

بررسی اثرات GnRH و نالوکسان در تغییرات سطح سرمی هورمون های LH، FSH و تستوسترون حاصل از تجویز مزمن مورفین در موش صحرایی نر

دکتر مجید اقدسی*، دکتر شهربانو عریان**، دکتر کاظم پریور***

نویسنده‌ی مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست‌شناسی aphan_85@yahoo.com

دریافت: ۸۴/۷/۲ پذیرش: ۸۵/۵/۵

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به استفاده‌ی روزافزون از مواد مخدر و نقش این ترکیبات بر ناباروری انسان، امروزه مراکز تحقیقاتی جهان در پی یافتن ترکیبات فارماکولوژیکی بوده که بتوانند اثرات مواد مخدر را معکوس نموده و معضل ناباروری را از طریق تجویز ترکیباتی نظیر GnRH و آنالوگ‌های آن که اثرات جانبی ناخواسته نیز ندارند، حل نمایند.

روش بررسی: در این مطالعه از موش‌های نر بالغ ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرمی استفاده شد که در زمان‌های مختلف (۵، ۱۰ و ۱۵ روز) مورفین را با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی به موش‌های نر تزریق نموده و هر دوره در ۵ گروه ۸ تایی مورد بررسی قرار گرفتند.

گروه اول، شامل موش‌های دست نخورده بدون هیچ تزریق بود. به گروه دوم سالین، به گروه سوم مورفین، به گروه چهارم نالوکسان و به گروه پنجم فرتاژیل (Fertagyl) تزریق شد. سپس موش‌های هر گروه بی‌هوش شده و خون‌گیری انجام گرفت.

یافته‌ها: بررسی نتایج نشان داد که مورفین باعث کاهش معنی‌داری در وزن و قطر بیضه‌ها، وزن موش‌ها و رفتار آن‌ها از جنبه‌ی تغذیه و اعمال رفتاری شده است. از سوی دیگر بر میزان هورمون LH و تستوسترون تأثیر معنی‌داری در همه‌ی گروه‌ها ($P < 0.05$) مشاهده شده ولی در مورد هورمون FSH تأثیر معنی‌داری مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: با توجه به این که در گروه‌های تجربی که به آن‌ها نالوکسان و GnRH تزریق شد، تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. بنابراین پیشنهاد می‌شود از نالوکسان و GnRH به عنوان آنتاگونیست‌های اویپویدی جهت رفع عقیمی ناشی از اعتیاد به مورفین استفاده شود.

واژگان کلیدی: مورفین، نالوکسان، GnRH، LH، FSH، تستوسترون

مقدمه

مسأله‌ی اعتیاد به مواد مخدر و مشکلات ناشی از آن همواره از مهم‌ترین مسایل اجتماعی و فرهنگی هر جامعه‌ای بوده و قطع داروهای اعتیادآور به علت وابستگی روانی و فیزیکی، موجب بروز عوارضی می‌شود که ترک اعتیاد را

*دکترای تخصصی فیزیولوژی جانوری، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

**دکترای تخصصی فیزیولوژی غدد، دانشیار دانشگاه تربیت معلم تهران و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

***دکترای تخصصی جنین‌شناسی، دانشیار دانشگاه تربیت معلم تهران و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

مشکل می‌سازد. این عوارض را می‌توان با تزریق یک آنتاگونیست نظیر نالوکسان که اثر مورفین را مهار می‌کند، برطرف نمود. پپتیدهای اوپیویدی آندورژن (Endogenous opioid peptides [Eops]) از سه مولکول پیش‌ساز مشتق می‌گردند: پروانکفالین (Pro-opiomelanocortin [POMC])، پری پروانکفالین (Pre pro enkephalin - A) A و پروانکفالین (Pro enkephalin - B) B. تحت تأثیر آنزیم پپتیداز از POMC، β -آندورفین، β -لیپوتروپین، α -آندورفین، γ -آندورفین و هورمون‌های هیپوفیزی ACTH و MSH مشتق می‌شوند. از پری پروانکفالین A ترکیبات مت-انکفالین، α -نیوآندورفین و β -نیوآندورفین مشتق می‌گردند. البته شکسته شدن این مواد در نواحی مختلف مغز تفاوت دارد (۵).

پپتیدهای اوپیویدی و آنالوگ‌های آن سبب کاهش حاد در میزان GnRH و LH در جریان خون شده و تزریق نالوکسان نیز در سیکل طبیعی جنسی زنان باعث افزایش ترشح LH می‌گردد. نتایج تحقیقی که در سال ۱۹۹۳ انجام شد و اثرات نالوکسان را به عنوان یک آنتاگونیست اوپیویدی بر روی غلظت LH و FSH در پلاسمای مادیان در طی مراحل سیکل استروس (Estrous) اندازه‌گیری نمود، نشان داد که در خلال فاز فولیکولی نالوکسان تأثیری بر غلظت پایه‌ی FSH و LH نداشته ولی افزایش معنی‌داری را بر روی غلظت FSH و LH در خلال فاز لوتیال نشان می‌دهد (۱، ۲). یافته‌های پژوهش دیگری در سال ۱۹۹۹ نشان داد که تجویز سیستمیک اوپیوید، متانکفالین و بتاآندورفین سطوح گنادوتروپین‌ها را در پلازما کاهش داده و یک اثر مهاري بر روی آنزیم‌های بیضه‌ای، از قبیل هیالورونیداز و اسیدفسفاتاز داشته است. در این پژوهش وقتی به حیوانات نالوکسان (آنتاگونیست اوپیوید) تجویز گردید، مشاهده شد که این تأثیر یا به طور مستقیم به واسطه‌ی آنتاگونیست‌های پپتیدهای اوپیویدی بر روی گنادها بوده یا از

طریق سطوح خونی گنادوتروپین ایجاد می‌شود (۳). نتایج تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که اثرات نالوکسان وابسته به میزان استرویدهای گنادی بوده و بیشترین پاسخ زمانی حاصل می‌گردد که میزان استروژن جریان خون افزایش یافته و استروید گنادی کاهش می‌یابد (۴). طی تحقیقی در سال ۲۰۰۲ با تجویز مورفین به مدت ۳ روز و به دنبال آن نالوکسان با دوزهای یک میلی‌گرم در هر کیلوگرم مجدداً رفتارهای عادی از جمله رفتار جنسی مشاهده شد (۶). با توجه به شواهد موجود در خصوص ارتباط بین نالوکسان و هورمون‌های جنسی، در مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین تأثیر نالوکسان و GnRH بر ترشح LH، FSH و تستوسترون در موش صحرایی نر به دنبال تجویز مزمن مورفین مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

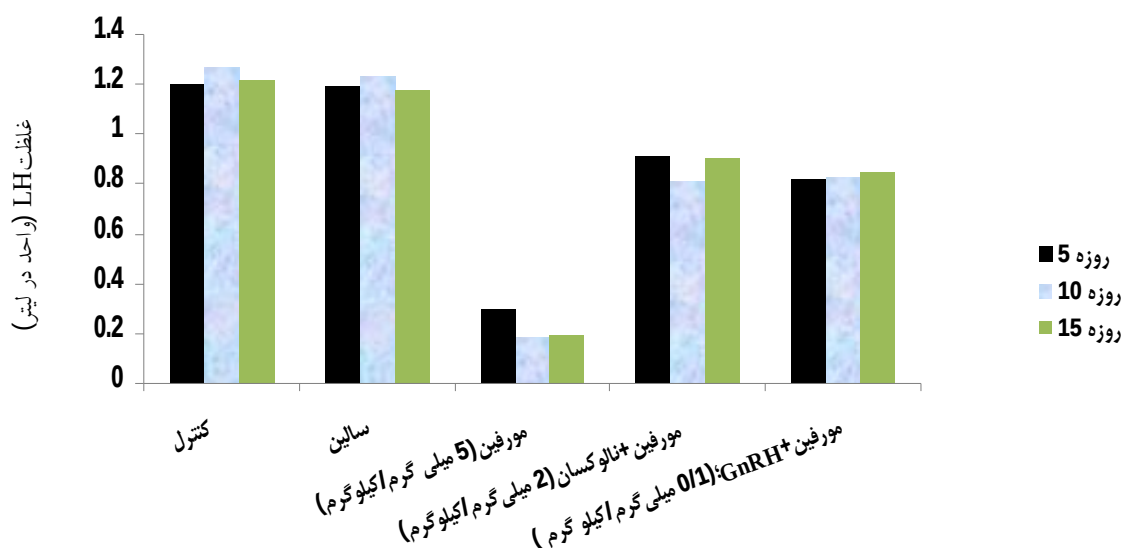
این مطالعه تجربی در سال ۸۰ تا ۸۱ در شهر تهران بر موش‌های نر نژاد ویستار بالغ با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم انجام گردید. موش‌های مورد نیاز از مؤسسه‌ی سرم‌سازی رازی (حصارک کرج) خریداری گردید و به منظور سازگاری، موش‌ها در قفس‌های پلاستیکی دارای در فلزی نگهداری شدند. بستر قفس‌ها با خاک اره پوشیده و هر روز تمیز شد. آب و غذا به اندازه‌ی کافی در دسترس موش‌ها قرار گرفت. حیوانات در محیطی با دمای متغیر طی فصول تابستان و زمستان در دامنه 5 ± 22 درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت ۴۴ تا ۵۵ درصد نگهداری شدند. حیوانات تحت دوره‌ی نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بوده و از جبهه‌های غذای آماده، تهیه شده از شرکت خوراک دام و طیور پارس تغذیه می‌شدند. آب شرب حیوانات نیز از آب لوله‌کشی تأمین می‌شد. در این مطالعه، موش‌ها به ۵ گروه تقسیم شدند، هر گروه شامل ۸ موش بوده و به شرح زیر تفکیک شدند؛ گروه کنترل (Intact) و شام (sham) و سه گروه تجربی

یک میلی لیتر GnRH تزریق و سپس موش‌ها بی‌هوش شده و خون‌گیری انجام گرفت. اطلاعات مربوط به سطوح هورمون‌های LH, FSH و تستوسترون در گروه‌های مختلف با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون ANOVA یک طرفه و تست Tukey مورد مقایسه قرار گرفتند.

یافته‌ها

مورفین آزادسازی LH را مهار کرده و با کاهش وزن بیضه و تعداد سلول‌های لایدیگ می‌تواند بر فعالیت استروئیدی بیضه اثر مستقیمی داشته به طوری که موجب کاهش ترشح هورمون تستوسترون نیز گردیده است. مقایسه‌ی LH بین گروه‌های کنترل و شم در دوره‌های زمانی ۱۰، ۵ و ۱۵ روزه نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین این گروه‌ها وجود ندارد. اما سطح LH سرم خون گروه‌های تجربی که مورفین دریافت کرده بودند با گروه‌های کنترل تفاوت معنی‌داری ($P < 0.05$) داشت. هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تجربی که مورفین و به دنبال آن نالوکسان و هم‌چنین مورفین و به دنبال آن GnRH دریافت کرده بودند با گروه‌های کنترل مشاهده نشد (نمودار ۱).

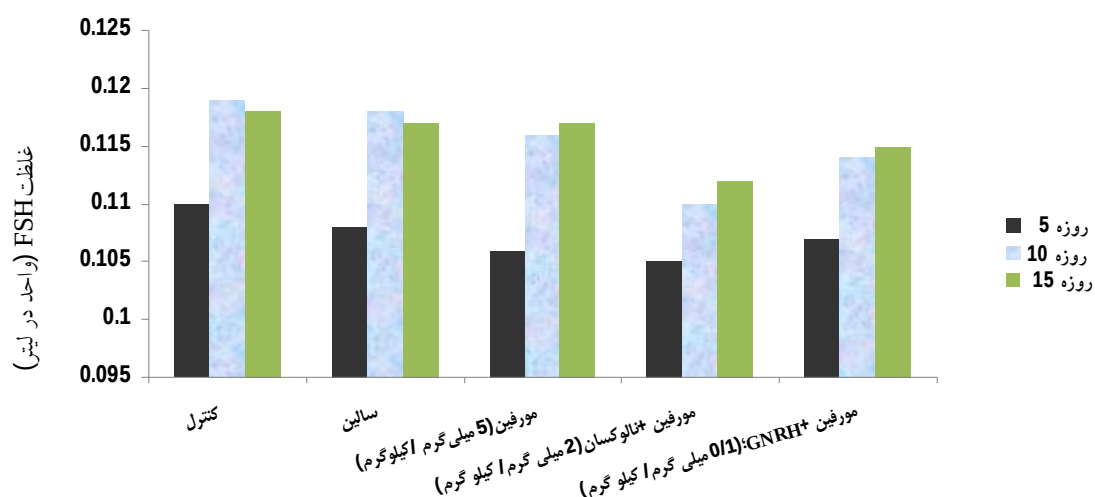
(Experiment). که در گروه کنترل هیچ تزریقی انجام نگرفت. در گروه دوم (شم) یک میلی لیتر سالیین در روزهای مختلف (۵، ۱۰ و ۱۵ روز) به صورت داخل صفاقی تزریق و سپس موش‌ها بی‌هوش شده و خون‌گیری انجام گرفت. در گروه سوم یک میلی لیتر مورفین به میزان ۵ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه در روزهای مختلف (۵، ۱۰ و ۱۵ روز) به صورت داخل صفاقی تزریق شد و پس از بی‌هوش کردن موش‌ها توسط کلروفرم، از قلب حیوان به وسیله‌ی سرنگ حدود ۵ میلی لیتر خون گرفته شد. لوله‌ی آزمایش محتوی خون در سانتریفیوژ با قدرت ۳۰۰۰ g دور در دقیقه به مدت نیم ساعت قرار داده شد و سرم خون جدا و فریز گردید. برای سنجش هورمونی از روش رادیوایمونواسی (R.I.A) استفاده شد. در گروه چهارم یک میلی لیتر مورفین با همان مقدار به صورت روزانه و در روزهای مختلف (۵، ۱۰ و ۱۵ روز) به صورت داخل صفاقی و به دنبال آن به هر کدام در روز آخر یک میلی لیتر نالوکسان به میزان دو میلی گرم بر کیلوگرم برای هر دوره تزریق شد و سپس موش‌ها بی‌هوش شده و خون‌گیری انجام گرفت. در گروه پنجم، علاوه بر تزریق مورفین مشابه گروه چهارم در روز آخر هر دوره، به هر گروه



نمودار ۱: اثر مورفین، مورفین + نالوکسان و مورفین + GnRH بر روی LH سرم خون رت (تیمار ۵ روزه، ۱۰ روزه، ۱۵ روزه)

تستوسترون سرم نشان داد که تفاوت معنی داری بین گروه های کنترل و شم وجود ندارد، اما سطح تستوسترون سرم خون گروه های تجربی که مورفین (۵، ۱۰ و ۱۵ روز) دریافت کرده بودند با گروه کنترل تفاوت معنی داری ($P < 0.05$) داشت (نمودار ۳).

مقایسه ی FSH بین گروه های مختلف تجربی، کنترل و شم (۵، ۱۰ و ۱۵ روز) نیز نشان داد که تفاوت معنی داری بین آنها وجود ندارد، به طوری که مورفین تأثیری بر میزان FSH نداشته است (نمودار ۲). در بررسی سطح هورمون



نمودار ۲: اثر مورفین، مورفین + نالوکسان و مورفین + GnRH بر روی FSH سرم خون رت (تیمار ۵ روزه، ۱۰ روزه و ۱۵ روزه)

هم چنین هیچ تفاوت معنی داری بین تیمارهای مختلف (۵، ۱۰ و ۱۵ روز) بین گروه های تجربی که مورفین و به دنبال آن نالوکسان یا GnRH دریافت کرده بودند با گروه های کنترل مشاهده نشد.



بحث

اثر مورفین بر بدن با کاهش مصرف غذا و کاهش وزن بدن و وزن بیضه‌ی موش‌ها همراه است. مورفین با دوز ۵ میلی‌گرم به ازای هرکیلوگرم وزن بدن موجب کاهش معنی‌داری در غلظت LH و تستوسترون سرم شده که با تزریق نالوکسان، تفاوت معنی‌داری در غلظت این هورمون‌ها مشاهده نشده است، گزارشات مختلفی در مورد تأثیر اوپیوئیدها بر مهار ترشح LH پایه در موش‌های نر و ماده ارائه شده است. در این پژوهش اثرات GnRH و نالوکسان در تغییرات سطح سرمی هورمون‌های LH و تستوسترون حاصل از تجویز مزمن مورفین در موش صحرایی نر مورد بررسی قرار گرفته است. اثرات پپتیدهای اوپیوئیدی در مهار ترشح FSH بسیار کم‌تر از اثرات آن بر ترشح LH بوده و نالوکسان سبب آزادسازی LH می‌گردد (۷). به نظر می‌رسد محل اثر اوپیوئید در تنظیم ترشح گنادوتروپین در درجه‌ی اول در سطح هیپوتالاموس باشد. مورفین سبب افزایش و نالوکسان سبب کاهش ترشح گنادوتروپین‌ها می‌گردد. برخی مطالعات پیشنهاد می‌کنند که جایگاه‌های غیرهیپوتالاموسی نیز در آمیگدال وجود دارند که اثرات پپتیدهای اوپیوئیدی بر ترشح LH را میانجی‌گری می‌کنند. احتمالاً این مناطق بر روی رفتار جنسی، ترشح GnRH و پپتیدهای اوپیوئیدی دخالت دارند (۸).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۳ انجام شد، تزریق مورفین و سالین زیرپوستی به ترتیب با میزان ۵ و یک میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۳۰ روز انجام شد، استفاده از مورفین به طور معنی‌داری موجب کاهش سطح تستسترون و LH شد، اما بر سطح سرمی FSH در مقایسه با گروه کنترل کاهشی نشان نداد. برخی از محققان پیشنهاد می‌کنند که تأثیر اوپیوئیدها بر روی آزادسازی تستوسترون به واسطه‌ی محور هیپوتالاموسی - هیپوفیزی - گنادی و نه مکانیسم بیضه‌ای می‌باشد، به طوری که ارایه‌ی مورفین در خلال بلوغ برای زمان طولانی موجب برهم‌زدن سیستم آندوکرینی در موش‌های نر می‌شود (۹). بر اساس گزارش برخی از تحقیقات سیستم‌های دوپامینرژیک و سروتونینرژیک در محل پپتیدهای اوپیوئیدی دخالت داشته ولی در ارتباط با کنترل ترشح LH اثرات متقابل اوپیوئید - آدرنرژیک مطرح می‌باشد. امروزه نقش سیستم آدرنرژیک هیپوتالاموس در کنترل آزادسازی GnRH مشخص گردیده است. بنابراین اوپیوئیدها ممکن است، آزادسازی LH را با کاهش قدرت تحریکی آدرنرژیکی به نورون‌های GnRH مهار نمایند. به این ترتیب پپتیدهای اوپیوئیدی می‌توانند سبب کاهش فعالیت نورآدرنرژیک در هیپوتالاموس شوند. نالوکسان به عنوان یک آنتاگونیست اوپیوئیدی سبب آزادسازی LH گردیده و این عمل را از طریق افزایش سیستم نورآدرنرژیک در هیپوتالاموس به ثمر می‌رساند (۱۱، ۱۰).

این نکته که کدام یک از انواع شناخته شده Eops ترشح GnRH را کنترل می‌نمایند هنوز ناشناخته است، اما نکته‌ی مسلم آن است که بیش از یک پپتید ممکن است در این امر دخالت داشته باشند. مورفین به عنوان یکی از مهم‌ترین مهارکننده‌ها در این زمینه مطرح می‌باشد و مطالعات نشان می‌دهند که گیرنده‌های مو (mu) به عنوان یک گیرنده‌ی اوپیوئیدی، در کنترل اوپیوئیدها بر ترشح LH مؤثر است. اگرچه مطالعات اخیر نشان می‌دهند که رسپتورهای دلتا نیز در تأثیر β - آندورفین بر آزادسازی LH مؤثر هستند. اوپیوئیدها

همچنین در تنظیم بلوغ در موش‌های صحرایی ماده دخالت دارند زیرا یک ارتباط معکوس بین فعالیت تولیدمثلی در بلوغ و میزان β - آندروفین هیپوتالاموسی و هیپوفیزی مشاهده گردیده است (۱۲، ۱۳).

نتایج به دست آمده از این کار پژوهشی بیانگر آن است که مورفین آزادسازی LH را مهار کرده و بدون تأثیر بر روی FSH، با کاهش تعداد سلول‌های لایدیگ می‌تواند بر فعالیت استرویدی بیضه‌ها اثر مستقیمی داشته باشد که موجب کاهش ترشح هورمون تستوسترون نیز می‌گردد (۱۴). مکانیسم عمل مورفین به این صورت است که می‌تواند به صورت مستقیم بر آزادسازی فاکتورهای هیپوتالاموسی اثر کرده یا همراه با دیگر نوروترانسمیترهای تنظیمی عمل کنند. امروزه نقش چندین نوروترانسمیتر دیگر از جمله دوپامین، سروتونین، آدرنالین، نورآدرنالین، استیل‌کولین و هیستامین در این ارتباط آشکار شده است (۱۵).

اوپیوئیدها نمی‌توانند آزادسازی LH را از کشت هیپوفیزی مجزا شده در *in vitro* تحت تأثیر قرار دهند و بنابراین نمی‌توانند عمل LHRH را مهار نمایند (۹). افزایش ترشح LH به دنبال استفاده از نالوکسان نشان داده است که در نواحی ترشحی ناحیه‌ی پره‌اوپتیک (Preoptic) میانی، هسته‌ی قوسی (Arcuate Nucleus) و برجستگی میانی (Median Eminence) مکان‌های مؤثرتری هستند (۳).

اوپیوئیدها یا به طور مستقیم بر نورون‌های LHRH در هیپوتالاموس جهت تنظیم، انتشار یا آزادسازی نوروهورمون

منابع

به داخل گردش خون باب هیپوفیزی عمل می‌نمایند، یا آن که احتمالاً در ارتباط با دیگر سیستم‌های نوروترانسمیتری عمل نموده که به نوبه‌ی خود ترشحات نورونی LHRH را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۱۶). اوپیوئیدهای صناعی و پپتیدهای اوپیویدی فعالیت نورون‌های کاتکولامینرژیک مغز را تحت تأثیر قرار می‌دهند. تأثیر تنظیمی نوراپی‌نفرین به عنوان یک نوروترانسمیتر بر ترشح LH اثبات شده است. نتایج فوق مؤید آن است که ممکن است GnRH به عنوان یک آنتاگونیست بر روی اثر مهاری مورفین در ترشح LH و تستوسترون در موش صحرایی نر نقش داشته باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاضر بیانگر این مطلب است که احتمالاً می‌توان از اثرات GnRH و آنتاگونیست‌های اوپیویدی مثل نالوکسان جهت رفع عقیمی رت‌های معتاد به واسطه‌ی اوپیوئیدها استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

این پژوهش به صورت پایان‌نامه‌ی دوره‌ی تحقیقات مقطع دکتری و مصوب دانشگاه آزاد اسلامی تهران می‌باشد. به این ترتیب نویسندگان از آن دانشگاه سپاسگزاری می‌نمایند.

- 1- Baum MJ. Brain opioids and sexual behavior in the male rats. *Brain Res.* 1998; 769: 216 - 28.
- 2- Behrens C, Aurich JE, Klug E, Namann H, Hoppen HO. Inhibition of gonadotrophin release in mares during the luteal phase of the oestrous cycle by endogenous opioids. *Jornal Reprod Fertile.* 1993; 98: 509-140

- 3- Laxmi M, Vijayan E. Effect of chronic systemic administration of opioid peptides, Naloxone and N-acetyl β -endorphin antiserum on gonadotropins and testicular functions in the rat. *Indian J Exp Biolo.* 1988; 36: 255-61.
- 4- Baum M. Neuroendocrinology of sexual behavior in the male. *J Pharmacol.* 2002; 22: 97-130.
- 5- Cicero Tj, Ennis T, Ogden J, Mayer E. Gender difference in the reinforcing properties of morphine. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000; 65: 91-6.
- 6- Cicero Tj, Nack B, Mayer ER. Gender linked difference in the expression of physical dependence in the expression of physical dependence in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002; 72: 691-7.
- 7- Mc Connell SK, Baum M. Lack of correlation Between naloxone- induced changes in sexual behavior and serum LH in male rats. *Horm Behav.* 1997; 147: 16-35.
- 8- Bruni J. Effects of Naloxone, Morphine and methionine enkephalin on serum PRL, LH, TSH and GH. *Life Sci.* 1997; 21: 461-6.
- 9- Yilmaz B, Konar V, Sandal S. Influnce of chronic Morphine Exposur on serum LH, FSH, Testosterone levels in the Developing male rats. *Physiol Behav.* 2003; 282: 189 - 96.
- 10- Bakker J, Baum M. Effect of gonadal steroids on pituitary LH secretion, and mediobasal hypothalamic GnRH mRNA in ferrets. *J Reprod Fertility.* 2000; 205: 315 - 21.
- 11- Bakker J, Baum M. Neuroendocrine regulation of GnRH release induced ovulators. *Front in Neuroendocrinology.* 2000; 21: 220- 62.
- 12- Stoffel E, Ulibarri CM, Folk JE, Craft RM. Gonadal hormone modulation of mu, kappa, and delta opioid antinociception in male and female rats. *J pain.* 2005; 6: 261 - 74.
- 13- Cicero T, Aylward S, Mayer E. Gender differences in intravenous self-administration of mu opiate agonists. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003; 74: 541-9.
- 14- Bhanot R, Wilkinson M. Opiatergic control of LH secretion is eliminated by gonadectomy. *Endocrinology.* 1983; 112: 399 - 1.
- 15- Bhanot R, Wilkinson M. Opioidergic control of gonadotrophin secretion during the puberty in the rat. *Endocrinology.* 1983; 113: 596 -3.
- 16- Klara PS, Sahu A. Kalra SP. Opiate induced hyper sensitivity to testosterone feedback, pituitary involvement. *Endocrinology.* 1988; 122: 977 - 3.