Research Paper

Survey on the interaction effect of low doses of ketamine on morphine-induced polycystic ovary syndrome in rat

Masoumeh Bakhtyari[1], Manizheh Karami*[1], Mohammadreza Jalali Nadoushan[2], Fatemeh Babaei Sosahab[1]

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran
2. Department of Pathology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

*** Corresponding author e-mail:** karami@shahed.ac.ir

Citation: Bakhtyari M, Karami M, Jalali Nadoushan MR, Babaei Sosahab F. Survey on the interaction effect of low doses of ketamine on morphine-induced polycystic ovary syndrome in rat. Daneshvar Medicine 2021; 29(3):29-41.
doi: 10.22070/DANESHMED.2021.14147.1055

Abstract

Background and Objective: Morphine can induce PCOS (Polycystic ovary syndrome) probably by changing glutamate level at the hypothalamic nuclei. This study used low doses of ketamine to survey the interaction of ketamine with morphine-induced PCOS.

Materials and Methods: 48 female Wistar rats were selected as virgins in the weight range of 220-250 g, and categorized randomly into eight groups. The first group received morphine (5 mg/kg) intraperitoneally. The second to fourth groups received ketamine (1, 2, and 4 mg/kg). In groups 5 to 7, the ketamine (1, 2, and 4 mg/kg) was pre-injected to morphine (5 mg/kg) over a period of 20 min. Control group received only saline (1 ml/kg). After 48 h, the blood and serum specimens were provided to record hormone levels, and the animals' ovaries and uteri were biometrically examined and stained by H & E. Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) under α =0.05.

Results: The morphine as well as single ketamine induced the PCOS. However, taking ketamine prior to morphine caused a meaningful reduction in the number of cysts in the ovary. There was also a relative increase in uterine diameter in the group receiving morphine, which was stopped due to ketamine pre-treatment. These effects showed correlation with decreased levels of FSH, and change in estrogen, and prolactin amounts.

Conclusion: The interference effect of ketamine with morphine is completely dependent on changes in gonadotropin level.

Keywords: Morphine, Ketamine, low dose, polycystic ovary syndrome, Rat

Received: 13 Feb 2021
Last revised: 26 May 2021
Accepted: 29 May 2021

مقاله پژوهشی

بررسی اثر تداخلی دوزهای پایین کتامین با سندروم تخمدان پلی کیستیک القاء شده با مرفین در موش بزرگ آزمایشگاهی

نویسندگان: معصومه بختیاری[1]، منیژه کرمی*[1]، محدرضا جلالی ندوشن[2]، فاطمه بابایی سوسهاب[1]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۲. گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: منیژه کرمی **Email: karami@shahed.ac.ir**

چکیده

مقدمه و هدف: مرفین احتمالاً با تغییر سطح گلوتامات در هسته های هیپوتالاموسی باعث القای Polycystic ovary syndrome (PCOS) می‌شود. در این پژوهش اثر تداخلی دوزهای پایین کتامین با PCOS ناشی از مرفین بررسی شد.

مواد و روش ها: ۴۸ سر موش ماده نژاد ویستار باکره در محدوده وزنی ۲۲۰-۲۵۰ گرم انتخاب و به طور تصادفی در هشت گروه دسته بندی شدند. گروه اول مرفین (۵ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی دریافت کرد. گروههای دوم تا چهارم کتامین دریافت کردند (۱، ۲، ۴ میلی گرم بر کیلوگرم). در گروههای ۵ تا ۷، کتامین (۱، ۲، ۴ میلی گرم بر کیلوگرم) ۲۰ دقیقه جلوتر از مرفین (۵ میلی گرم بر کیلوگرم) تزریق شد. گروه کنترل فقط سالین (۱ میلی لیتر بر کیلوگرم) گرفت. پس از ۴۸ ساعت، نمونه‌های خون و سرم برای تعیین سطوح هورمونی تهیه گردید و تخمدان و رحم حیوانات بیومتری و به کمک هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی شدند. تجزیه و تحلیل آماری با آنالیز واریانس (ANOVA) تحت $\alpha = ۰/۰۵$ انجام شد.

نتایج: مرفین و کتامین تنها موجب القای PCOS شدند. با این حال، تجویز کتامین قبل از مرفین، باعث کاهش معنی دار تعداد کیست در تخمدان گردید. همچنین در گروه دریافت‌کننده مرفین، افزایش نسبی قطر رحم مشاهده شد که این امر به دلیل پیش تیمار کتامین متوقف شد. این اثرات با کاهش سطح FSH و تغییر مقادیر استروژن و پرولاکتین ارتباط نشان داد.

نتیجه گیری: اثر تداخلی کتامین با مرفین کاملاً به تغییر در سطح هورمون گنادوتروپین بستگی دارد.

واژه های کلیدی: مرفین، کتامین، دوز پایین، سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، موش بزرگ آزمایشگاهی

دریافت: ۱۴۹۹/۱۱/۲۵
آخرین اصلاح‌ها: ۱۴۰۰/۰۳/۰۵
پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۰۸

مقدمه

سندروم تخمدان پلی‌کیستیک[1] (PCOS) یک اختلال هورمونی و متابولیکی شایع در زنان سراسر جهان می‌باشد که سبب اختلالات تولیدمثلی، اندوکراینی و متابولیکی می‌شود (۱). اختلال در چرخه قاعدگی، هایپرآندروژنیسم و مقاومت انسولینی در این بیماری دیده می‌شود (۲). هرچند علت PCOS به طور دقیق مشخص نشده است، اما می‌توان گفت این عارضه، ترکیبی از یک بیماری ژنتیکی و تحت تاثیر عوامل داخلی و محیطی می‌باشد (۳). ابتلا به PCOS سبب بروز سندروم های متابولیکی و بیماری های قلبی عروقی شده و خطر ابتلا به سرطان اندومتر را افزایش می‌دهد. همچنین در PCOS چاقی و مقاومت به انسولین به عنوان دو معیار مهم شناخته می‌شود (۴). در این بیماری، الگوی ترشحی نابجایی که برای GnRH[2] وجود دارد، سبب افزایش پالس‌های ترشحی LH[3]، نقص در ترشح FSH[4] و تحت تاثیر این LH اضافی، هایپرآندروژنیسم تخمدانی می‌شود که این امر موجب اختلال تکوین فولیکولی و عدم تخمک‌گذاری می‌شود (۵). مطالعات مختلف بیانگر تاثیر نامطلوب مواد مخدر بر سیستم تولیدمثلی است برای مثال طبق شواهد مرفین با فرآیندهای تخمدانی تداخل داشته و باعث کاهش باروری می‌شود (۶). مرفین[5]، نوعی اپیوئید[6] بسیار قوی است که از تریاک به دست می‌آید. مکانیسم اثر مرفین از طریق تاثیر بر دستگاه عصبی مرکزی می‌باشد (۷). به طورکلی اپیوئیدها دارای دو اثر ثابت شده بر روی نورون‌ها هستند که یکی انسداد کانال های کلسیمی دریچه دار حساس به ولتاژ موجود در پایانه‌های عصبی پیش‌سیناپسی است که این روند منجر به کاهش آزادسازی ناقلین عصبی مانند گلوتامات و کلسی‌تونین می‌شود و دیگری بازشدن کانال های پتاسیمی موجود در پایانه‌های عصبی پس‌سیناپسی که این امر به هایپرپلاریزاسیون و مهار نورون‌ها می‌انجامد (۸). مرفین، طبق یافته‌ها ترشح LH را در پاسخ به GnRH افزایش می‌دهد (۹،۱۰). این ماده اپیوئیدی همچنین، باعث مهار کلیرانس کبدی انسولین و تحریک تولید انسولین توسط لوزالمعده می‌شود که این دو مکانیسم به بروز هایپرانسولینمی می‌انجامند که تمام این اتفاقات در اختلال PCOS مشاهده شده است. نهایتا افزایش سطح انسولین و LH منجر به تولید آندروژن اضافی توسط تخمدان ها و بروز مقاومت به انسولین می‌شود (۱۱). مصرف مزمن اپیوئیدها می‌تواند منجر به بروز سندروم تخمدان پلی‌کیستیک گردد (۱۲). مطالعات نشان داده‌اند که تزریق محیطی مرفین سبب ایجاد PCOS و موجب افزایش ضخامت دیواره های فولیکول‌های کیستیک شده می‌شود (۱۵-۱۳). تاکنون در زمینه‌ی تاثیر مواد مخدر مخصوصا مرفین بر سیستم تولیدمثل، مطالعات مختلفی به ویژه در سال‌های اخیر صورت گرفته شده است. اما در خصوص مکانیسم‌های دقیق تاثیر مرفین بر فرآیند کیست‌زایی در ایجاد عارضه PCOS، صرفا پیشنهاداتی صورت گرفته و به طور دقیق به همه‌ی ابعاد این مسئله پرداخته نشده است و سازوکارهای آن همچنان ناشناخته مانده است لذا در این پژوهش، اثر تداخلی سیستم گلوتاماتی به واسطه مهار گیرنده‌های اختصاصی گلوتامات توسط کتامین (در دوزهای زیر بیهوشی) بر کیست‌زایی القایی مرفین در موش بزرگ آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از تعداد ۴۸ سر موش بزرگ آزمایشگاهی ماده نژاد ویستار در محدوده‌ی وزنی ۲۵۰-۲۲۰ گرم استفاده گردید. این حیوانات به صورت باکره در مرکز نگهداری و پرورش حیوانات آزمایشگاهی در قفس‌های استاندارد نگهداری و به کمک تست پاپ اسمیر بررسی شدند و بعد از تشخیص فاز دی‌استروس، از آن‌ها برای ایجاد مدل PCOS به کمک تزریق داخل صفاقی مرفین (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) استفاده گردید (گروه بندی حیوانات هم‌فاز -دارای فاز دی‌استروس- به صورت تصادفی). این حیوانات پس از یک هفته سازگاری، در زمان های معینی طبق برنامه‌ریزی و بر اساس کد اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی (IR.SHAHED.REC.1398.100) (بعد از گذراندن دوره‌های کسب مهارت کار با حیوانات) وارد پژوهش شدند.

[1] Polycystic ovary syndrome
[2] Gonadotropin Releasing Hormone
[3] Luteinizing hormone
[4] Follicle-stimulating hormone
[5] Morphine
[6] Opioids

داروهای مورد استفاده

مرفین (مرفین سولفات، خرید از شرکت تماد با مجوز رسمی از وزارت بهداشت)، کتامین (K2753-1G- تهیه شده از شرکت Sigma با درجه خلوص بسیار بالا) و هماتوکسیلین-ائوزین (خرید از شرکت فرزانه آرمان-تهران).

روند تجویز دارو

حیوانات پس از بررسی فاز استروس به طور تصادفی به ۸ گروه آزمودنی و کنترل تقسیم شدند. به گروه اول به عنوان گروه کنترل (۶ سر) طی آزمایش تنها سالین (۱ میلی‌لیتر/کیلوگرم) داده شد. به گروه دوم مرفین (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم)، به گروه‌های سوم تا پنجم کتامین (۱ و ۲ و ۴ میلی‌گرم/کیلوگرم) و به گروه‌های ششم تا هشتم، ۲۰ دقیقه پیش از تزریق مرفین (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم)، کتامین (۱ و ۲ و ۴ میلی‌گرم/کیلوگرم) تزریق شد. شیوه تزریق داخل صفاقی بود.

خون‌گیری

۴۸ ساعت پس از تجویز، از ناحیه‌ی بطنی قلب حیوانات خون گرفته شد و نیم ساعت بعد، نمونه‌های سرم توسط دستگاه سانتریفیوژ (با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و مدت زمان ۵ دقیقه) جدا گردید. نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا دو هفته (به منظور تکمیل سنجش‌های هورمونی) نگهداری شدند. آنالیزهای سرولوژیک شامل سنجش سطح هورمون‌های FSH، LH، استروژن، پروژسترون و پرولاکتین به روش الایزا انجام پذیرفت.

بافت‌شناسی و آسیب‌شناسی نمونه‌های تخمدان و رحم

بعد از خون‌گیری از حیوان، ابتدا حیوان تحت دستگاه گاز CO2 یوتانزی (مرگ خوب) شد و سپس تحت جراحی قرار گرفت: ابتدا با کمک یک برش میانی شکمی، شاخ‌های رحم و تخمدان موش‌ها قابل مشاهده گردید. قبل از جداکردن بافت، با استفاده از کولیس طول، عرض و قطر تخمدان و بخش یک سوم میانی شاخ رحمی اندازه‌گیری و سپس هر کدام از تخمدان‌های راست و چپ و رحم به صورت مجزا، به داخل ظروف Urine bottle حاوی فرمالین ۱۰٪ منتقل و پس از گذشت حداقل ۴۸ ساعت (بهترین زمان ۴۸ تا ۷۲ ساعت) بافت‌ها برای برش‌گیری و رنگ آمیزی آماده شدند.

برش‌گیری و رنگ‌آمیزی نمونه‌های بافتی

شامل مراحل زیر بود: ۱) تثبیت بافت‌ها، ۲) نمونه‌برداری، ۳) آبگیری و آغشتگی، ۴) قالب‌گیری، ۵) برش با میکروتوم، ۶) رنگ‌آمیزی، ۷) مونتاژ لام و لامل گذاری. در مرحله تثبیت که بلافاصله بعد از جداسازی نمونه‌های بافتی و جهت حفظ ساختمان فیزیکی بافت و جلوگیری از اتولیز انجام شد، نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شدند و برای آبگیری و آغشتگی از دستگاهی به نام تیشو پروسسور (Tissue Processor) استفاده گردید و برش‌های ۴-۳ میکرومتری تهیه و در نهایت پس از رنگ‌آمیزی، مونتاژ بر روی سطح لام و سرانجام لامل‌گذاری انجام شد.

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین

در این مرحله، برای پارافین زدایی، ابتدا نمونه‌ها ۳ مرتبه (هر بار به مدت ۵ دقیقه) در ظرف حاوی گزیلول قرار داده شدند. سپس ۴ مرتبه در الکل با درجات نزولی (در هر رقت به مدت ۲ دقیقه) قرار و در ادامه با آب مقطر شستشو داده شدند. بلافاصله بعد از شستشو، نمونه ها در ظرف حاوی هماتوکسیلین ۲۰٪ به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه قرار گرفته، سپس با آب مقطر شستشو و در ادامه در ظرف اسیدالکل شناور شدند. بعد نوبت به کربنات کلسیم رسید. سپس در رنگ ائوزین شناور شدند که این امر سبب می‌شود تا سیتوپلاسم قرمز به نظر برسد. بعد از چندثانیه نمونه‌ها با آب مقطر شستشو داده شده، سپس داخل ۴ ظرف حاوی الکل با درجات صعودی (۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۹۶) هر کدام به مدت ۳ دقیقه قرار گرفتند. در نهایت نمونه‌ها در دو ظرف حاوی گزیلول (۵ دقیقه) شناور گردیدند. در این رنگ‌آمیزی هسته سلول به رنگ هماتوکسیلین یعنی رنگ آبی تیره درآمده و سیتوپلاسم تحت تاثیر ائوزین، قرمز روشن می‌شود.

روش بررسی آماری

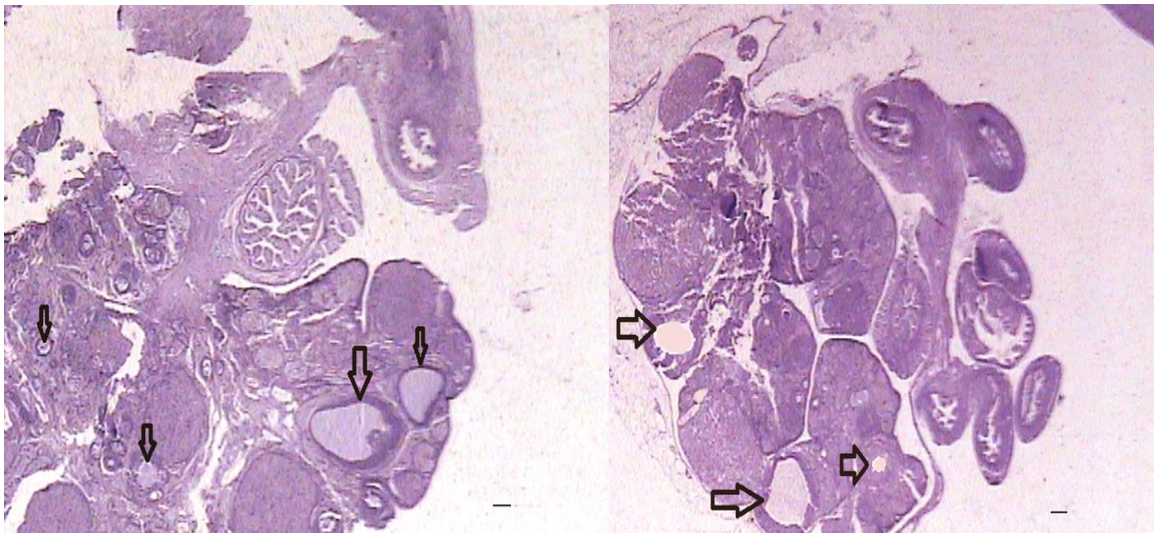
داده‌ها به وسیله‌ی نرم افزار SPSS بررسی شدند. تمام داده‌ها بعد از تست نرمالیتی به کمک آنالیز واریانس (ANOVA) تحلیل شدند و در صورت معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) از Tukey's *post-hoc* برای مقایسه تفاوت‌های بین گروهی استفاده شد.

نتایج

یافته‌های هیستوپاتولوژی تخمدان

اثر یک بار تزریق مرفین بر کیست‌زایی تخمدانی

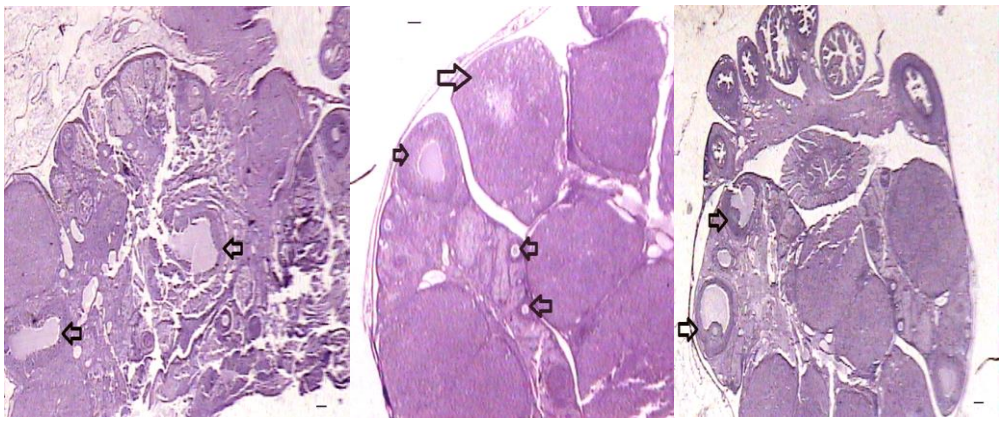
مشاهدات بافتی در این گروه نشان می‌دهد که در گروه مرفین، نسبت به گروه کنترل، کیست‌های تخمدانی حاشیه‌ای دیواره-ضخیم دیده می‌شود. تخمدان موش کنترل فاقد کیست‌های فولیکولی است (شکل ۱).



شکل ۱. تصویر بافتی تخمدان موش‌های گروه کنترل (سمت چپ) و دریافت‌کننده مرفین (سمت راست). دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم مرفین، نسبت به گروه کنترل در ایجاد کیست‌های تخمدانی موثر و تخمدان موش تیمار شده با مرفین دارای کیست فولیکولار است (فلش‌ها در تصویر سمت راست، ۳ کیست فولیکولار و در تصویر سمت چپ، علاوه بر کیست، فولیکول رسیده و اولیه را نشان می‌دهند). (خط مقیاس در تصویر برابر 100 µm)

اثر یک بار تزریق کتامین به تنهایی بر کیست‌زایی تخمدانی

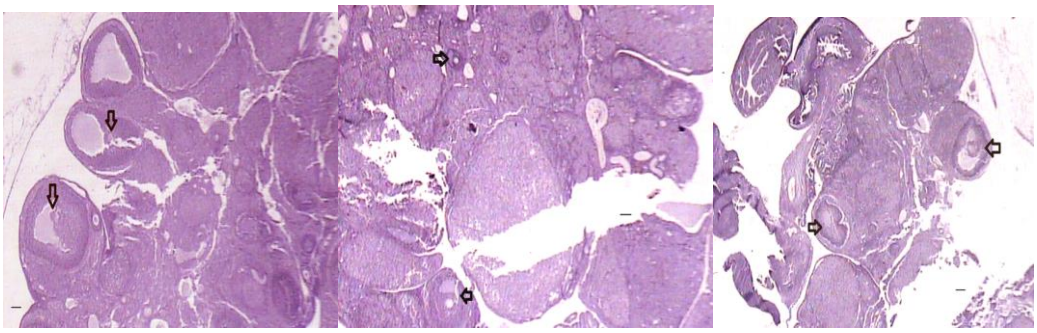
در گروه‌های کتامین تنها با دوزهای ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم/کیلوگرم، نسبت به گروه کنترل، از تعداد فولیکول‌های در حال تکوین طبیعی و رسیده، کاسته شده و کیست‌های تخمدانی مشاهده شد که البته تعداد کیست متناسب با افزایش دوز کاهش داشت. بنابراین بیشترین اثر کیست‌زایی در حداقل دوز کتامین اتفاق افتاد و با افزایش دوز، از اثر کیست‌زایی کاسته شد (شکل ۲).



شکل ۲. تصاویر بافتی تخمدان موش‌های دریافت کننده دوزهای افزایشی کتامین: دوز ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم کتامین به تنهایی (چپ) (فلش‌ها، ۲ کیست فولیکولار را نشان می‌دهند)، دوز ۲ میلی‌گرم/کیلوگرم کتامین به تنهایی (وسط) (فلش‌ها، ۱ کیست فولیکولار در حاشیه و بالای آن جسم زرد و پایینش ۲ فولیکول اولیه را نشان می‌دهند). و دوز ۴ میلی‌گرم/کیلوگرم کتامین به تنهایی (راست) (فلش‌ها، ۲ فولیکول طبیعی رسیده را نشان می‌دهند).(خط مقیاس در تصویر برابر **µm** ۱۰۰).

اثر پیش‌تزریق کتامین مقدم بر مرفین بر کیست‌زایی تخمدانی

در این گروه‌ها، پیش تجویز کتامین با دوزهای ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم/کیلوگرم نسبت به مرفین، در مقایسه با گروه مرفین به تنهایی، از تعداد کیست به طور قابل توجهی کاسته شد به طوریکه تحت دوز ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم کتامین، فولیکول‌های اولیه و آنترال و دوگرااف و در دوز ۲ میلی‌گرم/کیلوگرم کتامین، فولیکول پره آنترال و آنترال و در دوز ۴ میلی‌گرم/کیلوگرم آن، فولیکول‌های ثانویه و دوگرااف مشاهده شد. طبق این شواهد، بدون تاثیر از دوز کتامین، از اثرات کیست‌زایی مرفین کاسته شد (شکل ۳).



شکل ۳. تصاویر تخمدان در گروه‌های پیش تجویز دوزهای افزایشی کتامین نسبت به مرفین: تجویز دوز ۱ میلی‌گرم/ کیلوگرم کتامین نسبت به مرفین (سمت چپ)، دوز ۲ میلی‌گرم/ کیلوگرم کتامین نسبت به مرفین (وسط) و دوز ۴ میلی‌گرم/ کیلوگرم کتامین نسبت به مرفین (راست) مقدم بوده و در هر ۳ تصویر، فلش‌ها تعداد ۲ فولیکول طبیعی را نشان می‌دهند. در مجموعه کتامین–مرفین در مقایسه با گروه مرفین تنها کاهش تعداد کیست حادث گردیده است (خط مقیاس در تصویر برابر **µm** ۱۰۰).

یافته های هیستوپاتولوژی رحم

اثر یک بار تزریق مرفین و کتامین به تنهایی و یا پیش تزریق کتامین مقدم بر مرفین بر رحم

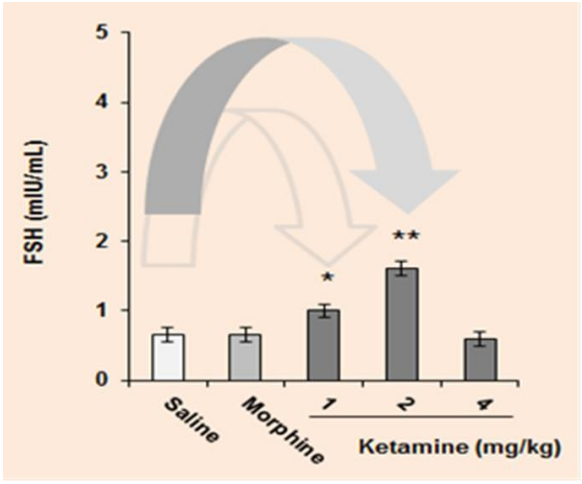
. طبق شواهد به دست آمده از تصاویر بافتی رحم، دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم مرفین نسبت به کنترل تا حدودی در ایجاد التهاب رحم (افزایش نسبی قطر) موثر بود که پیش تیمار کتامین این اثر را برداشت (شکل ۴).

شکل ۴. تصاویر بافتی رحم در موش‌های دریافت کننده مرفین تنها (سمت چپ) و گروه‌های پیش تزریق کتامین. طبق نتایج، افزایش قطر رحم به واسطه‌ی تاثیر مرفین، قابل مشاهده است (سمت چپ) که این اثر در پی پیش تیمار با کتامین مرتفع گردید (سمت راست) (خط مقیاس در تصویر برابر **µm** ۱۰۰).

یافته‌های سرولوژیک

اثر یک بار تزریق مرفین و کتامین به تنهایی و یا پیش تزریق کتامین مقدم بر مرفین بر تغییرات سطح FSH

طبق نتایج، مقدار **FSH** سرمی در گروه مرفین، تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نداشت. در تزریق کتامین به تنهایی افزایش معنی‌دار در سطح **FSH** سرم خونی نسبت به گروه سالین مشاهده شد که بیشترین افزایش سطح **FSH** در دوز حدوسط کتامین حاصل شد. در گروه‌های آزمایشی پیش تزریق کتامین نسبت به مرفین، تحت هیچکدام از دوزها، تغییرات معنی‌دار در سطح **FSH** سرمی مشاهده نشد (نمودار ۱).



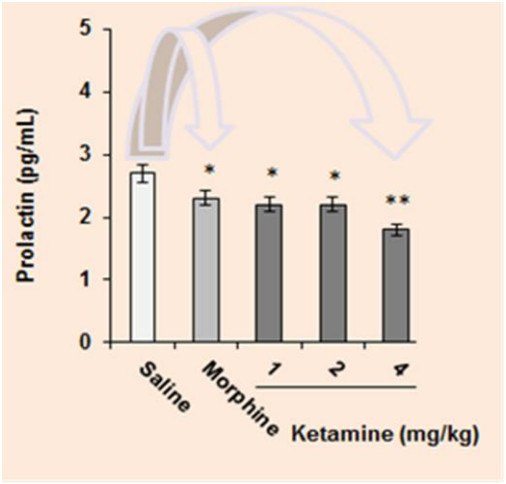
نمودار ۱. تغییرات **FSH** سرم خونی در گروه‌های تحت تزریق مرفین و دوزهای افزایشی کتامین. (**P**<۰/۰۵)* و (**P**<۰/۰۱)** تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل را بر اساس آزمون تعقیبی با توکی نشان می‌دهند. داده‌ها بر اساس میانگین و انحراف معیارند.

اثر یک بار تزریق مرفین و کتامین به تنهایی و یا پیش‌تزریق کتامین مقدم بر مرفین بر تغییرات سطح LH

طبق نتایج، در هیچ یک از گروه‌های مذکور تفاوت معنی‌دار در سطح **LH** مشاهده نشده است.

اثر یک بار تزریق مرفین و کتامین به تنهایی و یا پیش تزریق کتامین مقدم بر مرفین بر تغییرات سطح پرولاکتین

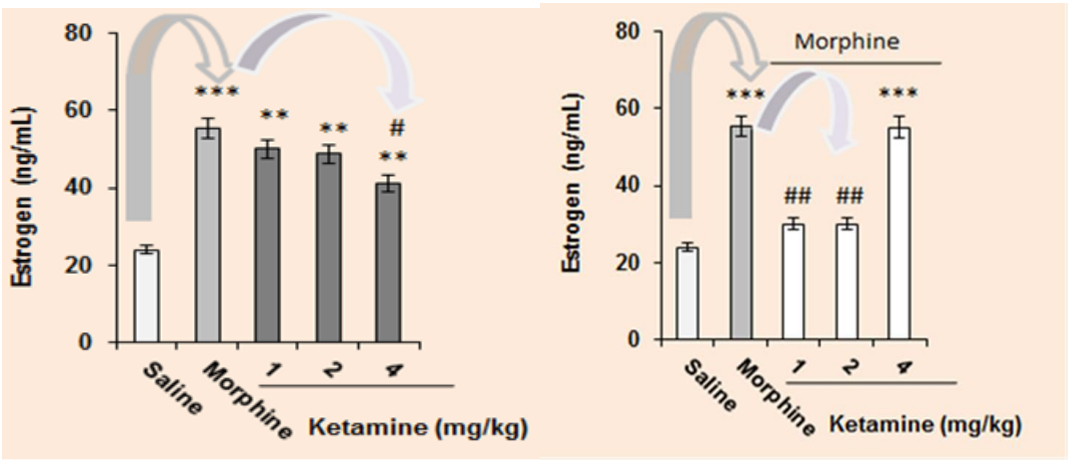
طبق یافته‌ها، در گروه مرفین و گروه‌های کتامین به تنهایی کاهش معنی‌دار در سطح پرولاکتین نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. اما در بقیه‌ی گروه‌ها (پیش‌تزریق کتامین نسبت به مرفین)، هیچ تفاوت معنی‌داری در سطوح پرولاکتین مشاهده نگردید (نمودار۲).



نمودار ۲. تغییرات پرولاکتین سرم خونی در گروه‌های تحت تزریق مرفین و دوزهای افزایشی کتامین. (**P**<۰/۰۵)* و (**P**<۰/۰۱)** تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل را بر اساس آزمون تعقیبی با توکی نشان می‌دهند.

اثر یک بار تزریق مرفین و کتامین به تنهایی و یا پیش تزریق کتامین مقدم بر مرفین بر تغییرات سطح استروژن

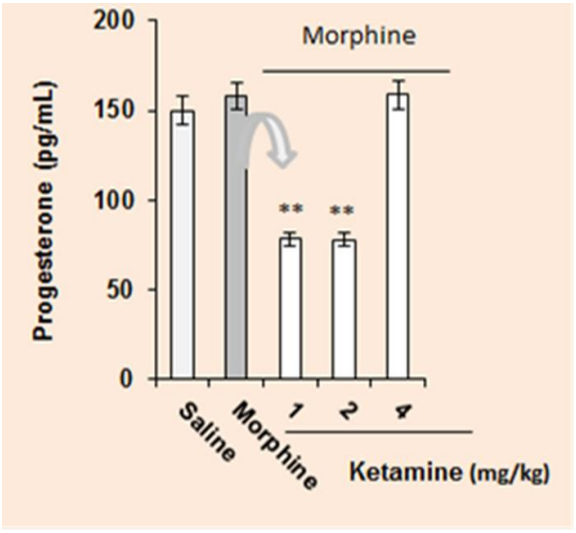
میزان استروژن در گروه‌های مرفین و نیز کتامین به تنهایی (هر ۳ دوز) نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌دار نشان داد. همچنین در بعضی گروه‌های پیش‌تزریق، نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌دار در سطح استروژن مشاهده گردید (نمودار ۳).



نمودار ۳. تغییرات استروژن سرم خونی در گروه‌های تحت تزریق مرفین و دوزهای افزایشی کتامین تنها و کتامین مقدم بر مرفین. (P<۰/۰۵)*، (P<۰/۰۱)** و (P<۰/۰۰۱)*** تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل و (P<۰/۰۵)# و (P<۰/۰۱)## تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه مرفین را بر اساس آزمون تعقیبی با توکی نشان می‌دهند.

اثر یک بار تزریق مرفین و کتامین به تنهایی و یا پیش تزریق کتامین مقدم بر مرفین بر تغییرات سطح پروژسترون

بر اساس نتایج، در هیچ یک از گروه‌های مرفین و کتامین به تنهایی، تفاوت معنی‌دار در سطح پروژسترون مشاهده نشد. اما در دوزهای پایین‌تر کتامین-مرفین کاهش معنی‌دار در سطوح پروژسترون نسبت به گروه مرفین تنها، حاصل شد (نمودار ۴).



نمودار ۴. تغییرات پروژسترون سرم خونی در گروه‌های تحت تزریق مرفین و دوزهای کتامین مقدم بر مرفین. (P<۰/۰۱)** تفاوت معنی‌دار نسبت

به گروه مرفین را بر اساس آزمون تعقیبی با توکی نشان می‌دهد.

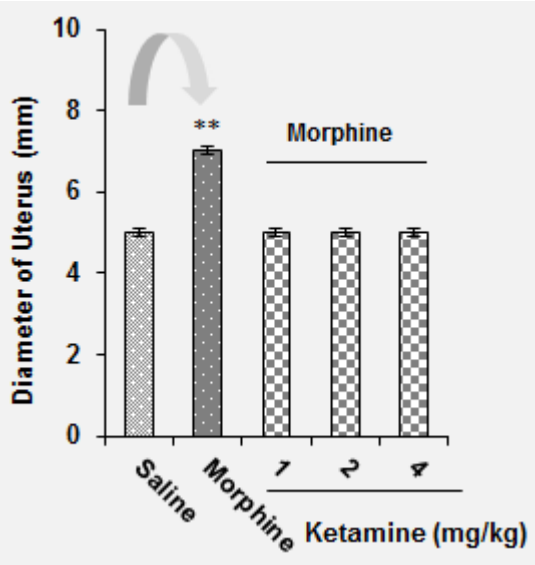
نتایج بیومتری

اثر یک بار تزریق مرفین و کتامین به تنهایی و یا پیش‌تزریق کتامین مقدم بر مرفین بر قطر تخمدان

ابعاد تخمدان‌ها در هنگام جراحی، با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد و طبق نتایج، در هیچ یک از گروه‌ها تغییر معنی‌داری در قطر تخمدان رخ نداد.

اثر یک بار تزریق مرفین و کتامین به تنهایی و یا پیش‌تزریق کتامین مقدم بر مرفین بر قطر رحم

در گروه مرفین افزایش نسبی در قطر رحم مشاهده شد اما در پیش تزریقات برگشت (نمودار ۵).



نمودار ۵. تغییرات قطر رحم در گروه‌های تحت تزریق مرفین و دوزهای کتامین مقدم بر مرفین. افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل بر اساس آزمون تعقیبی با توکی نشان داده شده است (P<۰/۰۱)**.

یافته های حاصل از بررسی وزن حیوانات

وزن تمام حیوانات قبل از آزمایش و پس از انجام آن سنجیده شد و تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید.

بحث

بررسی حاضر به منظور نشان دادن اثرات مرفین و دوزهای پایین کتامین و نیز تداخل کتامین با مرفین بر سیستم تولیدمثلی و کیست‌زایی در موش بزرگ آزمایشگاهی طراحی شد. این اثرات به کمک مطالعات سرولوژیک، هیستوپاتولوژیک رحم و تخمدان و نیز بررسی‌های بیومتریک، تکمیل شد.

در این مطالعه، از مرفین به عنوان آگونیست گیرنده‌های اپیوئیدی و از کتامین به عنوان قوی‌ترین آنتاگونیست انتخابی و غیررقابتی گیرنده‌های NMDA در سیستم گلوتاماترژیک، به منظور بررسی اثرات این دو ماده در بروز PCOS استفاده شد. در باب اثرات مرفین بر سیستم تولیدمثلی و بروز PCOS مطالعات فراوانی در سال‌های اخیر صورت گرفته است. گزارش شده است که مصرف مرفین به عنوان آلکالوئید عمده تریاک یا پپتیدهای مخدر سبب ایجاد بیماری‌هایی در سیستم نوروآندوکرین و به ویژه کاهش ترشح LH می‌گردد (۱۶). اغلب مطالعات نشان می‌دهند که سیستم تولیدمثلی در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد از مواد مخدر تاثیر می‌پذیرد. دلایلی نشان می‌دهد که مواد مخدر میزان mRNA ی GnRH را کاهش داده و سبب کاهش در بیوسنتز GnRH می‌گردند (۱۷). بنابراین مواد مخدر احتمالا از طریق ایجاد اختلال در محور تولیدمثلی سبب بروز ناهنجاری‌های تولیدمثلی از جمله

PCOS خواهند شد که در این مطالعه نیز طبق نتایج بافت‌شناسی تخمدان، حیوان تحت تزریق داخل صفاقی مرفین (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم)، دارای تخمدان پلی‌کیستیک شد. علیرغم اینکه در بیشتر مطالعات، مصرف مرفین، سبب کاهش مقادیر LH و FSH شده است اما در مطالعه ی حاضر میزان این ۲ فاکتور در گروه مرفین تنها نسبت به کنترل تغییری نکرده است. هرچند اخیرا در مطالعه ای نیز گزارش شده است که مصرف مرفین ارتباط معنی داری با سطوح FSH و استرادیول ندارد (۱۸). در مطالعات بسیاری اشاره شده است که یکی از تغییرات هورمونی ایجاد شده به دنبال PCOS در کنار مقادیر افزایش‌یافته‌ی آندروژن، افزایش سطوح استروژن می‌باشد (۱۹). که در بررسی حاضر نیز در گروه مرفین ضمن مشاهده‌ی کیست‌های فولیکولار در بافت تخمدان، این افزایش استروژن را با اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل شاهد هستیم. در خصوص تغییرات بافتی تخمدان در گروه مرفین نیز، پیشتر مشاهده شده بود که تزریق داخل صفاقی و مدت‌دار مرفین سبب ایجاد کیست‌های فولیکولار تخمدانی متعدد در موش بزرگ آزمایشگاهی می‌شود (۱۴) که با یافته‌های حاضر مطابقت دارد. به نظر می‌رسد اثرات مرفین در کیست‌زایی، بیشتر به دلیل تحریک سیستم نیتریک اکساید و بروز عوامل التهابی در تخمدان (به ویژه از روی رحم ملتهب) می‌باشد. اینکه در این پژوهش رحم در گروه مرفین نسبت به کنترل افزایش قطر نشان داد و احتمال اینکه این ماده به تحریک سیستم پیش التهابی مذکور انجامیده برگرفته از نتایج دیگران است چراکه در پژوهش‌های گذشته به نقش سیستم نیتریک اکساید در بروز کیست‌های تخمدانی استناد شده است (۱۴).

یکی از تنظیم‌کننده‌های اصلی ترشح GnRH سیستم گلوتاماترژیک می‌باشد که نقش تحریکی برای ترشح GnRH برعهده دارد. از بین گیرنده‌های متنوع این سیستم، گیرنده‌های NMDA بر روی نورون‌های GnRH شناسایی شده‌اند. در این مطالعه کتامین به تنهایی، باعث ایجاد کیست‌های فولیکولار در تخمدان‌ها شد و تخمدان موش‌های تحت تزریق داخل صفاقی کتامین جدا از غلظت دارو و تحت همه دوزها (۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم/کیلوگرم)، نسبت به گروه کنترل کاهش تعداد فولیکول‌های در حال رشد و طبیعی نشان داد. اخیرا در مطالعه‌ای که در دوزهای بالای کتامین صورت گرفته، مشخص شده است که تزریق داخل صفاقی کتامین سبب کاهش بیان mRNA مربوط به GnRH شده، در نتیجه سنتز GnRH کاهش می‌یابد. بنابراین کتامین اثرات مهاری روی ترشح GnRH داشته و اثرات خود را از طریق اختلال در تعادل محور HPG نشان می‌دهد. هم چنین در مطالعه مذکور، به دنبال مصرف کتامین، مقادیر B inhibin نیز کاهش معنی‌دار نشان داد (۲۰). لذا ممکن است افزایش سطوح استروژن در مطالعه‌ی حاضر در گروه‌های کتامین به تنهایی، به دلیل کاهش اثرات مهاری B inhibin باشد. از طرفی سطوح بالای FSH سبب ترشح استروژن از سلول‌های گرانولوزا خواهد شد ولی در مطالعه‌ی حاضر، سطوح استروژن علی رغم تغییرات افزایشی FSH نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داده است که احتمالا این امر نشان دهنده یک رابطه فید بکی مجزا است. از سویی دیگر مشخص شده است استفاده از کتامین، سبب تولید بیش از حد کاتکول‌آمین‌ها خواهد شد (۲۱)، دوپامین نیز که از کاتکول‌آمین‌ها می‌باشد دچار افزایش خواهد شد و ممکن است به علت اثرات مهاری خود بر ترشح پرولاکتین، علت مقادیر کاهش یافته‌ی این هورمون، در بررسی حاضر بیان شود ولی همسویی این امر با کاهش نسبی سطح استروژن به راحتی قابل تفسیر نمی باشد. هم‌چنان که پیشتر نیز نشان داده شده بود که به دنبال مصرف طولانی مدت کتامین، ترشح LH، هورمون رشد و پرولاکتین سرکوب می‌شود (۲۲). در یک بررسی انجام شده در خصوص تغییرات هماتولوژی به دنبال مصرف کتامین، این ماده سبب افزایش سطوح کورتیزول و گلوکز خون گردیده (۲۳) که این افزایش سطح گلوکز می‌تواند سبب هایپرانسولینمی و بروز اثرات وابسته به افزایش انسولین در ارتباط با PCOS شود. البته اظهار نظر قطعی در این مورد نیاز به سنجش دقیق انسولین و گلوکز خون دارد. اخیرا در مطالعه‌ای نیز گزارش شده است که کتامین، موجب برهم خوردن تعادل میان تولید رادیکال‌های آزاد و سیستم‌های ضداکسایشی بدن می‌شود. رادیکال‌های آزاد نیز می‌توانند بر روی سنتز هورمون‌ها و تقسیم سلولی موثر باشند (۲۴)، که شاید بتوان این تغییرات هورمونی و بروز کیست‌های فولیکولار در

گروه‌های تزریق کتامین به تنهایی را به نوعی مربوط به این امر نیز دانست. بنابراین با بررسی جمیع یافته‌ها این فرضیه مطرح است که کتامین علی رغم اثرات تخریبی مستقیم بر بافت تخمدان و فولیکول‌ها اثرات غیرمستقیم از طریق اختلال در محور هیپوتالاموس–هیپوفیز–گناد ایجاد نماید. اینکه کتامین به دلیل اثرات آنتاگونیستیک بر روی گیرنده‌های NMDA گلوتاماتی که بر سطح نورون‌های GnRH حضور دارند باعث القای اثرات مستقیم می باشد نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

در مورد اثرات توام مصرف کتامین با مرفین می‌توان گفت این دو ماده در مواردی عملکردهای مشابه و در مواردی اثرات متفاوت دارند. به بیانی دیگر اثرات کتامین وابسته به دوز می‌باشد. به طوریکه در غلظت‌های پایین سرمی، اثرات ضد دردی مانند اپیوئیدها و در غلظت‌های بالاتر اثرات بیهوشی آن ظاهر می‌شود (۲۴،۲۵). به طور دقیق‌تر می توان گفت کتامین، بر گیرنده‌های اوپیوییدی در مغز، نخاع و اعصاب محیطی متصل می شود و مولفین حداقل بخشی از اثرات ضد دردی آن را منتسب به این امر می‌دانند. کتامین در صورت تجویز همزمان با مخدرها می‌تواند اثر سینرژیک داشته باشد (۲۶). یعنی به عنوان آگونیست گیرنده‌های مو و دلتا عمل نموده، در دوزهای پایین اثر ضددردی دارد. چندین مطالعه اثر کتامین را در بهبود آنالژزی ناشی از مخدر نشان داده است (۲۷). همچنین در مطالعه‌ای، در حالیکه تزریق استروژن سبب افزایش بیان GnRH و به دنبال آن افزایش LH و تزریق آنتاگونیست NMDA، سبب کاهش بیان ژن مربوط به GnRH شده، اما در ترکیب آنتاگونیست با استروژن، این استروژن تزریقی، مانع فعالیت مهاری آنتاگونیست NMDA بر کاهش بیان ژن مربوط به GnRH شده است. بر طبق این نتایج، استروژن بر اثر مهاری آنتاگونیست NMDA غلبه داشت (۲۸). بنابراین ممکن است در بررسی حاضر، تداخلات ایجاد شده در گروه کتامین– مرفین، به تغییر سطوح هورمون‌های جنسی از جمله استروژن وابسته باشد که این امر به بررسی دقیق‌تر در آینده نیاز دارد. مطالعات در حیوانات نشان داده است که استفاده از آنتاگونیست‌های NMDA مانع از عملکرد اثرات محرک مواد مخدر می‌شود در نتیجه می‌توان گفت ترکیب کتامین با اوپیوئیدهایی نظیر مرفین می‌تواند مفید باشد (۲۹). با وجود تمام همکاری‌های عملکردی که ممکن است بین کتامین و اوپیوئیدهایی مانند مرفین وجود داشته باشد، اما به جهت دخالت در سیستم نیتریک اکساید، عکس یکدیگر عمل می‌کنند به گونه‌ای که مرفین سبب تحریک نیتریک اکساید سینتاز و فعالیت این سیستم می شود اما کتامین اثرات مهاری بر سیستم نیتریک اکساید دارد (۳۰). در گروه پیش‌تزریق‌های کتامین به مرفین ممکن است اثرات تداخلی کتامین در خصوص کاهش تعداد کیست‌ها و ظهور فولیکول‌های طبیعی در حال رشد را ناشی از مهار اثر القایی مرفین در رهایش نیتریک اکساید در تخمدان دانست که به عنوان یک عنصر التهابی در فرآیندهای تخمک‌گذاری درگیر و باعث القا PCOS می‌شود و یا این احتمال مطرح است که در پیش تزریق کتامین نسبت به مرفین، کتامین به علت اثرات آگونیستیک خود بر گیرنده‌های اپیوئیدی، این گیرنده‌ها را اشغال کرده و حداقل تعدیل بخشی از اثرات جانبی اپیوئیدها را وساطت نموده است. بدیهی است روشن شدن این پیش فرض به مطالعات بسیار گسترده‌تر نیاز دارد که امید است در آینده فرصت انجام آن دست دهد.

تقدیر و تشکر

از دانشگاه شاهد بابت حمایت از طرحواره‌های تحصیلات تکمیلی قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

تعارض منافع وجود ندارد.

منابع

1. Diamanti-Kandarakis E, Kouli CR, Bergiele AT, Filandra FA, Tsianateli TC, Spina GG, et al. A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek island of Lesbons: hormonal and metabolic profile. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1999; 84:4006-11.
2. Dabadghao P. Polycystic ovary syndrome in adolescents. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 2019; 33(3):1-10.
3. Dunaif A. Polycystic ovary syndrome in 2011: Genes, aging and sleep apnea in polycystic ovary syndrome. Nature Reviews Endocrinology 2011; 8(2):72-4.
4. Barber TM, Hanson P, Weickert MO, Franks S. Obesity and Polycystic Ovary Syndrome: Implications for Pathogenesis and Novel Management Strategies. Clinical Medicine Insights: Reproductive Health 2019; 9(13):1-9.
5. Susan K, Christopher R, Kristen, John C. Neuroendocrine Effects of Androgens in Adult Polycystic Ovary Syndrome and Female Puberty. Seminars in Reproductive Medicine 2007; 25(5):352-9.
6. Mahmoudian A, Dehghan M, Jafarpour M. The effect of morphine administration on structure and ultrastructure of uterus in pregnant mice. Iranian Journal of Reproductive Medicine 2010; 8: 111-8.
7. Trevor AJ, Masters SB, Katzung BG. Basic& Clinical pharmacology. 14thed. New York: McGraw-Hill Medical 2018.
8. Lembo PM, Grazzini E, Groblewski T, O'Donnell D, Roy MO, Zhang J, et al. Proenkephalin A gene products activate a new family of sensory neuron-specific GPCRs. Nature Neuroscience 2002; 5(3):201-9.
9. Hat GK, Mahesh VB, Ping L, Chorich L, Wiedmeier VT, Brann DW. Opioid-glutamate-nitric oxide connection in the regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. Endocrinology 1998; 139(3):955-60.
10. Abs R, Verhelst J, Maeyaert J, Van Buyten JP, Opsomer F, Adriaensen H, et al. Endocrine consequences of long-term intrathecal administration of opioids. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2000; 85:2215-22.
11. Smith YR, Stohler CS, Nichols TE, Bueller JA, Koeppe RA, Zubieta JK. Pronociceptive and antinociceptive effects of estradiol through endogenous opioid neurotransmission in women. The Journal of Neuroscience 2006; 26(21):5777-85.
12. Eyvazzadeh AD, Pennington KP, Pop-Busui R, Sowers M, Zubieta JK, Smith YR. The role of the endogenous opioid system in polycystic ovary syndrome. Fertility and Sterility 2009; 92 (1):1-12.
13. Karami M, Darban Fooladi M, Jalali Nadoushan M, Lakzaei F. Ovarian Polycystic Induction with Morphine in Wistar Rat. Journal of Basic and Clinical Pathophysiology 2015; 3(1):1-6.
14. Hassani F, Karami M, Jalali Nadoushan MR, Eftekhari Yazdi P. Nitric oxide-induced polycystic ovaries in the Wistar rat. International Journal of Fertility and Sterility 2012; 6(2):111-6.
15. Karami M, Mohammadi M, Afraz S. Survey on the interaction effect of dopamine D2 receptor antagonist on

morphine-induced polycystic ovary syndrome in rat. Daneshvar Medicine 2020; 28(3):16-27

16. Lakoski JM, Gebhart GF. Attenulation of morphine's depression of serum luteinizing hormone by lesions inthe amygdale. Neuroendocrinology 1981; 33:105-11.

17. Sianati S, Sharif B, Sadeghi M, Kalbasi Anaraki D and Dehpour AR. Effects of female sex hormones on morphine dependence. Annals of General Psychiatry 2008; 7(1):264.

18. Nabatchian F, Tashauoei M, Bahrami A. Evaluation of the Effects of Morphine on Sex Hormones in Wistar Rats. Journal of Laboratory & Diagnosis 2019; 11 (43):42-9.

19. Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS. The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. Clinical Endocrinology 2004; 60:1-17.

20. Lim DK. Ketamine associated psychedelic effects and dependence. Singapore Medical Journal 2003; 44(1):31-4.

21. Hashemnia M, Javedani M, Nikoosafat Z, Abdoli Jamoor S. Study of Hematological, Biochemical and Histopathological Changes Due to Long-Term Administration of Ketamine in Rat. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences 2018; 17(7):639-56.

22. Chakraborty TR, Ng L, Gore AC. Colocalization and hormone regulation of estrogen receptor and N-methyl-D-aspartate receptor in the hypothalamus of female rats. Endocrinology 2003; 144:299-305.

23. Reyes Toso CF, Linares LM, Rodríguez RR. Blood sugar concentrations during ketamine or pentobarbitone anesthesia in rats with or without alpha and beta adrenergic blockade. Medicina (B Aires) 1995; 55(4):311-6.

24. Urkler C, Onat T, Yildirim E, Kaplan S, Yazici G, Mammadov R et al. Can the negative effects of ketamine abuse on female genital organs be prevented by nimesulide? An experimental study. General Physiology and Biophysics 2019; 38(5):427-34.

25. Annetta MG, Iemma D, Garisto C, Tafani C, Proietti R. Ketamin: new indication for an old drug. Current Drug Targets 2005; 6(7):789-94.

26. Canale TS. Campbell's operative orthopedics. 9th ed. St. Louis: Mosby 1998.

27. Kapfer B, Alfonsi P, Guignard B, Sessler DI, Chauvin M. Nefopam and ketamine comparably enhance postoperative analgesia. Anesthesia & Analgesia 2005; 100(1):169-74.

28. Ottem EN, Godwin JG, Petersen SL. Glutamatergic signaling through the N -methyl-D-aspartate receptor directly activates medial subpopulations of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons, but does not appear to mediate the effects of estradiol on LHRH gene expression. Endocrinology 2002; 143:4837-45.

29. Peltoniemi MA, Hagelberg NM, Olkkola KT, Saari TI. Ketamine: A Review of Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Anesthesia and Pain Therapy. Clinical Pharmacokinetics 2016; 55(9):1059-77.

30. Yang SS, Jang MY, Lee KH, Hsu WT, Chen YC, Chen WS, et al. Sexual and bladder dysfunction in male ketamine abusers: A large-scale questionnaire study. PLoS One 2018; 13(11):1-10.