Pejouhesh dar Pezeshki (i.e., Research in Medicine) **Original Article**

The Quarterly Journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2023; Vol. 47; No. 4

Investigating the Toxic Effect of Methadone on the Cerebellar Tissue of Adult Male Rats

Naghme Zamani[1], Laya Takbiri Osgooyee[2*], Abbas Aliaghaei[3*], Nasim Zamani[4], Hossein Hosnian-Moghadam[4]

1. Department of Biology, Faculty of Biological Science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. Department of Biology and Anatomical Sciences, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4. Department of Clinical Toxicology, Loghman Hakim Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: September 10, 2023; Accepted: October 10, 2023

Abstract

Background and Aim: The cerebellum is a part of the nervous system that is associated with motor coordination and balance control. Methadone is a centrally-acting synthetic opioid analgesic widely used in methadone maintenance therapy (MMT) programs throughout the world. Unfortunately, the abuse of methadone is currently spreading, and on the other hand, many deaths due to the use of this drug have also been reported. There is still no detailed information about the toxicity of this drug on the nervous system. Therefore, considering its neurotoxic effects, especially on the cerebellum, the aim of this study is to investigate histological changes in the cerebellar cortex associated with methadone administration.

Methods: This research is an experimental study. Twenty - four adult male albino rats were randomized into two groups of control and methadone treatment. Methadone was subcutaneously administered (2.5-10 mg/kg) once a day for two consecutive weeks. Stereology was used to evaluate the volume and number of cells in the cerebellar cortex, and immunohistochemistry was used against calbindin to evaluate the number of Purkinje neurons. Data analysis was done with Prism software and independent t-test.

Results: The results of our study showed that administration of methadone decreased the volume of the molecular layer compared to the control group ($P < 0.01$) ($P < 0.017$, $t = 5.37$, Mean ± SEM = 1.429 ± 0.26) (the mean of the control group was 6.05 and the methadone group was 4.62). On the other hand, the number of Purkinje neurons in the methadone group showed a significant decrease compared to the control one ($P < 0.05$) ($P < 0.016$, $t = 3.291$, Mean ± SEM = 2264 ± 687.9) (the mean of the control group was 17826 and the mean of the methadone group was 15562). Our findings also showed that the volume of the granular layer ($P < 0.04$, $t = 2.479$, Mean ± SEM = 0.33 ± 0.825) (the mean of the control group was 4.375 and the mean of the methadone group was 3.55) and the volume of the white matter of the cerebellum in the methadone group showed a significant decrease compared to the control group ($P < 0.02$, $t = 3.03$, Mean ± SEM = 1.229 ± 0.404) (the mean of the control group was 3.28 and the mean of the methadone group was 2.06). In addition, the number of calbindin- positive neurons showed a significant decrease in the methadone group compared to the control group ($P < 0.02$, $t = 2.68$, Mean ± SEM = 2.68 ± 7.2) (the mean of the control group was 20.8 and the methadone group was 13.6).

Conclusion: These findings showed that methadone administration caused damage to the gray and white matter of the cerebellum. The death of Purkinje cells due to methadone can cause disturbances in cerebellar functions. It seems that the administration of methadone should be accompanied by more precautions.

Keywords: Methadone; Purkinje neuron; Stereology; Neuroinflammation; Apoptosis; Cerebellar cortex; Immunohistochemistry; Motor coordination

Please cite this article as: Zamani N, Takbiri Osgooyee L, Aliaghaei A, Zamani N, Hosnian-Moghadam H. Investigating the Toxic Effect of Methadone on the Cerebellar Tissue of Adult Male Rats. Pejouhesh dar Pezeshki. 2023;47(4):22-32.

[*] **First Corresponding Author:** Abbas Aliaghaei; **Email:** abbas.aliaghaei@sbmu.ac.ir
Department of Biology and Anatomical Sciences, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[*] **Second Corresponding Author:** Laya Takbiri Osgooyee; **Email:** l_takbiri@iau-tnb.ac.ir
Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

پژوهش در پزشکی
مقاله پژوهشی
فصلنامه علمی- پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید بهشتی
دوره ۴۷، شماره ۴، سال ۱۴۰۲ شمسی، صفحات ۲۲ تا ۳۲

بررسی تأثیر سمی متادون بر بافت مخچه موش‌های صحرایی نر بالغ

نغمه زمانی[۱]، لعیا تکبیری اسگویی[۲*]، عباس علی آقایی[۳*]، نسیم زمانی[۴]، حسین حسنیان- مقدم[۴]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.
۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.
۳- گروه بیولوژی و علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۴- گروه سم‌شناسی بالینی، بیمارستان لقمان‌حکیم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۱۸

چکیده

سابقه و هدف: مخچه یک ساختار عصبی است که مرتبط با هماهنگی حرکتی و کنترل تعادل است. متادون یک ضددرد مخدر مصنوعی با اثر مرکزی است که به طور گسترده در برنامه‌های درمان نگهدارنده متادون (MMT) در سراسر جهان استفاده می‌شود. متأسفانه سوءمصرف متادون در حال حاضر به شدت در حال گسترش است و از طرفی مرگ و میرهای زیادی در اثر استفاده از این دارو نیز گزارش شده است. هنوز اطلاعات دقیقی در مورد سمیت این دارو بر بافت عصبی در دست نیست. بنابراین با توجه به اثر نوروتوکسیک آن به ویژه روی مخچه، هدف این مطالعه بررسی تغییرهای بافتی در قشر مخچه مرتبط با تجویز متادون است.

روش کار: این مطالعه از نوع تجربی است. تعداد ۲۴ سر موش صحرایی نر بالغ آلبینو به طور تصادفی در دو گروه کنترل و درمان با متادون قرار گرفتند. متادون به صورت زیرجلدی (۱۰-۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) یک بار در روز به مدت دو هفته متوالی تجویز شد. برای بررسی حجم و تعداد سلول‌ها در قشر مخچه از روش استریولوژی استفاده شد و برای بررسی تعداد نورون‌های پورکینژ از ایمونوهیستوشیمی علیه مارکر کالبیندین استفاده شد. آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار پریسم و به روش تست تی مستقل (t-test) انجام شد.

یافته‌ها: نتایج مطالعه ما نشان داد که تجویز متادون سبب کاهش حجم لایه مولکولار می‌شود ($P < 0.017, t = 5.37$ Mean ± SEM = 1.429 ± 0.26) (میانگین گروه کنترل ۶/۰۵ و گروه متادون ۴/۶۲ بود). از طرفی تعداد نورون‌های پورکینژ نیز در گروه متادون کاهش معناداری نسبت به گروه کنترل نشان داد ($P < 0.05$) ($P < 0.016, t = 3.291$, Mean ± SEM =2264 ± 687.9) (میانگین گروه کنترل ۱۷۸۲۶ و میانگین گروه متادون ۱۵۵۶۲ بود). یافته‌های ما همچنین نشان داد که حجم لایه گرانولار ($P < 0.04, t = 2.479$, Mean ± SEM =0.825 ± 0.33) (میانگین گروه کنترل ۴/۳۷۵ و میانگین گروه متادون ۳/۵۵ بود) و نیز حجم ماده سفید مخچه در گروه متادون نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری را نشان داد ($P < 0.02, t = 3.03$, Mean ± SEM =1.229±0.404) (میانگین گروه کنترل ۳/۲۸ و میانگین گروه متادون ۲/۰۶ بود). از طرفی تعداد نورون‌های کالبیندین مثبت نیز در گروه متادون نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری را نشان داد ($P < 0.05$) ($P < 0.02, t = 2.68$, Mean ± SEM = 7.2 ± 2.68) (میانگین گروه کنترل ۲۰/۸ و گروه متادون ۱۳/۶ بود).

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها نشان می‌دهد که تجویز متادون سبب آسیب به ماده خاکستری و سفید مخچه می‌شود. مرگ سلول‌های پورکینژ در اثر متادون می‌تواند سبب اختلال در عملکردهای مخچه‌ای شود. به نظر می‌رسد که تجویز متادون باید با احتیاط‌های بیشتری همراه باشد.

واژگان کلیدی: متادون؛ نورون پورکینژ؛ استریولوژی؛ التهاب عصبی؛ آپوپتوزیس؛ قشر مخچه؛ ایمونوهیستوشیمی؛ هماهنگی حرکتی

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Zamani N, Takbiri Osgooyee L, Aliaghaei A, Zamani N, Hosnian-Moghadam H. Investigating the Toxic Effect of Methadone on the Cerebellar Tissue of Adult Male Rats. Pejouhesh dar Pezeshki. 2023;47(4):22-32.

[*] **اولین نویسنده مسئول مکاتبات:** عباس علی‌آقایی؛ **آدرس پست الکترونیکی:** abbas.aliaghaei@sbmu.ac.ir
گروه بیولوژی و علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
[*] **دومین نویسنده مسئول مکاتبات:** لعیا تکبیری‌اسگویی؛ **آدرس پست الکترونیکی:** l_takbiri@iau-tnb.ac.ir
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]
CC BY NC

مقدمه

مخچه یک ساختار عصبی مرکزی است که در حفره جمجمه خلفی قرار دارد و نقشی محوری در هماهنگی حرکت و تنظیم کنترل حرکتی ایفا می‌کند. مدارهای عصبی پیچیده آن اطلاعات حسی را از سیستم حس عمقی و نواحی مختلف مغز یکپارچه می‌کنند و دستورهای حرکتی را تنظیم می‌کنند تا از دقت حرکت اطمینان حاصل کنند (۱). مخچه از طریق ارتباط با قشر مخ و ساقه مغز به یادگیری حرکتی، کسب مهارت و تصحیح خطا کمک می‌کند و بهینه‌سازی وظایف حرکتی را در طول زمان ممکن می‌سازد. علاوه بر این، تحقیق‌های در حال ظهور نشان می‌دهد که مخچه ممکن است بر عملکردهای شناختی مانند زبان و حافظه کاری نیز تأثیر بگذارد که نشان‌دهنده نقش گسترده‌تری در ادغام کلی فرآیندهای حسی- حرکتی و شناختی است (۲).

اعتیاد به مواد مخدر مشکلی بزرگ در سراسر جهان است که به طور قابل توجهی بر بار جهانی بیماری تأثیر می‌گذارد و منجر به این فرضیه شده است که اعتیاد انسان به مواد مخدر با سیستم پاداش در مغز همراه است. پاداش‌های بیش از حد مرتبط با مواد مخدر و پاسخ‌های کمتر از حد انتظار نسبت به مواد طبیعی ترشح شده در بدن، اساس کار مخدرها است. مصرف مواد مخدر اغلب با وجود تکرار ادامه می‌یابد. این نشان میدهد که هنگام مصرف مواد مخدر، انسان در فرایند اعتیاد نه تنها پردازش مثبت (پاداش) اطلاعات، بلکه پردازش منفی (مجازات) اطلاعات نیز دستخوش تغییرهای غیرطبیعی شده است. این فرضیه وجود دارد که داروهای وابستگی‌دهنده سیستم‌های مغز را برای یادگیری در مورد پاداش ومجازات‌ها، به گونه‌ای تغییر می‌دهند که محرک‌های مربوط به مواد مخدر بیش از حد و محرک‌های غیرمرتبط با مواد مخدر کم‌تر از حد عادی بیان شوند (۳).

مخچه به طور فزاینده‌ای در فرآیندهای مرتبط با اعتیاد نقش دارد. تحقیق‌های اخیر دخالت مخچه در اعتیاد را از طریق تأثیر آن بر مدارهای پاداش و رفتارهای مرتبط نشان داده است. مطالعه‌های تصویربرداری عصبی تغییر فعالیت و مدارهای عصبی مخچه را در افراد معتاد نشان می‌دهد که نشان‌دهنده مشارکت آن در ولع مصرف، جست‌وجوی مواد مخدر و عود است (۴). ارتباط مخچه با سیستم دوپامین مزولیمبیک و قشر جلوی مغز نیز بر نقش آن در رفتارهای اعتیادآور، به طور بالقوه از طریق تعدیل پردازش پاداش، تصمیم‌گیری و تنظیم عاطفی تأکید می‌کند (۵). درک نقش مخچه در اعتیاد برای درک جامع مکانیسم‌های اعتیاد حیاتی است و ممکن است راه‌های جدیدی برای مداخله‌های درمانی هدفمند ارائه دهد.

متادون (Methadone) یک اپیوئید مصنوعی است که برای درمان اعتیاد به مواد مخدر استفاده می‌شود (۶). این دارو به دلیل خصوصیاتی از قبیل دسترسی زیستی بالا (۴۰ تا ۹۹ درصد)، نیمه‌عمر طولانی (حدود ۲۴ ساعت) و مدت زمان اثر بلند (بین ۵ تا ۱۳۰ ساعت)، جزو مواد ارجح برای درمان اعتیاد قرار گرفته است (۷). با این حال، مصرف زیاد و یا تصادفی متادون می‌تواند منجر به مرگ و ناتوانی عصبی شود. به طور کلی، تأثیرات این دارو بر سیستم عصبی مرکزی در مدل‌های حیوانی، به ویژه جنین‌های موش، مورد مطالعه قرار گرفته است و مسائلی مانند تأثیر بر کودکان در دوران جنینی از طریق مادران معتاد، موردبحث قرار گرفته است (۸، ۹).

گیرنده‌های اپیوئیدی که نقش مهمی در مکانیسم‌های سیناپسی و مداری پلاستیسیته مرتبط با استفاده از مواد و بهبود اعتیاد به اپیوئیدها و دیگر مواد مخدر ایفا می‌کنند، در سراسر مخچه حضور دارند (۱۰). کلاس مو گیرنده‌های اپیوئیدی که در مخچه انسان و مناطق لیمبیکی وجود دارد، بسیار به متادون مصنوعی تمایل دارند. سمیت غالب متادون و مسمومیت و اوردوز هروئین در مخچه در تعدادی از مقاله‌ها نشان داده شده است (۱۱).

متادون از سد جفت عبور می‌کند و به مقدار قابل اندازه‌گیری در بافت‌های جنین از جمله مغز تجمع می‌یابد و درنتیجه سبب مشکلات عصبی و اختلال رشد مغز در جنینی می‌شود. این اختلال‌ها علاوه بر تأثیر بر سیستم دوپامینرژیک، روی سیستم‌های سروتونرژیک و کولینرژیک نیز تاثیر می‌گذارند و سبب اختلال‌های اضطرابی و افسردگی می‌شوند. تاکنون اطلاعاتی درباره اثر متادون بر روی قسمت‌های مختلف مغز وجود دارد، ولی تأثیر دقیق متادون برروی مغز و مخچه

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

ناشناخته باقی مانده است (۱۲). هدف اصلی این مطالعه، بررسی پیامدهای مزمن مصرف متادون بر سلول‌های مخچه در موش‌ها است. این مطالعه در آبان ماه سال ۱۴۰۱ و در گروه بیولوژی و علوم تشریحی دانشکده پزشکی انجام شد.

روش کار

مطالعه حاضر از نوع مطالعه تجربی (experimental) است. تعداد ۲۴ سر موش صحرایی نر بالغ با وزن ۲۰۰ تا ۲۲۰ گرم از آزمایشگاه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهیه شدند (۱۳). موش‌ها در اتاق حیوانات با چرخه‌های کنترل‌شده نور/ تاریکی ۱۲ ساعته و دمای ۱۸ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد پرورش داده شدند. آنها به طور تصادفی به دو گروه کنترل و درمان با متادون (۱۲ نفر در هر گروه) تقسیم شدند. در گروه متادون، متادون در سالین ۰/۹ درصد حل شد و در دمای اتاق نگهداری شد. این محلول یک بار در روز به مدت دو هفته با افزایش دوز به موش‌ها تزریق شد. دوز تزریقی ۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم در دو روز اول و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در سه روز بعد در هفته اول بود. در هفته دوم، دوز به ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم افزایش یافت. به گروه کنترل ۰/۹ درصد سرم نمکی تزریق شد. همه تزریق‌ها به صورت زیر جلدی (SC) با دوز یک میلی‌لیتر بر کیلوگرم در ساعت ۸ تا ۱۰ صبح انجام شد. آنها هر دو هفته به طور متناوب بین سمت راست و چپ پایین کمر تجویز شدند. حداکثر دوز (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر اساس LD50 برای متادون در موش‌ها انتخاب شد که به ترتیب ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم برای تجویز خوراکی و داخل وریدی (IV) است.

آماده‌سازی بافت

در پایان هفته دو موش صحرایی با استفاده ازکتامین - زایلازین بیهوش شدند. با برشی در خط وسط تا حدود یک سانتی‌متر پایین‌تر از زائده زایفوئید استرنوم، قفسه سینه باز شده و قلب از پریکارد جدا شد. با کنار زدن ریه چپ، کانول پرفیوژن را از رأس قلب وارد بطن چپ کردیم. سپس با برقرار ساختن جریان آرام نرمال سالین (۱۵۰ملی‌لیتر) به درون بطن چپ، دهلیز راست شکافته شد تا خون خارج شود. پس از اتمام مرحله شست‌وشو با نرمال سالین، از همان ست اتصالی به میزان ۲۰۰میلی‌لیتر فیکساتیو فرمالین ۱۰ درصد به رگ‌های حیوان وارد شد. در انتها مخچه حیوانات به سرعت خارج شد و برای فیکساسیون ثانویه در داخل فرمالین ۱۰ درصد در دمای ۴ درجه به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند. بعد از پایان مرحله فیکساسیون، نمونه‌ها بر اساس روش متداول بافت شناسی (روش پارافین)، یعنی عبور دادن نمونه‌ها از الکل‌های صعودی(برای آبگیری) و عبور از گزیلل و پارافین به ترتیب برای شفاف‌سازی و آغشته‌سازی طبق روش‌های مندرج قالب‌گیری شدند. این کار به روش اتوماتیک و با استفاده از دستگاه پروسس بافتی انجام گرفت. پس از تهیه بلوک‌های پارافینی، برش‌گیری از نمونه‌ها با استفاده از دستگاه میکروتوم روتاری در ضخامت ۱۰ میکرون انجام شد. نهایتاً از این لام‌ها برای مطالعه‌های بافت‌شناسی استفاده شد. (تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه: ۶ سر)

مطالعه‌های استریولوژی

از روش ارزیابی استریولوژی برای مطالعه پارامترهای بافت‌شناسی استفاده شد. برای تعیین حجم از تکنیک‌کاوالیری و برای تخمین تعداد از روش Optical disector استفاده شد. (تعداد نمونه‌های استفاده شده در هر گروه:۵ نمونه)

تکنیک کاوالیری (برای تعیین حجم)

نخستین مرحله برای انجام این تکنیک، برش زدن بافت مخچه به صورت سریال بود. در مرحله بعدی، ۱۰ مقطع بافتی برای انجام این تکنیک به صورت تصادفی و روش Systemaic Uniform Random Sampleing انتخاب شد. به این ترتیب که ابتدا تعداد کل مقطع‌های یک نمونه بر عدد ۱۰ تقسیم شده و اولین مقطع بافتی به صورت تصادفی در فاصله ۱۰-۰ به دست آمده انتخاب شده و مقطع بعدی به فاصله عدد به دست آمده، از مقطع قبلی انتخاب شد. به این ترتیب ۱۰ مقطع از یک نمونه به طور تصادفی انتخاب شد. سپس از یک سیستم آزمون چند منظوره[1] دارای ۵۰ نقطه برای محاسبه حجم استفاده شد. در این شبکه نقاط به صورت تصادفی روی مقاطع بافتی قرار گرفته

[1] Multipurpose test system

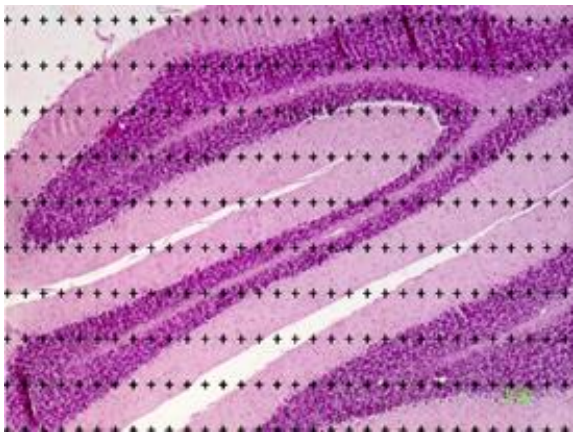
[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

(شکل ۲-۳) و با شمارش تعداد نقاط، حجم کل با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$V = \sum p \times a / p \times t$$

در این کار از ویدئو پروجکتینگ با بزرگنمایی نهایی (۴۰x) استفاده شد و حجم کل با واحد mm3 بیان شد. اعداد ثابت در این فرمول عبارتند از $\sum p$ که بیانگر تعداد نقاطی از سیستم آزمون است که بر روی بافت قرار می‌گیرد. برای محاسبه a/ p از فرمول $a/p = \Delta y.\Delta x / M^2$ استفاده شد. Δx و Δy، فاصله هر نقطه از نقطه دیگری در محور x و یا y است، M^2 (Magnification) بزرگ‌نمایی میکروسکوپ به توان ۲ است و t فاصله هر مقطع از مقطع بعدی است که با فرمول زیر محاسبه شد به این ترتیب که تعداد کل مقاطع بافتی بر عدد ۱۰ تقسیم شده تا عدد حاصل شده در ضخامت هر مقطع بافتی ضرب و اندازه d به دست آید (۱۴).

D = تعداد کل مقطع های بافتی / t ×۱۰



شکل ۱- پروب اندازه‌گیری حجم

روش Optical dissector (برای شمارش سلول‌ها)

برای محاسبه تعداد نورون‌ها از روش Optical dissector استفاده کردیم (۱۴). همچنین از دستگاه میکروکیتور (Heidenhain Main ND221B,Germany) و فریم مخصوص شمارش استفاده شد. برای محاسبه تعداد نورون‌های پورکنژ، برش‌هایی به روش SURS (Systematic uniform random sampling) انتخاب کردیم، به این ترتیب که به طور تصادفی ۱۰ برش انتخاب شد. سپس تمام میدان دید هر برش با استفاده از میکروسکوپ (Nikon, Japan) و با لنز X ۴۰ و بزرگنمایی ۴۰۰ بررسی شد. بر اساس روش شمارش بر روی فریم مخصوص شمارش، نورون‌هایی انتخاب می‌شوند که هسته آنها در داخل فریم شمارش و یا روی خطوط قابل پذیرش باشند، مواردی که با خطوط ممنوعه تماس دارند، مورد قبول نیستند و بنابراین شمارش نمی‌شوند (شکل ۲). سپس دانسیته نورون‌ها طبق رابطه زیر محاسبه شد:

$$N_V = \frac{\sum_{i=1}^{n} Q}{h \times \sum P \times a/f} \times \frac{t}{B.A}$$

$\sum P$ = مجموع نقاط برخورد با فیلدهای انتخابی

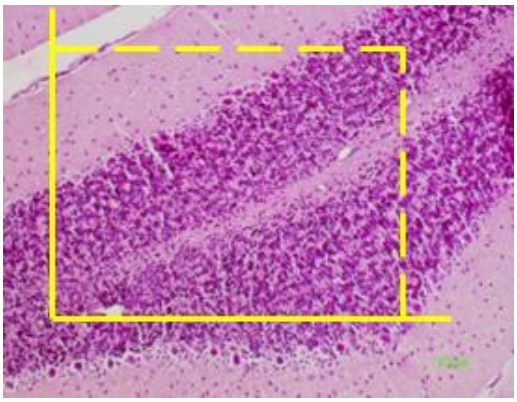
$\sum_{i=1}^{n} Q$ = مجموع تعداد انواع سلول‌های شمرده شده

a/f = سطح فریم در مقایسه واقعی بافت

h = ارتفاعی از برش که در آن شمارش انجام می‌شود و با دستگاه میکروکیتور اندازه‌گیری می‌شود.

B.A = ضخامت برش

t = ضخامت واقعی برش که با دستگاه میکروکیتور اندازه‌گیری می‌شود.



شکل ۲- فریم شمارش سلولی

ایمونوهیستوشیمی

همان‌طور که قبلاً ذکر شد، حیوانات پس از بیهوش شدن با محلول کتامین / زایلوزین، پرفیوژن شده و مخچه آنها با محلول فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد و پس از فیکس شدن بیشتر در

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

محلول فرمالین به مدت ۴۸ ساعت، فرایند پروسس بافتی و قالب‌گیری با پارافین انجام شد. بافت‌ها پس از برش‌گیری و زدودن پارافین و آب دهی با الکل، برای بازیابی آنتی ژن[2]، نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه در محلول بافر سیترات با pH 6 اینکوبه شدند. بافت‌ها پس از سرد شدن با محلول PBS شسته شدند و به مدت ۲۰ دقیقه با محلول ۰/۳ درصد Triton X-100 اینکوبه شدند. پس از آن به مدت ۴۵ دقیقه در محلول بلاکینگ اینکوبه شدند. سپس به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با آنتی بادی اولیه شامل mouse anti calbindin به نسبت (۱:۱۰۰) اینکوبه شد. پس از شست‌وشوی بافت‌ها با PBS نمونه‌ها به مدت یک ساعت در آنتی‌بادی ثانویه goat anti mouse HRP اینکوبه شدند. پس از شست‌وشو و رنگ‌آمیزی هسته‌ها با هماتوکسیلین، بافت‌ها در زیر یک میکروسکوپ نوری بررسی شدند (۱۳).

روش تجزیه و تحلیل آماری

بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار Graphpad prism ver.7 انجام شد. داده های کمی به صورت Mean ± SEM گزارش شد. آنالیز داده‌ها با کمک آزمون T-test انجام شد. سطح معناداری تفاوت‌ها ۰/۰۵ > P در نظر گرفته شد.

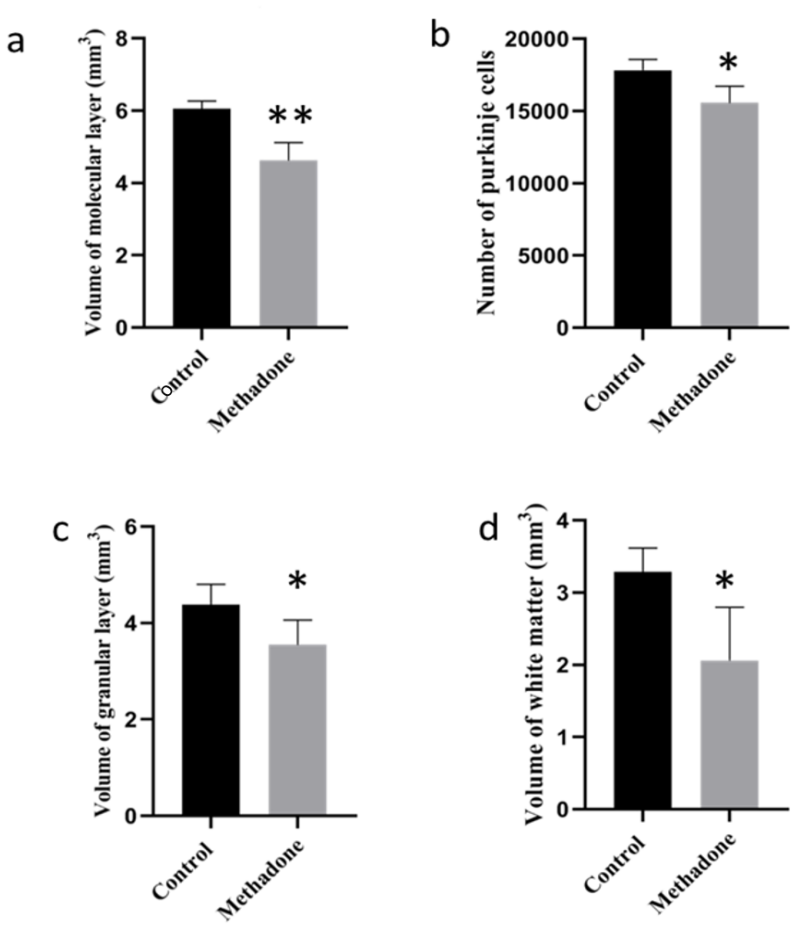
یافته‌ها

متادون و حجم ماده خاکستری و سفید در مخچه

نتایج ما نشان داد که متادون سبب کاهش حجم لایه مولکولار مخچه در مقایسه با گروه کنترل می‌شود که این کاهش از نظر آماری معنادار بود (۰/۰۱ > P) (P < 0.017, t = 5.37 , Mean±SEM =1.429 ± 0.26) (میانگین گروه کنترل ۶/۰۵ و گروه متادون ۴/۶۲ بود) (شکل ۳) (نمودار1a). از طرفی شمارش نورون‌های پورکینژ مخچه در گروه‌های مورد مطالعه نیز نشان داد که تعداد نورون‌های پورکینژ در گروه متادون نسبت به گروه کنترل، کاهش معناداری نشان می‌داد (۰/۰۵ > P) (P<0.016, t=3.291, Mean ± SEM =2264 ± 687.9) (میانگین گروه کنترل ۱۷۸۲۶ و میانگین گروه متادون ۱۵۵۶۲ بود) (نمودار1b). به نظر می‌رسید که مورفولوژی نورون‌های پورکینژ نیز در گروه متادون نسبت به گروه کنترل تغییر نشان داده بود. از طرفی نتایج ما نشان داد که تجویز متادون سبب کاهش حجم لایه گرانولار نسبت به گروه کنترل شد (P < 0.05) (P < 0.04, t = 2.479, Mean ± SEM = 0.825 ± 0.33) (میانگین گروه کنترل ۴/۳۷۵ و میانگین گروه متادون ۳/۵۵ بود) (نمودار1c). این کاهش حجم بویژه با کاهش تراکم نورون‌های گرانولار در گروه متادون قابل مشاهده بود و احتمالاً این کاهش تراکم می‌توانست نشان‌دهنده مرگ نورون‌های گرانولار ناشی از تجویز متادون باشد. علاوه بر این نتایج ما نشان داد که تجویز متادون سبب کاهش حجم ماده سفید مخچه نسبت به گروه کنترل می‌شود که این کاهش از نظر آماری معنادار بود (P < 0.05) (P< 0.02, t = 3.03, Mean ± SEM = 1.229 ± 0.404) (میانگین گروه کنترل ۳/۲۸ و میانگین گروه متادون ۲/۰۶ بود) (نمودار1d).

[2] Antigen retrieval

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]



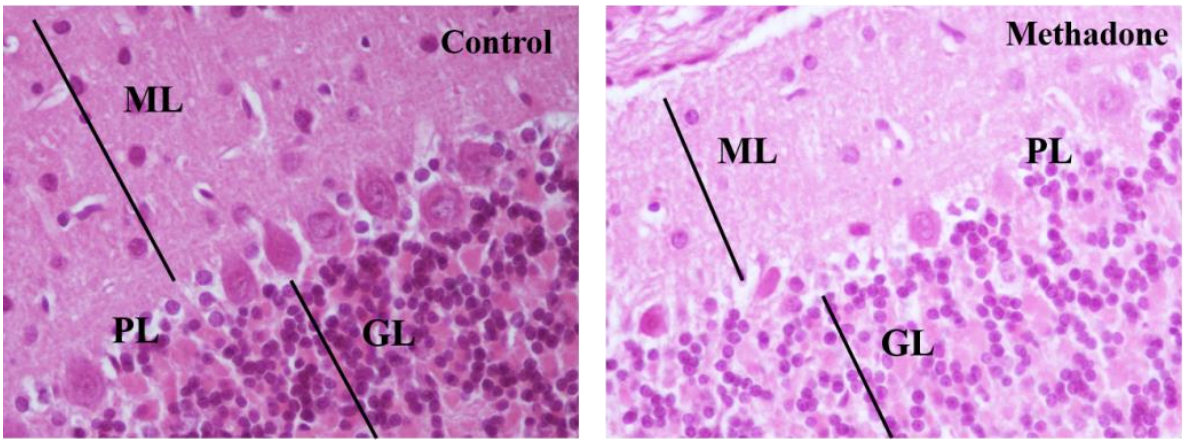
نمودار ۱- آنالیز استریولوژی در گروه‌های مورد مطالعه.

a= حجم لایه مولکولار در گروه دریافت کننده متادون نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود،

b= شمارش تعداد نورون‌های پورکینژ در گروه‌های مورد مطالعه نشان‌دهنده کاهش معنادار در تعداد این نورون‌ها در گروه متادون بود،

c= اندازه‌گیری حجم لایه گرانولار در گروه‌های مورد مطالعه،

d= اندازه‌گیری حجم ماده سفید مخچه نشان‌دهنده کاهش حجم ماده سفید در گروه متادون نسبت به گروه کنترل بود ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$).



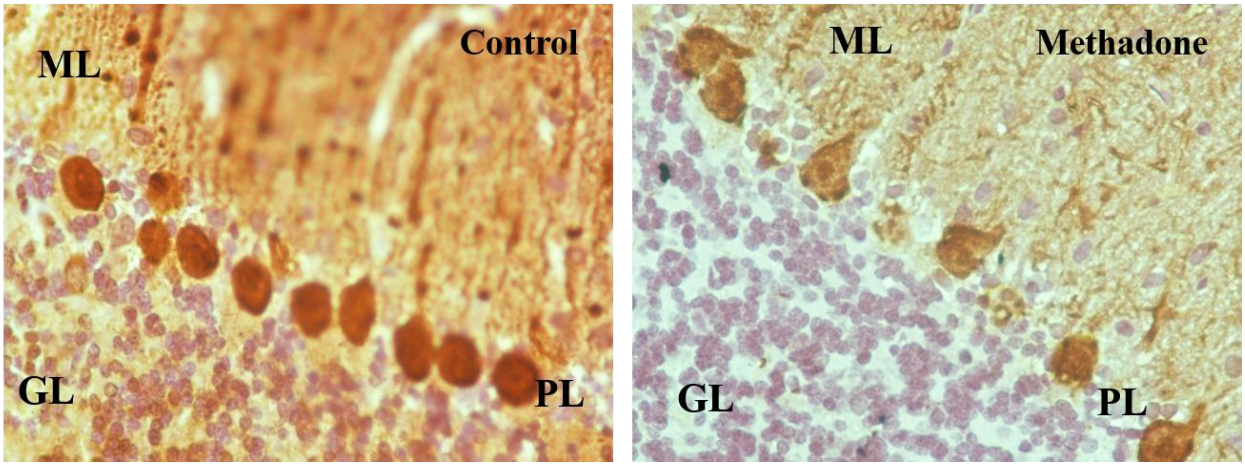
شکل ۳- رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین/ ائوزین از بافت مخچه برای استریولوژی در گروه‌های مورد مطالعه.

لایه مولکولار (ML)، لایه پورکینژ (PL) و لایه گرانولار (GL).

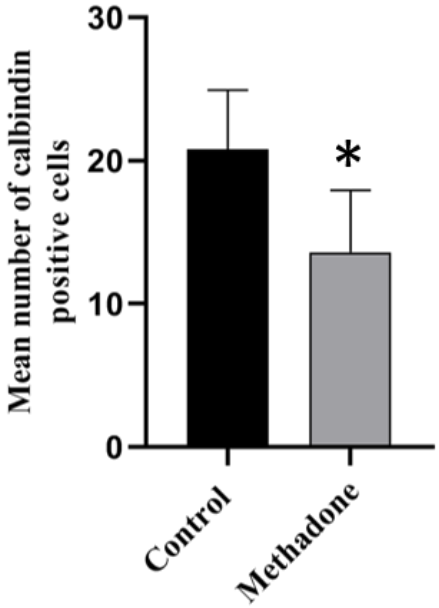
[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

متادون و تعداد نورون‌های پورکینژ مخچه:

کالبیندین در نورون‌های حقیقی بیان می‌شود و از آنجا که نورون‌های پورکینژ در مخچه به عنوان تنها نورون حقیقی مخچه هستند، بنابراین برای شناسایی این نورون‌ها از آنتی بادی کالبیندین می‌توان استفاده کرد (شکل ۴). نتایج مطالعه ما نشان داد که تجویز متادون سبب کاهش تعداد نورون‌های پورکینژ می‌شود که این کاهش از نظر آماری معنادار بود ($P < 0.05$) ($P< 0.02, t = 2.68, Mean \pm SEM = 7.2 \pm 2.68$) (میانگین گروه کنترل ۲۰/۸ و گروه متادون ۱۳/۶ بود) (نمودار ۲). به نظر می رسد این کاهش تعداد نورون‌های پورکینژ می‌تواند با مرگ سلولی در ارتباط باشد.



شکل ۴- ایمونوهیستوشیمی علیه پروتئین کالبیندین که یک مارکر اختصاصی نورون‌های پورکینژ است. لایه مولکولار (ML)، لایه پورکینژ (PL) و لایه گرانولار (GL).



نمودار ۲- آنالیز شمارش نورون‌های بیان‌کننده کالبیندین به دنبال ایمونوهیستوشیمی نشان‌دهنده کاهش معنادار این نورون‌ها در گروه دریافت‌کننده متادون است ($P < 0.05$*).

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

بحث

نتایج مطالعه ما نشان داد که متادون سبب آسیب به قشر مخچه و نیز ماده سفید مخچه می‌شود. حجم لایه مولکولار، تعداد نورون پورکینژ و نیز حجم لایه گرانولار توسط متادون کاهش یافته بود. از طرفی نتایج ایمونوهیستوشیمی نیز نشان داد که متادون می‌تواند سبب مرگ سلول‌های پورکینژ در مخچه شود. تأثیر قرار گرفتن در معرض اوپیوئیدها بر مغز انسان، حیوانات، نوزادان و کودکان موضوع بسیاری از مطالعه‌ها بوده است. در حیوانات، نشان داده شده است که اوپیوئیدهایی مانند متادون و بوپرنورفین می‌توانند آثار نامطلوبی بر دستگاه عصبی مرکزی (CNS) داشته باشند. متادون یک ماده اپیوئیدی سنتتیک است که میل ترکیبی بالایی با گیرنده‌های اپیوئیدی کلاس μ دارد که در مخچه و سیستم لیمبیک در انسان به فراوانی یافت می‌شوند. چندین مطالعه کیس ریپورت سمیت مخچه‌ای ناشی از متادون و همچنین اوردوز هروئین را نشان داده‌اند (۱۵، ۱۶). از سوی دیگر، تغییرهای خاصی در میلینیزه شدن و بلوغ الیگودندروسیت و به دنبال آن تغییر در ضخامت میلین، اندازه آکسون، تولید نورون کولینرژیک و کاهش بیان عصب فاکتور رشد در استریاتوم به دنبال قرار گرفتن در معرض اپیوئیدها دیده شده است (۱۹-۱۷). علاوه بر این، نشان داده شده است که قرار گرفتن در معرض مورفین در رحم نیز سبب کاهش اندازه و تعداد سلول‌های پورکنژ در مخچه موش‌های نوزاد می‌شود (۲۰).

نشان داده شده است که نواحی مختلفی از مغز تحت تأثیر متادون قرار می‌گیرند (۲۱). چندین مطالعه گزارش کرده‌اند که مصرف اپیوئیدها می‌تواند فعالیت حرکتی را تغییر دهد. نتایج مطالعه‌ها با دوزهای مختلف به طور کلی نشان می‌دهد که اپیوئیدها می‌توانند به صورت وابسته به دوز و زمان سپری شده از زمان تزریق میزان فعالیت را افزایش و یا کاهش دهد. از آنجا که مخچه نقشی بسیار حیاتی و مهم در هماهنگی حرکتی و تعادل دارد، در این مطالعه بر آن شدیم تا تاثیر متادون را بر بافت آن بررسی کنیم.

آنالیز استریولوژی ما نشان‌دهنده کاهش حجم لایه مولکولار، لایه گرانولار و کاهش حجم ماده سفید مخچه بود. از طرفی آنالیز ایمونوهیستوشیمی ما علیه مارکر calbindin که اختصاصی نورون‌های پورکینژ است کاهش تعداد نورون‌های پورکینژ در گروه متادون را نشان داد. این کاهش حجم و تعداد سلول‌ها می‌تواند ناشی از مرگ سلولی باشد. نتایج قبلی ما نشان داده‌اند که تجویز متادون می‌تواند سبب مرگ سلولی در مخچه شود که با افزایش بیان پروتئین کاسپاز-۳ همراه است (۱۳). تحقیق‌های بسیاری نشان داده‌اند که پروتئازهای کاسپاز به طور اساسی در مسیر انتقال سیگنال آپوپتوز نقش دارند و به آن کمک می‌کنند. Perez-Alvarez و همکاران اثر متادون را روی میتوکندری در سلول‌های SH-SY5Y بررسی کردند و نشان دادند که تجمع زیاد متادون منجر به مرگ سلولی می‌شود (۲۲). بنابراین، می‌توان گفت که استفاده از متادون ممکن است منجر به آسیب‌های عصبی برگشت‌ناپذیر و مرگ نورون‌ها شود. در توافق با این نتیجه، یافته‌های مطالعه واصل‌به‌حق و همکاران نیز نشان‌دهنده افزایش سلول‌های پیکنوتیک در ناحیه CA1 هیپوکامپ پس از تجویز متادون بود. همچنین، یوشیدا و همکاران گزارش دادند که درمان با بوپرنورفین می‌تواند یک پروتئاز فعال شبه کاسپاز- ۳ را ایجاد کرده که خواص آپوپتوز مانند قطعه قطعه شدن هسته و نردبان DNA را ایجاد می‌کند. اخیراً گزارش شده است که کاسپاز-۳ سبب ایجاد DNase فعال شده با کاسپاز-۳ (CAD) می‌شود که منجر به تکه تکه شدن DNA می‌شود (۲۳).

علاوه بر فعال شدن مستقیم مسیر آپوپتوز توسط کاسپاز- ۳ که به آن اشاره شد، مکانیسم‌های دیگری نیز می‌توانند مرگ سلولی و حجم کاهش یافته مخچه در نتیجه آن در گروه متادون را توجیه کنند. در مطالعه قبلی ما نشان داده شد که متادون می‌تواند سبب تحریک آستروگلیوز و میکروگلیوز و به دنبال آن مسیرهای التهابی شود که در نهایت تمامی این مسیرها منجر به تحریک آپوپتوز می‌شود. در شرایط آزمایشگاهی، نشان داده شده است که سلول‌های میکروگلیا خالص شده ترکیب‌های سیتوتوکسیکی از جمله سیتوکین‌ها (۲۴)، پروتئازها (۲۵)، رادیکال‌های آزاد، یا آگونیست‌های گلوتامات را تولید می‌کنند. همچنین، نشان داده شده است که آستروسیت‌های فعال شده

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

نیز در کنار آثار مفیدشان دارای آثار مضرنیز هستند (۲۶، ۲۷). برای مثال، داده‌های در حال ظهور در آسیب‌های ایسکمیک مغزی نشان می‌دهد که آستروسیت‌های فعال شده می‌توانند آثار محافظت‌کننده عصبی داشته باشند و به ترمیم بافت مغز کمک کنند؛ آنها همچنین می‌توانند فاکتورهای‌های التهابی ترشح کنند که منجر به تشدید ضایعه ایسکمیک و مرگ سلولی شود (۲۸).

با توجه به اینکه متادون می‌تواند آثار سمی بر روی تمام بافت‌های بدن به جا بگذارد و از طرفی مرگ و میر حیوانات در طی مطالعه با متادون نیز بالا است، بنابراین این عوامل می‌تواند به عنوان محدودیت‌های این مطالعه قلمداد شود. با این حال به دلیل اینکه مطالعه‌های زیادی از اثر متادون روی مخچه گزارش نشده است، این می‌تواند به عنوان یک جنبه مثبت در این مطالعه در نظر گرفته شود. این مطالعه تأثیر متادون بر مخچه را مورد بررسی قرار داد که نتایج آن می‌توانند در توسعه استراتژی‌های درمانی جدید برای درمان اعتیاد به اپیوئیدها اهمیت زیادی داشته باشد. این امر به نوبه خود می‌تواند هزینه‌های هنگفتی را که بیماری‌های مرتبط با اعتیاد به اپیوئیدها بر جامعه تحمیل می‌کند، کاهش دهد.

نتیجه‌گیری

به طوری کلی نتایج ما نشان می‌دهد که متادون می‌تواند سبب القای آثار سمی روی بافت مخچه شود. این آثار سمی می‌تواند منجر به مرگ سلول‌های عصبی شود. به نظر می‌رسد که متادون از طریق القای استرس اکسیداتیو، التهاب عصبی و همچنین آپوپتوزیس، سبب مرگ سلولی و تخریب بافت عصبی شود .

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه، در معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بررسی و با کد اخلاق IR.SBMU.RETECH.REC.1400.749 ثبت شده است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه خانم نغمه زمانی برای دریافت درجه دکترای تخصصی در رشته ژنتیک از دانشگاه آزاد واحد تهران شمال می باشد.

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافعی را گزارش نکرده‌اند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

References

1. Spampinato, D.A., E.P. Casula, and G. Koch, *The Cerebellum and the Motor Cortex: Multiple Networks Controlling Multiple Aspects of Behavior.* The Neuroscientist, 2023: p. 10738584231189435.

2. Koziol, L.F., et al., *Consensus paper: the cerebellum's role in movement and cognition.* The Cerebellum, 2014. 13: p. 151-177.

3. Gradin, V.B., et al., *Abnormal Brain Activity During a Reward and Loss Task in Opiate-Dependent Patients Receiving Methadone Maintenance Therapy.* Neuropsychopharmacology, 2014. 39(4): p. 885-94.

4. Moulton, E.A., et al., *The cerebellum and addiction: insights gained from neuroimaging research.* Addiction biology, 2014. 19(3): p. 317-331.

5. Moreno-Rius, J., *Opioid addiction and the cerebellum.* Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2019 .107 :p. 238-251.

6. Corkery, J., et al., *Methadone effects and its role in fatalities.* Hum Psychopharmacol Clin Exp, 2004. 19: p. 565-576.

7. Foster, D.J., et al., *Steady-state pharmacokinetics of (R)-and (S)-methadone in methadone maintenance patients.* British journal of clinical pharmacology, 2000. 50(5): p. 427-440.

8. Eap, C.B., T. Buclin, and P. Baumann, *Interindividual variability of the clinical pharmacokinetics of methadone: implications for the treatment of opioid dependence.* Clinical pharmacokinetics, 2002. 41: p. 1153-1193.

9. Farid, W., et al., *The effects of maternally administered methadone, buprenorphine and naltrexone on offspring: review of human and animal data.* Current neuropharmacology, 2008. 6(2): p. 125-150.

10. Ranjbar, H., et al ,.*Addiction and the cerebellum with a focus on actions of opioid receptors.* Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2021. 131: p. 229-247.

11. Fjelldal, M.F., et al., *Opioid receptor-mediated changes in the NMDA receptor in developing rat and chicken.* International Journal of Developmental Neuroscience, 2019. 78: p. 19-27.

12. Zhu, J., et al., *The influence of methadone on cerebral gray matter and functional connectivity.* Ann Palliat Med, 2021. 10: p. 9497-507.

13. Zamani, N., et al., *Chronic exposure to methadone induces activated microglia and astrocyte and cell death in the cerebellum of adult male rats.* Metabolic Brain Disease, 2023. 38(1): p. 323-338.

14. Ezi, S., et al., *Chronic exposure to tramadol induces neurodegeneration in the cerebellum of adult male rats.* Neurotoxicity research, 2021. 39: p. 1134-1147.

15. Zanin, A., et al., *A delayed methadone encephalopathy: clinical and neuroradiological findings.* Journal of child neurology, 2010. 25(6): p. 748-751.

16. Mills, F., et al., *Severe cerebellitis following methadone poisoning.* Pediatric radiology, 2008. 38: p. 227-229.

17. Robinson, S.E., *Effects of perinatal buprenorphine and methadone exposures on striatal cholinergic ontogeny.* Neurotoxicology and teratology, 2002. 24(2): p. 137-142.

18. Sanchez ,E.S., et al., *Opioid addiction and pregnancy: perinatal exposure to buprenorphine affects myelination in the developing brain.* Glia, 2008. 56(9): p. 1017-1027.

19. Wu, V.W., et al., *Perinatal opioids reduce striatal nerve growth factor content in rat striatum.* European journal of pharmacology, 2001. 414(2-3): p. 211-214.

20. Golalipour, M.J. and S. Ghafari, *Purkinje cells loss in off spring due to maternal morphine sulfate exposure: a morphometric study.* Anatomy & cell biology, 2012. 45(2): p. 121-127.

21. Berridge, K.C., *The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience.* Psychopharmacology, 2007. 191: p. 391-431.

22. Perez-Alvarez, S., et al., *Methadone induces necrotic-like cell death in SH-SY5Y cells by an impairment of mitochondrial ATP synthesis.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2010. 1802(11): p. 1036-1047.

23. Yoshida, A., et al., *Opioid analgesic-induced apoptosis and caspase-independent cell death in human lung carcinoma A549 cells.* International journal of molecular medicine, 2000. 6(3): p. 329-364.

24. Combs, C.K., et al., *β-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFα-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis.* Journal of Neuroscience ,2001. 21(4): p. 1179-88.

25. Flavin, M., G. Zhao, and L. Ho, *Microglial tissue plasminogen activator (tPA) triggers neuronal apoptosis in vitro.* Glia, 2000. 29(4): p. 347-354.

26. Patabendige, A., et al., *Astrocyte activation in neurovascular damage and repair following ischaemic stroke.* International journal of molecular sciences, 2021. 22(8): p. 4280.

27. Shen, X.-Y., et al., *Activation and role of astrocytes in ischemic stroke.* Frontiers in cellular neuroscience, 2021. 15: p. 755955.

28. Lee, C.-H ,.et al., *Relationship between neuronal damage/death and astrogliosis in the cerebral motor cortex of gerbil models of mild and severe ischemia and reperfusion injury.* International Journal of Molecular Sciences, 2022. 23(9): p. 5096.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]