جداول ۳-۱، 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/kgو ۲ mg/kg باعث افزایش بیان Bcl2 که یک پروتئین آنتی آپوپتوز است گردیده 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 عدد۰/۵۲=P بین غلظت ۴ mg/kg و ۲ mg/kgمشهود است. اگرچه از لحاظ اماری معنی‌دار ۰/۰۵>P. در جدول ۳ تفاوت بیان Caspase9 بین غلظت ۶ mg/kg و ۴ به سطح معنی‌داری خیلی نزدیک است P=0.143، اما معنی‌دار نیست ۰/۰۵>P. در کل نتایج آزمایشات ایمونوهیستوشیمی 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، Casas9 و افزایش بیان آنتی‌آپوپتوتیک Bcl2 به‌خصوص در غلظت‌های۶ mg/kg و ۴ ملاتونین تاحدودی وابسته به دوز می‌باشد.



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

کاهش بیان BAX در دوز ۶ mg/kg ملاتونین (شکل a۱) نسبت به دوز ۴ mg/kg (شکل b۱) و افزایش بیان پروتئین آنتی آپوپتوز BCl2 در دوز ۶ mg/kg ملاتونین (شکل G۱) نسبت به دوز ۴ mg/kg (شکل H۱) و دوز ۲ mg/kg (شکل I۱) و کاهش بیان پروتئین آپوپتوتوز Caspase ۹ در دوز ۶ mg/kg ملاتونین (شکل D۱) در برابر دوز 4mg/kg (شکل b۱)

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]
[DOI: 10.18502/ssu.v30i4.9893]

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

	+++ (بیان قوی پروتئین Bcl2) تعدادلام	++&+ (بیان متوسط و ضعیف پروتئین Bcl2) تعدادلام	جمع تعدادلام	درجه معنی داری تست فیشر (دووجهی)
۲ میلی‌گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی‌لیتر متادون	۱	۵	۶	
۴ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی لیتر متادون	۱	۳	۴	۱
۴ میلی‌گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳میلی لیتر متادون	۱	۳	۴	
۶ میلی‌گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳میلی لیتر متادون	۲	۵	۷	۱
2میلی‌گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی لیتر متادون	۲	۳	۵	
۶ میلی‌گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی‌لیتر متادون	۳	۴	۷	۰/۴۳

آزمون فیشر ۰/۰۵ >P: معنی‌دار

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

جدول ۲: نتایج آزمون آماری فیشر در غلظت‌های مختلف ملاتونین و بیان پروتئین (BAX)(بین گروه‌های درمانی)

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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]

[DOI: 10.18502/ssu.v30i4.9893]

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

آزمون فیشر P< ۰/۰۵: معنی دار

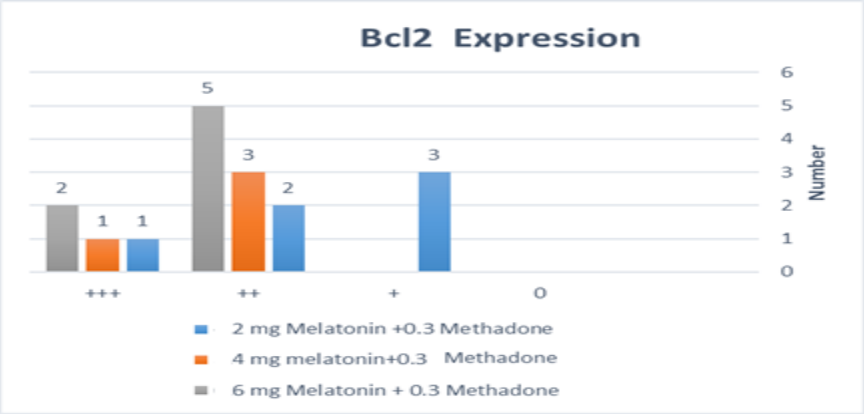
جدول ۳: نتایج آزمون آماری فیشر در غلظت‌های مختلف ملاتونین و بیان پروتئین (Caspase))(بین گروه‌های درمانی)

	+++ (بیان قوی پروتئین Caspase) تعداد لام	++&+ (بیان متوسط و ضعیف پروتئین Caspase) تعداد لام	جمع تعداد لام	درجه معنی‌داری تست فیشر (دووجهی)
۲ میلی‌گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳میلی لیتر متادون	۲	۰	۲	۱
۴ میلی‌گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی لیتر متادون	۳	۱	۴	
۴ میلی‌گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی لیتر متادون	۳	۱	۴	۰/۱۴
۶ میلی گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی لیتر متادون	۰	۳	۳	
۲میلی‌گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳ میلی‌لیتر متادون	۲	۰	۲	۱
۶ میلی‌گرم ملاتونین بر کیلوگرم وزن +۰/۳میلی لیتر متادون	۰	۳	۳	

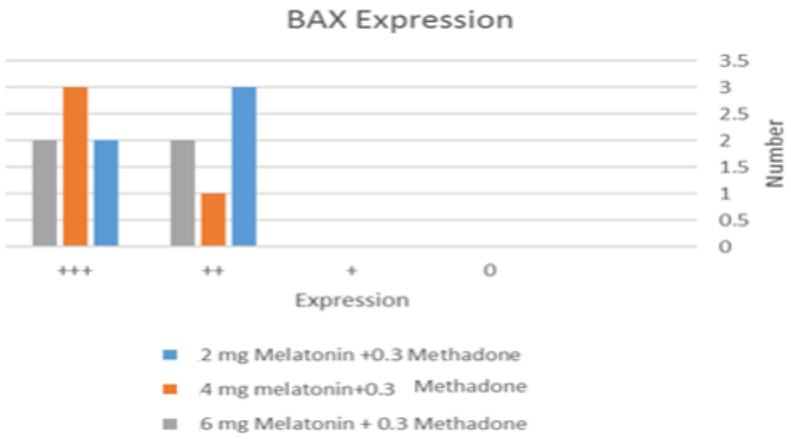
آزمون فیشر P< ۰/۰۵ معنی‌دار

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]

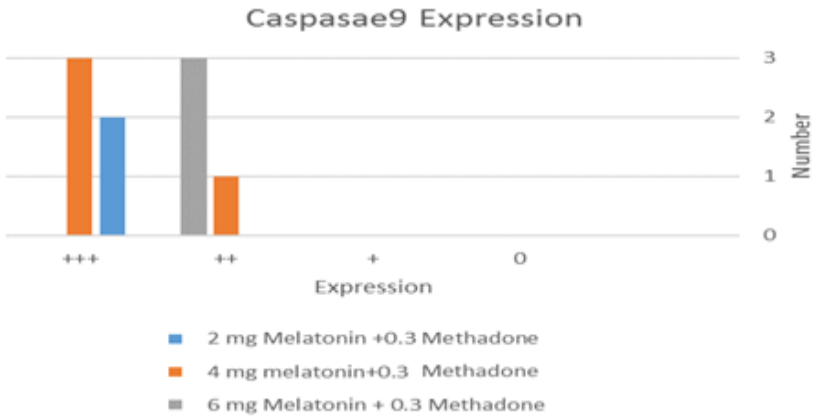
[DOI: 10.18502/ssu.v30i4.9893]



شکل ۲: نتایج بیان Bcl2 درمقادیر مختلف ملاتونین در بافت‌های مختلف،
افزایش بیان ملاتونین در غلظت ۶ mg/kg نسبت به غلظت ۴mg/kg و ۲ mg/kg P <۰/۰۵



شکل ۳: نتایج بیانBAX درمقادیر ملاتونین در بافت‌های مختلف،
کاهش بیان پروتئین آپوپتوز BAX در غلظت ۴mg/kg نسبت به ۲ mg/kg ملاتونین،
P< ۰/۰۵.



شکل ۴: نتایج بیانCaspase9 درمقادیر مختلف ملاتونین در بافت‌های مختلف،
تفاوت قابل توجه بیان بین غلظت ۶ mg/kg و ۴ mg/kg اما معنی‌دار نیست P< ۰/۰۵.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]

[DOI: 10.18502/ssu.v30i4.9893]

بحث

تحقیق حاضر به بررسی تاثیر پیشگیری ملاتونین در آپوپتوز ناشی از تاثیر جنینی متادون در موش سوری می‌پردازد و نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که ملاتونین در یک روند وابسته به دوز باعث کاهش بیان پروتئین‌های آپوپتوز BAX و Caspase3 و افزایش بیان پروتئین آنتی‌آپوپتوتیوز Bcl2 می‌گردد. اگرچه این تاثیرات از لحاظ آزمون آماری فیشر معنی‌دار نبوده است (P<۰/۰۵). براساس مطالعات مختلف مشخص شده که ملاتونین دارای خاصیت انکوستاتیک برروی کانسر به‌خصوص کانسرهای وابسته به هورمون است (۸,۹) برخی مطالعات نشان می‌دهد که فعال‌شدن غده پینه آل یا افزایش جذب ملاتونین باعث کاهش رشد سرعت تومورهای پستانداران می‌گردد. در حالی‌که 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 هورمون‌ها که برای رشد نرمال غدد پستان لازم است می‌گردد. (۷،۱۰). هم‌چنین ملاتونین توانسته اثرات مستقیم بر سلول‌های توموری داشته باشد (۱۱،۱۵). برخی یافته‌ها از مطالعات محققان در مدل‌های حیوانی و یا رده‌های سلولی کانسر پستان دلالت براین موضوع دارد که آثار ضد سرطانی ملاتونین بر تومورهای وابسته به هورمون عمدتاً وابسته به کارائی‌شان از طریق مسیرهای استروژنیک است (۱۳و۱۲) عمدتاً، آثار ملاتونین بر سلول‌های کانسری نه تنها به‌وسیله مکانیسم‌های 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 آنتی‌اکسیدانتی می‌تواند بوجود آید (۱۶،۱۷). شواهدی در رابطه بافعالیت ملاتونین در غشاءمعدی روده‌ای نشان داده شده است. بطوریکه آن‌ها ثابت کرده‌اند که ملاتونین می‌تواند باعث کاهش انقباض خوبه‌خود روده‌ها گردد (۱۹و۱۸). اخیراً مشخص شده است که ملاتونین نه تنها در غشاءگوارشی وجود دارد بلکه برخی یافته‌ها دلالت بر این موضوع دارند که این ماده به‌طور موضعی به‌وسیله دو آنزیم AANAT و HIOMT تولید می‌شود که این آنزیم‌ها در غشاء اپیتلیال رودی بیان می‌شوند. هم‌چنین نشان داده شده است که غلظت ملاتونین در روده ۱۰۰-۱۰ بار بیشتر از سرم است (۱۸،۱۹) ملاتونین هم‌چنین می‌تواند تحریک ترشح بی‌کربنات موکوسی را با تحریک رهاسازی کلسیم در سلول‌های انتروکرومافین رودی را سبب شود (۱۹) ملاتونین از این طریق هم‌چنین می‌تواند بیان NFKβ، TNF-α، IL-1βو STAT3 را کنترل کند. ملاتونین هم‌چنین از طرق دیگر می‌تواند سیستم لنفوسیت و منوسیت/ ماکروفاژ را فعال کرده که از این طریق می‌تواند به عنوان یک عامل;کنترلی ایمنی Immunosurveillant، برای پیشگیری از پیشرفت تومور عمل کند (۲۰). در مطالعه‌ای جدید در بیماری کبد چرب غیر الکل تاثیر ملاتونین در مسیر اپوپتوز-signal (ASK1) regulating kinase بررسی شد و هم‌چنین نشان داده شد با اینکه ملاتونین باعث تغییری در جذب غذا نمی‌شود اما به‌طور علامتی باعث تسکین علائم کبد چرب همچون افزایش وزن و حساسیت به انسولین و تجمع چربی کبدی می‌شود (۲۱) در یک مطالعه هیستولوژیک به‌وسیله 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 مطالعه‌ای جدید در خصوص اثرات محافظتی جنینی ملاتونین درموش صحرایی‌نر F1 در برابر الودگی 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 می‌گردد که از طریق عملکرد مستقیم آنتی‌اکسیدانت و مهار نکروز بافتی این عملکرد محافظتی انجام می‌گردد (۲۳). در مطالعه اخیر توسط Eunsoo Won و همکاران پیشنهاد شده است

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]

[DOI: 10.18502/ssu.v30i4.9893]

که ملاتونین به عنوان یک داروی با پتانسیل بالای محافظت سلولی و عصبی بوده و نشان داده که باعث تحریک تمام مراحل نروپلاستیسیتی 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 تاحدودی باعث کاهش شاخص‌های آپوپتوز گردیده است و مطالعه ناهمسویی مشاهده نشده است. اگرچه در این تحقیق، کاهش بیان پروتئین آپوپتوز و افزایش بیان پرونئین 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.

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 تاحدودی از تاثیرات آپوپتوتوز 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، TNFa وCOX می‌باشد هم‌چنین نیاز به بررسی اثرات آنتی تراتوژنیسیته 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.

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 A4β2 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-Naghibi 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, OstromA R, Slominski A. ***Melatonin Membrane Receptors in Peripheral Tissues: Distribution and Functions***. Mol Cell Endocrinol 2012; 351(2): 152-56.

6-Mehraiin F, Negahdar F. ***Morphological Changes in Acriminal Glands and Ocular Epithelial after***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]

[DOI: 10.18502/ssu.v30i4.9893]

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-Enhance¬Ment: Potential Application in Cancer***. Int J Exp Pathol 2006; 87(2): 81-7

8-Slominski R, Reiter R, Schlabritz-Loutsevitch N, OstromA 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-Andrem M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, et al***. Pineal Gland Hormonemelatonin 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 Trafs-Mediated ASK1 Deubiquitination and Stabilization in a B-Arrestin-1***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]

[DOI: 10.18502/ssu.v30i4.9893]

Dependent Manner. J Pineal Res 2019; 67(4): e12611.

22-Najafi M, Cheki M, Hassanzadeh G, Amini P, Shabeeb D, Eleojo 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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]

[DOI: 10.18502/ssu.v30i4.9893]

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 30| Nov 4 | July 2022

Received: 16 Oct 2021
Accepted: 1 Dec 2021

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

Maryam Akbarzadeh[1], Farkhondeh Nemati[*1], Fatemeh Shaki[2], Abbas Ali Dehpouri Gouibari[1], 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.

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

[2]Pharmaceutical 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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-04-13]

[DOI: 10.18502/ssu.v30i4.9893]