پیامدهای مواجههٔ مزمن رت‌های ماده با مرفین پیش از بارداری، بر حافظهٔ فضایی و تمایل به مصرف مرفین فرزندان نر و ماده

ندا مولائی[۱]، مهدی صادق[۲*]، محمدرضا پالیزوان[۳]، مهدیه موندنی‌زاده[۴]، نرگس السادات حائری[۱]

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه فیزیولوژی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۲. استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۳. دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۴. استادیار، گروه بیوتکنولوژی و پزشکی ملکولی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: ۲۹ فروردین ۱۳۹۵
تاریخ پذیرش: ۳ مرداد ۱۳۹۵

چکیده

اهداف با توجه به افزایش سوءمصرف اپیوئیدها در بین زنان و آثار پاتوفیزیولوژیکی مواجههٔ مزمن اپیوئیدها بر مادران که ممکن است غیرمستقیم فرزندان آن‌ها را تحت تأثیر قراردهد، در این مطالعه پیامدهای مصرف مزمن مرفین و ترک آن پیش از شروع بارداری بر حافظهٔ فضایی، حافظهٔ جتنابی و تمایل به مصرف مرفین فرزندان نسل اول بررسی شده است.

مواد و روش‌ها دوازده سر موش صحرایی مادهٔ ویستار به‌صورت تصادفی به دو گروه تقسیم شد. گروه مادران مرفینی دو ماه محلول مرفین (۰/۴ mg/ml) و گروه مادران کنترل آب معمولی دریافت کردند. یک ماه پس از قطع مصرف مرفین جفت‌گیری ماده‌ها انجام شد. بعد از زایمان، فرزندان به‌صورت مجزا در گروه‌های نر و ماده تقسیم و به‌عنوان گروه‌های هدف مطالعه استفاده شد. حافظهٔ فضایی با ماز آبی موریس، حافظهٔ جتنابی با شاتل باکس و تمایل به مصرف مرفین با اندازه‌گیری مصرف اختیاری محلول مرفین بررسی شد.

یافته‌ها میانگین مصرف روزانهٔ محلول مرفین در فرزندان نر و مادهٔ مادران مرفینی به‌صورت معناداری بالاتر از فرزندان نر و مادهٔ مادران کنترل بود (P> ۰/۰۵). نتایج یادگیری در ماز آبی نشان داد که فرزندان نر مادران مرفینی به‌طور معناداری نسبت به فرزندان نر گروه کنترل مسافت و زمان بیشتری را برای رسیدن به سکو صرف می‌کنند (P> ۰/۰۱). همچنین، در آزمون به‌خاطرآوری نیز فرزندان نر مادران مرفینی در مقایسه با فرزندان نر مادران کنترل دفعات کمتری از محل سکو عبور کرده‌اند (P> ۰/۰۰۱). تفاوت معناداری بین گروه‌های آزمایشی در میزان یادگیری اجتنابی وجود نداشت (P< ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری مطالعهٔ حاضر نشان داد مصرف مزمن مرفین پیش از بارداری، سبب اختلال در حافظهٔ فضایی فرزندان نر شد. همچنین، تمایل به مصرف مرفین در فرزندان نر و ماده را افزایش داد.

کلیدواژه‌ها:
اپیوئید، اعتیاد، حافظه، موش صحرایی، وابستگی.

مقدمه

فرآورده‌های اپیوئیدی و آگونیست‌های گیرندهٔ μ (مو) مانند مرفین، از پرمصرف‌ترین و قوی‌ترین داروهای ضددرد است. علاوه‌بر کاربردهای بالینی این فرآورده‌ها برای کنترل دردهای حاد و مزمن، موارد سوءمصرف این داروها شیوع گسترده‌ای دارد. گزارش‌های مختلف نشان می‌دهد که حضور طولانی‌مدت ترکیبات اپیوئیدی در پیرامون نورون‌ها سبب تغییر سازوکارهای نورونی و بروز فرایندهای سازشی در یاخته‌های دستگاه عصبی

* **نویسندهٔ مسئول: مهدی صادق**
نشانی: مرکزی، اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، کدپستی: ۳۸۴۸۱۷۶۹۴۱
تلفن: (۳۵۱) ۳۴۱۷۳۵۰۲ ۰۸۶ **نمابر:** ۳۴۱۷۳۵۲۱ ۰۸۶
رایانه: jsums@medsab.ac.ir

مجلهٔ علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ ۲۴، شمارهٔ ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۶، ص ۱۷-۲۷.
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۷۴۸۷-۱۶۰۶

می‌شود [۱، ۲]. بسیاری از نشانه‌های بیماری در پی مصرف مزمن اپیوئیدها به‌دلیل دگرگون‌شدن کارکردهای مدارهای عصبی مغز است که بر پایهٔ تغییرات ساختاری در مولکول‌ها و حتی ساختارهای ژنی سلول در پی تماس مستقیم و مزمن با اپیوئیدها رخ می‌دهد [۳، ۴]. حضور اپیوئیدها بر کارکرد بخش‌های درگیر در فرایند یادگیری، حافظه و شناخت اثرمی‌گذارد و به نظر می‌رسد دست‌کم بخشی از این آثار ماندگار است [۵، ۶]. هیپوکمپ و آمیگدال جزو ساختارهای مهم مغزی در فرایندهای یادگیری و حافظه است. تغییرات آناتومیکی یا فیزیولوژیکی این ساختارها تأثیرات قابل‌توجهی بر عملکردهای شناختی مغز می‌گذارد [۷-۱۰]. به‌دلیل حضور و توزیع گیرنده‌های اپیوئیدی این نواحی مغزی بسیار مستعد تأثیرپذیری از حضور اپیوئیدهاست [۱۱، ۱۲].

مصرف مواد اپیوئیدی مادر باردار یا مادر شیرده و تماس جنین یا نوزاد از طریق مادر با اپیوئیدها سبب بروز تغییراتی در عملکردهای رفتاری فرزندان می‌شود [۱۳، ۱۴]. این فرزندان بعد از تولد تمایل بالاتری به مصرف اپیوئیدها در مقایسه با فرزندان متولدشده از مادران طبیعی نشان می‌دهند [۱۵]. همچنین، در آزمون‌های رفتاری بررسی مدارهای پاداش و تنبیه مغزی میزان انگیزش بیشتری در این فرزندان دیده می‌شود. در مواردی بروز پیش‌فعالی به همراه کاهش توجه گزارش شده است [۱، ۱۶]. با این حال، به‌درستی مشخص نیست که آیا یک دورهٔ وابستگی به مرفین و سپس ترک آن پیش از بارداری و بدون تماس مستقیم مرفین با جنین از طریق خون یا شیر مادر بر عملکردهای رفتاری و شناختی فرزندان تأثیرگذار است؟ مطالعات حوزهٔ اپی‌ژنتیکی نشان می‌دهد که در برخی شرایط محیطی تغییراتی در ساختارهای پیرامون DNA (نظیر هیستون‌ها) ایجاد می‌شود که قابلیت انتقال به نسل بعدی را داراست، هرچند این نسل در تماس مستقیم با آن شرایط محیطی قرارنگیرد [۱۷، ۱۸].

شیوع سوءمصرف فرآورده‌های اپیوئیدی در بین زنان از یک‌سو و از سوی دیگر تأثیرپذیری سیستم عصبی زنان دچار وابستگی از حضور مزمن این اپیوئیدها و در نتیجه پیامدهای احتمالی آن بر کارکردهای سیستم عصبی فرزندان (به‌واسطهٔ سازوکارهای ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی)، نیاز به انجام پژوهش‌های پایه و بالینی برای روشن‌شدن ابعاد مختلف این مسئله را ایجاب می‌کند. در مطالعهٔ حاضر، پیامدهای یک دورهی وابستگی به مرفین و ترک آن پیش از بارداری موش‌های صحرایی، بر میزان تمایل فرزندان نر و مادهٔ آن‌ها به مصرف مرفین بررسی شده است. همچنین، توان یادگیری اجتنابی و فضایی در این فرزندان بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این مطالعهٔ تجربی، از موش‌های نر و مادهٔ بالغ نژاد ویستار استفاده شد. دوازده سرحیوان ماده و چهار سرحیوان نر به‌عنوان والدین وارد آزمایش شدند. ماده‌ها به‌صورت تصادفی در دو گروه (یک گروه مادران دریافت‌کنندهٔ مرفین و یک گروه مادران کنترل) تقسیم و در قفس‌های سه‌تایی به‌طور مجزا از نرها نگهداری شدند. نرها به‌صورت تصادفی در دو گروه تقسیم و تا زمان جفت‌گیری در قفس‌های دوتایی مجزا از ماده‌ها نگهداری شدند. در گروه مادران مرفینی، مرفین (مرفین سولفات تولیدشدهٔ شرکت تماد، ایران) به‌صورت محلول در آب خوراکی به حیوان داده می‌شد، به این صورت که ظرف آب حاوی مرفین در تمام ساعات در اختیار حیوانات هر قفس بود و حیوانات ضمن نوشیدن آب از مرفین استفاده می‌کردند. در گروه مادران کنترل، ظرف حاوی آب معمولی بود. مقدار مرفین در آب طی روند تدریجی در مدت یک هفته از (۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به (۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) افزایش داده شد. سپس، به‌مدت دو ماه حیوانات از مرفین (۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در آب خوراکی استفاده کردند [۱۹، ۲۰]. در پایان هر روز، مقدار مصرف‌شده از آب معمولی و آب حاوی مرفین در گروه‌های آزمایش اندازه‌گیری و ثبت می‌شد. سپس، آب یا محلول مرفین تازه ساخته‌شده در اختیار حیوانات قرارمی‌گرفت. در پایان دو ماه مرفین قطع شد. از این پس، همهٔ گروه‌ها فقط آب معمولی دریافت کردند [۲۱].

یک ماه پس از قطع مرفین یک حیوان نر برای جفت‌گیری در هر قفس حاوی ماده‌ها (ماده‌های مرفینی و ماده‌های کنترل) قرارگرفت. بعد از زایمان هر ماده و فرزندانش در قفس مجزا نگهداری شد و همهٔ گروه‌ها از آب معمولی استفاده کردند. این فرزندان به‌عنوان فرزندان نسل اول به‌صورت مجزا در گروه‌های نر و ماده تقسیم و به‌عنوان گروه‌های هدف مطالعه برای بررسی‌های بعدی استفاده شدند. گروه‌های هدف مطالعه به‌صورت زیر است: ۱. فرزندان نر متولدشده از مادران مرفینی، ۲. فرزندان نر متولدشده از مادران کنترل، ۳. فرزندان مادهٔ متولدشده از مادران مرفینی، ۴. فرزندان مادهٔ متولدشده از مادران کنترل. آزمایش‌ها روی این فرزندان نسل اول در هفته‌های ۸-۱۰ پس از تولد انجام شد. حیوانات در گروه‌های سه یا چهارتایی در قفس و در شرایط استاندارد (دمای ۲۲-۲۵ درجه و ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری می‌شد. غذا و آب به شکل آزاد در اختیار آن‌ها قرارداشت. حجم

نمونه متناسب با مطالعات مشابه ۶-۱۲ سرموش صحرایی در هر گروه انتخاب شد.

بررسی تمایل به مصرف مرفین

برای بررسی میزان تمایل به مصرف مرفین، پس از پایان دورهٔ شیردهی (انتهای هفتهٔ هشتم پس از تولد)، فرزندان نر و مادهٔ مادران مرفینی و کنترل به‌صورت جداگانه در قفس‌هایی سه‌تایی نگهداری شد (n= ۳ برای هر چهار گروه). در همهٔ گروه‌های آزمایش دو ظرف آب یکی حاوی مرفین و دیگری آب معمولی در تمام ساعات در اختیار حیوانات هر قفس بود و حیوانات هر گروه به‌صورت اختیاری از مرفین استفاده می‌کردند. مقدار مرفین در آب طی روند تدریجی در مدت یک هفته از ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزایش داده شد. سپس، به مدت یک‌ماه همین مقدار نگه داشته شد. در پایان هر روز مقدار مصرف‌شده از آب معمولی و آب حاوی مرفین در گروه‌های آزمایش اندازه‌گیری و ثبت می‌شد و مجدد آب یا محلول مرفین تازه ساخته‌شده در اختیار حیوانات قرارمی‌گرفت. میزان مصرف روزانهٔ آب و مرفین هر قفس اندازه‌گیری، سپس میانگین مصرف سرانه محاسبه می‌شد. مطالعه به مدت سی روز ادامه داشت و میانگین میزان مصرف سرانه طی این مدت اندازه‌گیری و برای تحلیل آماری استفاده شد.

شاتل باکس

برای بررسی حافظهٔ اجتنابی، یازده سر از فرزندان ماده و نه سر از فرزندان نر مادران مرفینی در شروع هفتهٔ هشت بعد از تولد انتخاب و در قفس‌های سه‌تایی نگهداری شد. از هفت سر فرزند نر و هفت سر فرزند مادهٔ مادران کنترل هم به‌عنوان گروه کنترل استفاده شد (فرزندان این چهار گروه در هیچ دوره‌ای مرفین مصرف نکرده‌اند و مستقل از فرزندان استفاده‌شده در آزمون اندازه‌گیری تمایل به مصرف مرفین است). دستگاه شاتل باکس از دو اتاقک از جنس پلکس‌گلاس ساخته شده بود. ابعاد هر اتاقک ۲۰×۲۰×۲۰ سانتی‌متر بود. دیوارهٔ خارجی یکی از اتاقک‌ها به‌گونه‌ای با کاغذ سیاه پوشیده شده بود که داخل اتاقک تاریک باشد (اتاقک تاریک) و در مقابل، اتاقک دیگر دیوارهٔ شفاف داشت (اتاقک روشن). کف هر اتاقک دارای میله‌های فلزی بود که به دستگاه تحریک الکتریکی متصل می‌شد و پژوهشگر را قادر می‌ساخت کف پای حیوان را با روش الکتریکی با شدت و مدت‌زمان مشخص تحریک کند. یک در فلزی قابل باز و بسته‌شدن دو اتاقک را از هم جدا می‌کرد. درهای روی سقف هر اتاقک نیز متحرک و قابلیت باز و بسته‌شدن را داشت. حیوان از طریق این درها در هر اتاقک قرارمی‌گرفت یا بیرون آورده می‌شد. همچنین، حیوان از در بین دو اتاقک می‌توانست بین دو اتاقک جابه‌جا شود.

آزمایش حافظهٔ اجتنابی طی چهار روز انجام می‌شد. در روز اول حیوان در قسمت روشن قرارمی‌گرفت و فرصت داده می‌شد تا ۱۰ ثانیه در این قسمت جست‌وجو کند. سپس، در بین دو اتاقک باز می‌شد و حیوان اجازه پیدا می‌کرد وارد اتاقک تاریک شود. بعد از ورود به اتاقک تاریک در بسته می‌شد و بعد از ۱۰ ثانیه ماندن در این قسمت، حیوان از همان سمت خارج و به قفس منتقل می‌شد. آزمایش روز اول بدون تحریک الکتریکی کف پا و فقط برای آشنای و عادت کردن به محیط صورت گرفت. در روز دوم، آزمایش به همان صورت روز اول تکرار شد، اما فاصلهٔ زمانی قرارگرفتن حیوان در اتاقک روشن تا ورود به اتاقک تاریک محاسبه و ثبت می‌شد. به‌علاوه، بعد از ورود به اتاقک تاریک تحریک الکتریکی (با شدت ۲ میلی‌آمپر به مدت ۲ ثانیه) به کف پای حیوان اعمال می‌شد. روز سوم و چهارم نیز آزمایش به‌همان روش روز دوم تکرار شد، به‌جز اینکه حیوان تحریک الکتریکی دریافت نکرد و فقط فاصلهٔ زمانی قرارگرفتن حیوان در اتاقک روشن تا ورود به اتاقک تاریک محاسبه و ثبت شد.

ماز آبی موریس

از همان حیوانات آزمون شاتل باکس برای بررسی حافظهٔ فضایی استفاده شد. پس از اتمام آزمون شاتل باکس چهار روز به حیوانات استراحت داده شد. سپس، وارد آزمون ماز آبی موریس شدند. این ماز شامل حوضچه‌ای استوانه‌ای شکل (قطر ۱۴۰ و ارتفاع ۸۰ سانتی‌متر) با رنگ سیاه کف و دیواره، تا ارتفاع ۴۰ سانتی‌متری از آب پرشد. دوربینی متصل به رایانه در بالای حوضچه طوری که قرارداشت که بتواند کل فضای داخل استوانه را فیلم‌برداری کند. در شروع آزمایش‌ها حوضچه به چهار قسمت مساوی تقسیم و با حروف E, N, S, W نام‌گذاری شد. یک سکوی سیاه طوری که ۱ سانتی‌متر از کف آب پایین‌تر باشد در یکی از ربع‌های استوانه قرارگرفت. این تقسیم‌بندی و محل سکو در تمام دورهٔ آزمایش ثابت بود. قبل از آموزش پشت موش‌ها برای پیداکردن و یادگرفتن محل سکو، با استفاده از رنگ قرمز (رنگ موی تجاری) رنگ شد که تمایز کافی برای ردیابی با دوربین ایجاد شود. آزمایش‌های یادگیری در ماز آبی در اتاق روشن با نور معمولی (اما ثابت در تمام دورهٔ آزمایش‌ها) انجام شد. طراحی نور اتاق به‌گونه‌ای بود که نور مستقیم داخل حوضچه نمی‌تابید. هر حیوان به مدت چهار روز و هر روز چهار بار آزمون در حوضچه انجام می‌شد و موش ۶۰

ثانیه فرصت داشت تا محل سکو را با شنا پیدا کند. در هر آزمون حیوان به‌صورت تصادفی از سمت یکی از ربع‌های حوضچه رها می‌شد. در صورتی که طی ۶۰ ثانیه حیوان نمی‌توانست سکو را پیدا کند، گرفتن فیلم قطع و با دست به‌آرامی حیوان به سمت سکو هدایت می‌شد. به حیوان ۱۵ ثانیه فرصت داده می‌شد روی سکو بماند و از روی سکو موقعیت‌یابی فضایی کند. سپس، حیوان برداشته می‌شد و پس از خشک شدن در قفس نزدیک دستگاه حرارتی قرارمی‌گرفت. در روز پنجم برای آزمون به‌خاطرآوری، سکو را از حوضچه خارج و تنها یک مرحله به حیوان فرصت شنا به مدت شصت ثانیه داده می‌شد. فیلم شنای حیوانات با دستوری در نرم‌افزار متلب تجزیه‌وتحلیل شد. در فیلم‌های شنای چهار روز آموزش مدت‌زمان سپری‌شده تا رسیدن حیوان به سکو، همچنین مسافت طی شده تا رسیدن به سکو محاسبه و استخراج شد. همچنین، سرعت شنا طی هر دورهٔ شنا محاسبه و استخراج شد. در روز پنجم، تعداد دفعات عبور از محل سکو و مدت‌زمان حضور در هر یک از ربع‌ها محاسبه و استخراج شد.

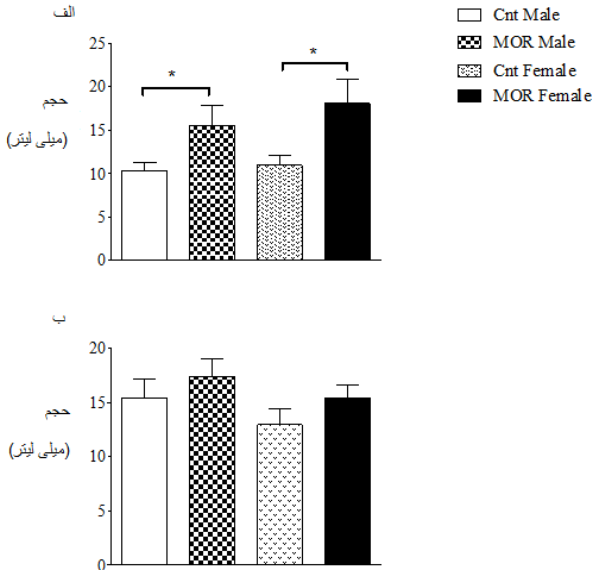
تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

از نرم‌افزار آماری GraphPad Prism برای تحلیل آماری استفاده شد. داده‌های میزان مصرف آب و مرفین، داده‌های سرعت شنا در ماز آبی و داده‌های روز پنجم ماز آبی بین گروه‌های آزمایشی با آزمون آنووای یکطرفه، سپس آزمون تکمیلی Bonferroni مقایسه و تحلیل آماری شد. داده‌های چهار روز یادگیری ماز آبی و یادگیری در شاتل باکس با آزمون Repeated Measured، سپس آزمون تکمیلی Bonferroni مقایسه و تحلیل آماری شد. داده‌ها به‌صورت میانگین±خطای استاندارد از میانگین ارائه شده است و P<۰/۰۵ شاخص معناداری قرارگرفت.

یافته‌ها

۱. مواجههٔ مزمن رت‌های ماده پیش از بارداری با مرفین، سبب افزایش تمایل به مصرف مرفین در فرزندان نر و مادهٔ نسل اول شد.

داده‌ها به‌صورت میانگین مصرف روزانهٔ هر گروه طی سی روز ارائه شده است (شکل ۱). نتایج نشان داد علی‌رغم اینکه میانگین مصرف روزانهٔ آب معمولی در حیوانات چهار گروه آزمایشی با هم تفاوت معناداری ندارد (شکل ۱ب)، میانگین مصرف روزانهٔ آب حاوی مرفین در هر دو گروه فرزندان نر و مادهٔ مادران مرفینی به‌صورت معناداری بالاتر از گروه‌های نر و مادهٔ کنترل آن‌هاست (شکل ۱الف). میانگین مصرف روزانهٔ آب حاوی مرفین در فرزندان نر مادران مرفینی (cc/rat) ۱۵/۵±۲/۳ بود، در حالی که در فرزندان نر مادران کنترل (cc/rat) ۱۰/۹±۰/۹ بود. آزمون آنووای یک‌طرفه، سپس آزمون تکمیلی Bonferroni اختلاف معناداری بین این دو گروه نشان داد (P<۰/۰۵). همچنین، میانگین مصرف روزانهٔ آب حاوی مرفین در فرزندان مادهٔ مادران مرفینی (cc/rat) ۱۸/۰±۲/۷ بود، در حالی که در فرزندان مادهٔ مادران کنترل (cc/rat) ۱۰/۹±۱/۱ بود. آزمون آنووای یک‌طرفه، سپس آزمون تکمیلی Bonferroni تفاوت معناداری بین دو گروه نشان داد (P<۰/۰۵).



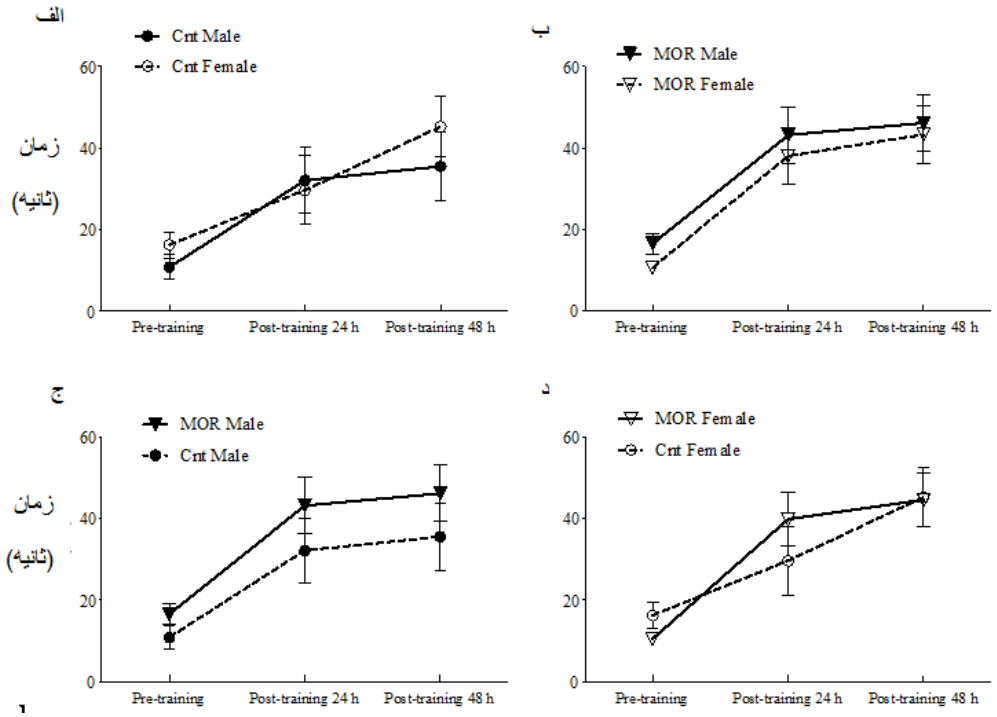
شکل ۱. مواجههٔ مزمن رت‌های ماده پیش از بارداری با مرفین تمایل به مصرف مرفین در فرزندان نسل اول را افزایش داد. میانگین مصرف روزانهٔ مرفین (الف) و آب (ب) در فرزندان نر و مادهٔ نسل نخست نشان داده شده است. مقایسهٔ آماری با آزمون آماری آنووای یک‌طرفه و آزمون تکمیلی Bonferroni نشان داد علی‌رغم اینکه میانگین مصرف روزانهٔ آب (ب) در بین گروه‌ها تفاوت معناداری نداشت، میانگین میزان مصرف روزانهٔ مرفین (الف) در فرزندان مادران مرفینی به‌صورت معناداری بالاتر از فرزندان گروه کنترل بود (P<۰/۰۵). داده‌ها به‌صورت میانگین±خطای استاندارد ارائه شده است.

۲. مواجههٔ مزمن رت‌های ماده پیش از بارداری با مرفین، تأثیری در حافظهٔ اجتنابی فرزندان نر و مادهٔ نسل اول نداشت.

میانگین تأخیر زمانی پیداکردن سکو در گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون آماری آنووای دوطرفه Repeated Measured و آزمون تکمیلی Bonferroni تحلیل آماری شد. نتایج نشان داد که آموزش اجتناب از محوطهٔ تاریک (با اعمال تحریک ناخوشایند) طی روز نخست، سبب افزایش زمان تأخیر

برای ورود به این محوطه طی بیست‌وچهار و چهل‌وهشت ساعت بعد در همهٔ گروه‌های آزمایش شد (۲، AD). با وجود این، مقایسهٔ دوبه‌دو گروه‌های هدف تفاوت معناداری بین گروه‌های آزمایشی در میزان این یادگیری اجتنابی نشان نداد (P>۰/۰۵). داده‌ها به‌صورت میانگین±خطای استاندارد از میانگین ارائه‌شده است. تعداد حیوانات در گروه فرزندان نر مادران مرفینی نه سر، ماده‌های مادران مرفینی دوازده سر و در گروه نر و مادهٔ کنترل هفت سر است.

۳. مواجههٔ مزمن رت‌های ماده پیش از بارداری با مرفین، یادگیری فضایی فرزندان نر را کاهش داد.



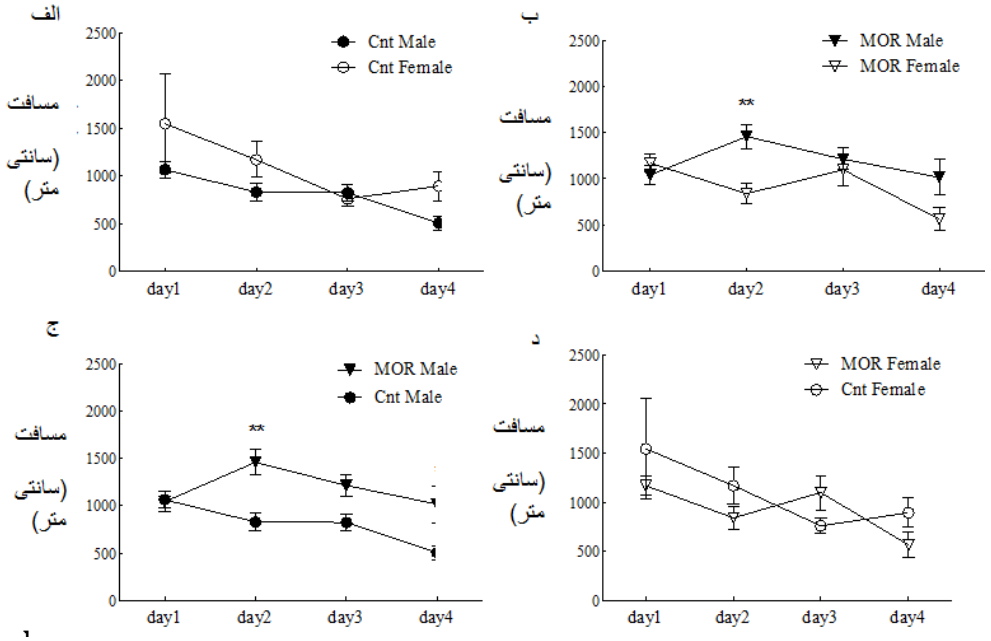
شکل ۲. مواجههٔ مزمن رت‌های ماده پیش از بارداری با مرفین تأثیری در حافظهٔ جتنابی فرزندان نسل اول نداشت. میانگین تأخیر زمانی عبور از محوطهٔ روشن شاتل باکس به محوطهٔ تاریک طی روزهای آزمایش نشان داده شده است. آموزش اجتناب از محوطهٔ دارای تحریک ناخوشایند طی روز نخست، سبب افزایش زمان تأخیر برای ورد به این محوطه طی ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد در همهٔ گروه‌های آزمایش شد (الف- د). با وجود این، تفاوت معناداری بین گروه‌های آزمایشی در میزان این یادگیری اجتنابی وجود نداشت (P>۰/۰۵). داده‌ها به‌صورت میانگین±خطای استاندارد ارائه شده است. تعداد حیوانات در گروه فرزندان نر مادران مرفینی نه سر، در ماده‌های مادران مرفینی یازده سر و در گروه نر و مادهٔ کنترل هفت سر است.

میانگین مسافت (Distance) و زمان (Latency) روزانه در گروه‌های آزمایشی محاسبه و با استفاده از آزمون آماری آنووای دوطرفهٔ Repeated Measured و آزمون تکمیلی Bonferroni تحلیل شد. نتایج نشان داد که هم مسافت طی‌شده تا سکو (شکل ۳) و هم‌زمان رسیدن به سکو (شکل ۴) در همهٔ گروه‌های آزمایشی طی روند چهار روزهٔ آموزش و یادگیری سیر کاهشی دارد. به‌عبارتی، با تکرار آزمون طی روزهای آزمایش حیوانات همهٔ گروه‌های آزمایشی محل سکو را یادمی‌گیرند و زمان و مسافت کمتری برای یافتن آن صرف می‌کنند. با این حال، مقایسهٔ این روند یادگیری به‌صورت دوبه‌دو بین گروه‌های آزمایشی نشان داد بین برخی گروه‌ها با هم تفاوت‌های معناداری وجود دارد.

مقایسه و تحلیل آماری با آزمون آماری آنووای دوطرفهٔ Repeated Measured نشان داد که فرزندان نر مادران مرفینی نسبت به فرزندان مادهٔ مادران مرفینی مسافت (شکل ۳ب) و زمان (شکل ۴ب) بیشتری را برای رسیدن به سکو طی می‌کنند (P=۰/۰۲ برای آزمون اولیهٔ Repeated Measured بین دو گروه). در ادامهٔ آزمون تکمیلی Bonferroni مشخص کرد که در روز دوم آزمایش تفاوت معناداری بین دو گروه هم در شاخص مسافت و هم در شاخص زمان رسیدن به سکو وجود دارد (P<۰/۰۱ برای روز دوم). همچنین، به‌صورت جالبی نتایج نشان داد که فرزندان نر مادران مرفینی نسبت به فرزندان نر گروه

کنترل مسافت (شکل ۳ج) و زمان (شکل ۴ج) بیشتری را برای رسیدن به سکو صرف می‌کنند (P=۰/۰۵ برای آزمون اولیهٔ Repeated Measured بین دو گروه)، به‌طوری که آزمون تکمیلی Bonferroni در روز دوم و چهارم تفاوت معناداری بین دو گروه نشان داد (P<۰/۰۱ برای روز دوم در شاخص مسافت و زمان و P<۰/۰۵ برای روز چهارم در شاخص مسافت).

تحلیل آماری نتایج در داده‌های مسافت (شکل ۳الف) و زمان (۴A) بین فرزندان نر کنترل با فرزندان مادهٔ کنترل تفاوت معناداری نشان نداد (P>۰/۰۵). همچنین، بین فرزندان مادهٔ مادران مرفینی با فرزندان مادهٔ مادران کنترل نیز تفاوت معناداری در داده‌های مسافت (شکل ۳د) و زمان (شکل ۴د) وجود نداشت (P>۰/۰۵).



شکل ۳. مواجههٔ مزمن رت‌های ماده پیش از بارداری با مرفین یادگیری فضایی فرزندان نر را کاهش داد. میانگین مسافت شنا تا رسیدن به سکو در ماز آبی موریس طی چهار روز آزمایش نشان داده شده است. در همهٔ گروه‌های آزمایش میانگین مسافت طی‌شده تا سکو طی روزهای آزمایش به‌تدریج کاهش یافته است که بیانگر ایجاد حافظهٔ فضایی طی روزهای یادگیری است (الف- د). مقایسهٔ حافظهٔ فضایی بین گروه‌ها طی روزهای یادگیری با آزمون آماری آنووای دوطرفه Repeated Measured و آزمون تکمیلی Bonferroni نشان داد که فرزندان نر مادران مرفینی نسبت به فرزندان مادهٔ مادران مرفینی مسافت بیشتری را برای رسیدن به سکو طی می‌کنند (ب) به‌طوری که در روز دوم و چهارم این تفاوت معنادار بود (P<۰/۰۱ برای روز دوم و P<۰/۰۵ برای روز چهارم). همچنین، فرزندان نر مادران مرفینی نسبت به فرزندان نر گروه کنترل نیز مسافت بیشتری را برای رسیدن به سکو طی می‌کنند (ج) به‌طوری که در روز دوم و چهارم این تفاوت معنادار بود (P<۰/۰۱ برای روز دوم و P<۰/۰۵ برای روز چهارم). داده‌ها به‌صورت میانگین±خطای استاندارد ارائه شده است. تعداد حیوانات در گروه فرزندان نر و مادهٔ مرفینی هر کدام نه سر، در گروه نر و ماده هر کدام هفت سر است.

داده‌ها به‌صورت میانگین±خطای استاندارد از میانگین ارائه شده است. تعداد حیوانات در گروه فرزندان نر و مادهٔ مرفینی هر کدام شش سر، در گروه نرهای کنترل نه سر و در گروه ماده‌های کنترل یازده سر است.

برای اطمینان از عدم تأثیرگذاری سرعت شنا بر داده‌های مسافت و زمان رسیدن به سکو، میانگین سرعت شنا در کل آزمون‌های هر گروه محاسبه، سپس بین گروه‌های آزمایش با استفاده از آزمون آماری آنووای یک‌طرفه و آزمون تکمیلی Bonferroni مقایسه انجام شد (شکل ۵). نتیجه نشان داد که میانگین سرعت شنا بین هیچ‌یک از گروه‌های آزمایش تفاوت معناداری با هم ندارد (P>۰/۰۵).

۴. به‌خاطرآوری حافظهٔ فضایی در فرزندان نر مادران مرفینی کاهش یافت.

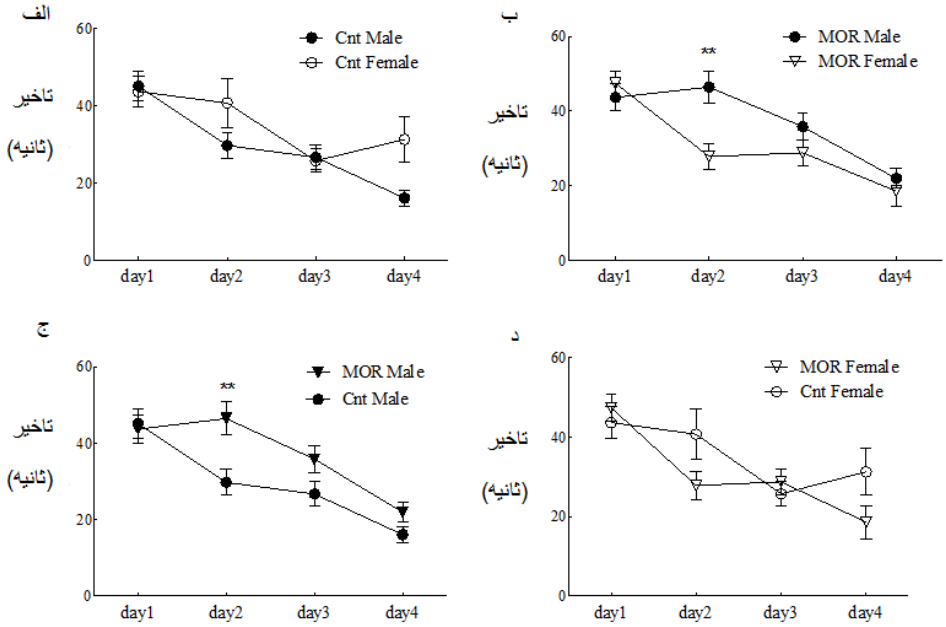
تعداد دفعات عبور از محل سکو به‌عنوان شاخص به‌خاطرآوری حافظهٔ فضایی در نظر گرفته شد. میانگین تعداد دفعات عبور از محل سکو در روز پنجم با آزمون آماری آنووای یک‌طرفه و آزمون تکمیلی Bonferroni بین گروه‌های آزمایشی مقایسه شد. نتایج نشان داد که فرزندان نر مادران مرفینی در مقایسه با فرزندان نر مادران کنترل تعداد دفعات کمتری از محل سکو عبور کرده‌اند (تعداد دفعات عبور فرزندان نر کنترل ۵/۶±۰/۷ و تعداد دفعات عبور فرزندان نر مرفینی ۲/۲±۰/۴)، به‌طوری که تفاوت معناداری بین این دو گروه وجود داشت

(شکل ۶؛ P<۰/۰۰۱ ***). با این حال، بین فرزندان مادهٔ کنترل و فرزندان مادهٔ مادران مرفینی تفاوت معناداری وجود نداشت (P>۰/۰۵)، تعداد دفعات عبور فرزندان مادهٔ کنترل: ۳/۰±۰/۵ و تعداد دفعات عبور فرزندان مادهٔ مرفینی: ۲/۹±۰/۵). به‌علاوه، فرزندان مادهٔ مادران کنترل نیز نسبت به فرزندان نر مادران کنترل به‌صورت معناداری کمتر از محل سکو عبور کردند. تعداد دفعات عبور فرزندان نر کنترل ۵/۶±۰/۷ و تعداد دفعات عبور فرزندان مادهٔ کنترل ۳/۰±۰/۵ بود (P<۰/۰۵ #، شکل ۶). داده‌ها به‌صورت میانگین±خطای استاندارد از میانگین ارائه شده است. تعداد حیوانات در گروه فرزندان نر و مادهٔ مرفینی هر کدام شش سر، در گروه نرهای کنترل نه سر و در گروه ماده‌های کنترل یازده سر است.

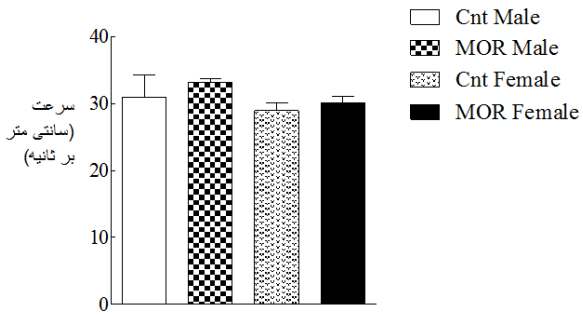
بحث

یافته‌های این پژوهش نشان داد تمایل به مصرف مرفین در فرزندان نر و مادهٔ متولدشده از مادرانی که پیش از بارداری به‌صورت مزمن مرفین دریافت کرده بودند (مادران مرفینی)، نسبت به فرزندان متولدشده از مادران کنترل به‌صورت معناداری بالاتر است. همچنین، فرایندهای یادگیری و به‌خاطرآوری حافظهٔ فضایی در ماز آبی موریس در فرزندان نر این مادران مرفینی کاهش می‌یابد، در حالی که در فرزندان مادهٔ مادران مرفینی تغییر معناداری دیده نشد. به‌علاوه، یادگیری اجتنابی فرزندان مادران مرفینی با فرزندان مادران کنترل تفاوت معناداری نشان نداد.

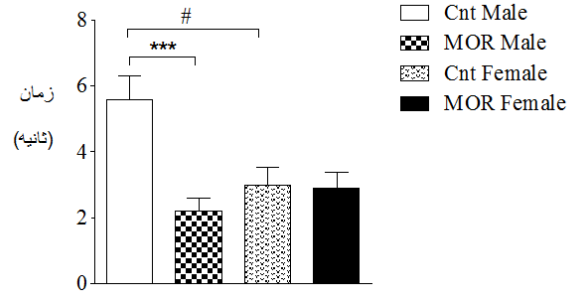
در قسمت بررسی میزان تمایل به مصرف مرفین، نتایج تحقیق حاضر نشان داد علی‌رغم اینکه فرزندان مادران مرفینی در هیچ دوره‌ای از زندگی خود با مرفین تماس نداشتند، در مواجهه با مرفین خوراکی میزان مرفین بیشتری در مقایسه با فرزندان مادران کنترل، مصرف می‌کنند. با توجه به اختیاری‌بودن مصرف مرفین در روش آزمایش ما، این افزایش میزان مصرف مرفین خوراکی بیانگر افزایش تمایل این فرزندان برای دریافت مرفین است. این افزایش میل به مصرف هم در فرزندان نر و هم در فرزندان ماده دیده شد.



شکل ۴. مواجههٔ مزمن رت‌های ماده پیش از بارداری با مرفین یادگیری فضایی فرزندان نر را کاهش داد. میانگین مدت زمان رسیدن به سکو در ماز آبی موریس در چهار روز آزمایش نشان داده شده است. در همهٔ گروه‌های آزمایش میانگین مدت زمان رسیدن به سکو در روزهای آزمایش به‌تدریج کاهش یافته است که بیانگر یادگیری و ایجاد حافظهٔ فضایی طی چهار روز آزمایش است (الف-د). مقایسهٔ حافظهٔ فضایی بین گروه‌ها طی روزهای یادگیری با آزمون آماری آنووای دوطرفهٔ Repeated Measured و آزمون تکمیلی Bonferroni نشان داد که فرزندان نر مادران مرفینی نسبت به فرزندان مادهٔ مادران مرفینی مدت زمان بیشتری را برای رسیدن به سکو صرف می‌کنند (ب)، به‌طوری که در روز دوم این تفاوت معنادار بود (P<۰/۰۱ برای روز دوم). همچنین، فرزندان نر مادران مرفینی نسبت به فرزندان نر گروه کنترل نیز مسافت بیشتری را برای رسیدن به سکو طی می‌کنند (ج) به‌طوری که در روز دوم این تفاوت معنادار بود (P<۰/۰۱ برای روز دوم). داده‌ها به‌صورت میانگین±خطای استاندارد ارائه شده است. تعداد حیوانات در گروه فرزندان نر و مادهٔ مرفینی هر کدام نه سر، در گروه نر و در گروه ماده هر کدام هفت سر است.



شکل ۵. میانگین سرعت شنای گروه‌های آزمایشی با هم تفاوت نداشت. مقایسهٔ میانگین سرعت شنا طی دورهٔ یادگیری با آزمون آماری آنووای یک‌طرفه و آزمون تکمیلی Bonferroni تغییر معناداری بین گروه‌های آزمایش نشان نداد (P>۰/۰۵). داده‌ها به‌صورت میانگین±خطای استاندارد ارائه شده است. تعداد حیوانات در گروه فرزندان نر و مادهٔ مرفینی هر کدام نه سر، و در گروه نر و ماده هر کدام هفت سر است.



شکل ۶. به‌خاطرآوری حافظهٔ فضایی در فرزندان نر مادران مرفینی کاهش یافت. میانگین تعداد دفعات عبور از محل سکو در روز پنجم (ماز بدون سکو) نشان داده شده است. مقایسهٔ داده‌ها با آزمون آماری آنووای یک‌طرفه و آزمون تکمیلی Bonferroni نشان داد که فرزندان نر مادران مرفینی در مقایسه با فرزندان نر مادران کنترل به‌طور معناداری کمتر از محل سکو عبور کرده‌اند (P<۰/۰۰۱ *). همچنین، فرزندان مادهٔ مادران کنترل نیز نسبت به فرزندان نر مادران کنترل به‌صورت معناداری کمتر از محل سکو عبور کرده‌اند (P<۰/۰۵ #). داده‌ها به‌صورت میانگین±خطای استاندارد ارائه شده است. تعداد حیوانات در گروه فرزندان نر و مادهٔ مرفینی هر کدام نه سر، و در گروه نر و ماده هر کدام هفت سر است.**

در خصوص اپیوئیدها این نخستین گزارش است که نشان می‌دهد فرزندان مادرانی که پیش از بارداری مرفین مصرف کرده‌اند تمایل بیشتری به مصرف مرفین دارند؛ بنابراین، احتمال دارد استعداد بالاتری برای اعتیاد و وابستگی دارویی داشته باشند. مطالعه در زمینهٔ سوءمصرف ترکیبات کانابینوئیدی نشان داده است موش‌هایی که پیش از بارداری یک دوره در معرض ترکیبات کانابینوئیدی بوده‌اند، فرزندانشان تمایل بیشتری به مصرف هروئین (مشتقات اپیوئیدی) دارند [۲۲]. در همین راستا، مطالعهٔ بایرنس و همکارانش (۲۰۱۱) نشان داده است که بیان mRNA گیرنده‌های اپیوئیدی در سیستم عصبی فرزندان مادرانی که پیش از بارداری مرفین مصرف کرده‌اند، افزایش می‌یابد [۲۳]. همچنین، افزایش بیان اپیوئیدهای درون‌زاد نظیر بتا-اندورفین در سیستم عصبی فرزندان مادرانی گزارش شده است که پیش از بارداری مرفین مصرف کرده‌اند [۲۴]. تغییرات سیستم دوپامینی مغز که در مدارهای پاداش و تنبه نقش دارند نیز در فرزندان مادران مرفینی نشان داده شده است [۲۵]. با توجه به نقش و اهمیت گیرنده‌های اپیوئیدی مغز، همچنین گیرنده‌های دوپامینی در پدیدهٔ وابستگی دارویی که منجر به افزایش میل به مصرف می‌شود [۲۶]، نتایج مطالعات بالا در توجیه افزایش تمایل به مصرف مرفین مشاهده‌شده در فرزندان مادران مرفینی کمک‌کننده است، اما این تغییرات چگونه و با چه سازوکارهایی از مادر به فرزند منتقل می‌شود که باید در مطالعات بعدی بررسی کرد.

در بررسی توان یادگیری و حافظه، نتایج مطالعهٔ حاضر برای نخستین بار یافته‌های جالبی ارائه کرد و نشان داد که فرزندان نر مادران مرفینی هم در روند یادگیری و هم در به‌خاطرآوری حافظهٔ فضایی نسبت به کنترل آن‌ها دچار اختلال شده است، با این حال در فرزندان ماده چنین اختلالی دیده نشد. به‌علاوه، در آزمون یادگیری اجتنابی تغییر معناداری مشاهده نشد. هرچند پیش از این مطالعه‌ای انجام نشده است که رفتار یادگیری را در فرزندان مادران مرفینی بررسی کند، در راستای کمک و توجیه یافته‌های ما، بررسی سرکاکی و همکارانش (۲۰۰۸) نشان داده بود که شکل‌پذیری سیناپسی در ناحیهٔ هیپوکمپ فرزندان نر و مادهٔ مادران مرفینی تغییر می‌کند، به‌طوری که توان القای تقویت طولانی‌مدت در مدارهای هیپوکمپ کاهش پیدا می‌کند [۲۷]. همچنین، در گزارش اخیر یوهان و همکارانش (۲۰۱۵) بیان شده بود که کاهش پروتئین سیناپتوفیزین و کاهش تراکم اتصالات سیناپسی در ناحیهٔ هیپوکمپ فرزندان متولدشده از مادران مرفینی مشهود است [۲۸، ۲۹]. با توجه به نقش فرایندهای شکل‌پذیری سیناپسی نظیر LTP در روند تشکیل حافظه، همچنین با توجه به نقش سیناپتوفیزین در ارتباطات سیناپسی بین مدارهای عصبی، به‌نظر می‌رسد دلیل کاهش توان یادگیری فرزندان نر مادران مرفینی که در بررسی حاضر مشاهده شد قابل‌توجیه باشد، اما اینکه چرا در ماده‌ها اختلال یادگیری رخ نداد، نیاز به بررسی دقیق‌تر و بیشتر دارد. عدم‌تأثیرپذیری

حافظهٔ اجتنابی ممکن است ناشی از تفاوت ساختارها و سازوکارهای دخیل در این نوع حافظه باشد. آمیگدال و ساختارهای مرتبط نقش کلیدی در اعمال شناختی مغز، به‌خصوص در یادگیری و حافظهٔ اجتنابی نقش کلیدی دارد [۸، ۳۰]، در حالی که هیپوکمپ نقش مهمی‌تری در حافظهٔ فضایی دارد. ممکن است این دو ساختار و عملکردهای آن به‌صورت متفاوتی تحت تأثیر مصرف مرفین مادر قرارگرفته باشد. بنابراین، به‌نظر می‌رسد تغییراتی در سیستم عصبی فرزندان نر رخ داده که پیامد مواجههٔ مادر پیش از بارداری با مرفین است و احتمال دارد با سازوکارهایی از مادر به فرزندان منتقل شده باشد. در جمع‌بندی‌های اخیر که در گزارش‌های مروری گروه واسولر و گروه نستلر ارائه شده پیشنهاد شده است که احتمالاً سازوکارهای اپی‌ژنتیکی در انتقال بین نسلی آثار مرفین نقش داشته باشد و شواهدی نیز در این زمینه ارائه شده است [۱۸، ۲۸، ۳۱]. به‌علاوه، حافظهٔ فضایی فرزندان نر و ماده به‌صورت متفاوتی تحت تأثیر این پدیده قرارمی‌گیرد. یافته‌هایی که پیش از این در خصوص مواجههٔ فرزندان طی دورهٔ جنینی یا شیرخواری از طریق خون یا شیر مادر با اپیوئیدها ارائه شده است نیز نشان داد که بین فرزندان نر و ماده از این بابت تفاوت وجود دارد [۳۲]. گزارش‌های مختلف از تفاوت یادگیری فضایی بین جنس نر و ماده حکایت می‌کند [۳۳، ۳۴]. بر اساس برخی از این مطالعات، یادگیری فضایی در جنس نر بالاتر از جنس ماده است [۳۵]، در حالی که کلی و همکارانش (۲۰۱۵) توان یادگیری بالاتری را در جنس ماده نشان دادند [۳۶]، هر چند مطالعاتی نظیر شاه و همکارانش (۲۰۱۳) نیز وجود چنین تفاوتی را در یادگیری بین دو جنس انکار می‌کند [۳۷]. در مطالعهٔ حاضر مقایسهٔ نتایج فرزندان نر و مادهٔ مادران کنترل تفاوت معناداری را در آزمون یادگیری فضایی نشان نداد. هر چند هورمون‌های جنسی ممکن است دلیل نتایجی باشد که بین جنس نر و ماده در توان یادگیری و حافظه تفاوت نشان داده است، با توجه به نوع آزمون‌هایی که نتایج از آن‌ها استخراج شده است، همچنین دورهٔ زندگی یا به‌عبارتی سن نمونه‌های مورد بررسی از عوامل مهم تأثیرگذار بر نتایج است.

یافتهٔ جانبی در کنار اهداف اصلی این مطالعه، کاهش قابل‌توجه تعداد فرزندان متولدشده از مادرانی بود که یک دورهٔ طولانی‌مدت مصرف مرفین پیش از بارداری داشتند. میانگین تعداد فرزندان متولدشده در مادران مرفینی ۰/۵±۶/۰ بود، در حالی که این آمار در مادران کنترل ۰/۵±۱۱/۵ بود. مطالعات گروه اسلامبروا (۲۰۰۵) و واتی و کاتای (۱۹۹۲) نشان داد که مرفین مزمن بر سطح هورمون‌های جنسی و توانایی تولیدمثل در حیوانات آزمایشگاهی تأثیر می‌گذارد [۳۸، ۳۹]، با توجه به اینکه در مطالعهٔ حاضر مرفین یک ماه قبل از بارداری قطع شد، به ماندگاری این آثار پیامدهای مرفین بر قابلیت بارداری مادران در مطالعات دقیق‌تر توجه شده است. همچنین، در تحقیق سیسرو و همکارانش (۱۹۹۱) نشان داده شده بود که مواجههٔ والدین با مرفین سبب تغییرات سیستم هورمونی و عملکردهای جنسی فرزندان نر شد، به‌طوری که سطح کورتیکوسترون و اندورفین‌های این فرزندان بالاتر بود [۲۴]. این نتایج نیز به‌صورت تأییدکننده نشان می‌دهد که در سطح سیستم اندوکرین نیز پیامدهای مرفین پیش از بارداری به فرزندان منتقل می‌شود.

نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعهٔ حاضر برای نخستین‌بار نشان داد که یک دورهٔ مزمن مواجههٔ مادران با مرفین پیش از جفت‌گیری و بارداری سبب کاهش یادگیری و حافظهٔ فضایی فرزندان نر شد. به‌علاوه، سبب افزایش تمایل به مصرف مرفین در فرزندان نر و ماده شد. بنابراین، به‌نظر می‌رسد مصرف مرفین در مادران حداقل بر برخی عملکردهای سیستم عصبی فرزندان در نسل بعد اثرگذار است، علی‌رغم اینکه فرزندان در هیچ مرحله‌ای تماس مستقیمی با مرفین ندارند.

از محدودیت‌های مطالعهٔ حاضر این بود که تنها والد مادر پیش از جفت‌گیری و بارداری در معرض مرفین قرارگرفته بود و فرزندان مورد مطالعه از آمیزش این مادران با نرهای معمولی به‌دست آمدند. پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی نتیجهٔ مواجههٔ والد نر با مرفین، همچنین نتیجهٔ مواجههٔ هر دو والد با مرفین پیش از جفت‌گیری بر عملکردهای عصبی فرزندان بررسی شود. همچنین، آزمون‌های رفتاری متنوع‌تر نتایج دقیق‌تری ارائه کرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش مستخرج از پایان‌نامهٔ کارشناسی‌ارشد مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اراک (کد: ۲۲۸۱) و کمیتهٔ اخلاق دانشگاه (کد: IR.ARAKMU.REC.1394.130) است.

References

[1] Niu L, Cao B, Zhu H, Mei B, Wang M, Yang Y, et al. Impaired in vivo synaptic plasticity in dentate gyrus and spatial memory in juvenile rats induced by prenatal morphine exposure. Hippocampus, 2009; 19(7): 649-57.

[2] Sadegh M, Fathollahi Y, Javan M, Semnanian S. Tolerance to

anti-nociceptive effects of sodium-salicylate and morphine decreases adenosine deaminase activity in the rat hippocampus. Koomesh, 2012; 13(3): 390-6.
[3] Torregrossa MM, Corlett PR, Taylor JR. Aberrant learning and memory in addiction. Neurobiol Learn Mem, 2011; 96(4): 609-23.
[4] Sadegh M, Fathollahi Y, Naghdi N, Semnanian S. Morphine deteriorates spatial memory in sodium salicylate treated rats. Eur. J. Pharmacol, 2013; 704:1-6.
[5] Simantov R. Chronic morphine alters dopamine transporter density in the rat brain: possible role in the mechanism of drug addiction. Neurosci Lett, 1993; 163(2): 121-4.
[6] Narita M, Suzuki M, Imai S, Ozaki S, Kishimoto Y, Oe K, et al. Molecular mechanism of changes in the morphine-induced pharmacological actions under chronic pain-like state: suppression of dopaminergic transmission in the brain. Life Sci, 2004; 74(21): 2655-73.
[7] Farley SJ, Radley JJ, Freeman JH. Amygdala modulation of cerebellar learning. J Neurosci, 2016; 36(7): 2190-201.
[8] McGaugh JL. Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. Trends Neurosci, 2002; 25(9): 456.
[9] de Hoz L, Martin SJ. Double dissociation between the contributions of the septal and temporal hippocampus to spatial learning: the role of prior experience. Hippocampus, 2014; 24(8): 990-1005.
[10] Jayaweera HK, Hickie IB, Duffy SL, Mowszowski L, Norrie L, Lagopoulos J, et al. Episodic memory in depression: the unique contribution of the anterior caudate and hippocampus. Psychol Med, 2016: 1-11.
[11] Jamot L, Matthes HW, Simonin F, Kieffer BL, Roder JC. Differential involvement of the mu and kappa opioid receptors in spatial learning. Genes Brain Behav, 2003; 2(2): 80-92.
[12] Klenowski P, Morgan M, Bartlett SE. The role of delta-opioid receptors in learning and memory underlying the development of addiction. Br J Pharmacol, 2015; 172(2): 297-310.
[13] Woods JR, Jr. Adverse consequences of prenatal illicit drug exposure. Curr Opin Obstet Gynecol, 1996; 8(6): 403-11.
[14] Sithisarn T, Granger DT, Bada HS. Consequences of prenatal substance use. Int J Adolesc Med Health, 2012; 24(2): 105-12.
[15] Glantz MD, Chambers JC. Prenatal drug exposure effects on subsequent vulnerability to drug abuse. Dev Psychopathol, 2006; 18(3): 893-922.
[16] Tan JW, Duan TT, Zhou QX, Ding ZY, Jing L, Cao J, et al. Impaired contextual fear extinction and hippocampal synaptic plasticity in adult rats induced by prenatal morphine exposure. Addict Biol, 2015; 20(4): 652-62.
[17] Robison AJ, Nestler EJ. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. Nat Rev Neurosci, 2011; 12(11): 623-37.
[18] Nestler EJ. Epigenetic mechanisms of drug addiction. Neuropharmacology, 2014; 76 Pt B:259-68.
[19] Badawy AA, Evans CM, Evans M. Production of tolerance and physical dependence in the rat by simple administration of morphine in drinking water. Br J Pharmacol, 1982; 75(3): 485-91.
[20] Sadegh M, Fathollahi Y, Naghdi N, Semnanian S. Morphine deteriorates spatial memory in sodium salicylate treated rats. Eur J Pharmacol, 2013; 704(1-3): 1-6.
[21] Cox BM, Ginsburg M, Willis J. The offset of morphine tolerance in rats and mice. Br J Pharmacol, 1975; 53(3): 383-91.
[22] Byrnes JJ, Johnson NL, Schenk ME, Byrnes EM. Cannabinoid exposure in adolescent female rats induces transgenerational effects on morphine conditioned place preference in male offspring. J Psychopharmacol, 2012; 26(10): 1348-54.
[23] Byrnes JJ, Babb JA, Scanlan VF, Byrnes EM. Adolescent opioid exposure in female rats: transgenerational effects on morphine analgesia and anxiety-like behavior in adult offspring. Behav Brain Res., 2011; 218(1): 200-5.
[24] Cicero TJ, Adams ML, Giordano A, Miller BT, O'Connor L, Nock B. Influence of morphine exposure during adolescence on the sexual maturation of male rats and the development of their offspring. J Pharmacol Exp Ther, 1991; 256(3): 1086-93.
[25] Byrnes JJ, Johnson NL, Carini LM, Byrnes EM. Multigenerational effects of adolescent morphine exposure on dopamine D2 receptor function. Psychopharmacology (Berl), 2013; 227(2): 263-72.
[26] Hyman SE. Addiction: a disease of learning and memory. Am J Psychiatry, 2005; 162(8): 1414-22.
[27] Sarkaki A, Assaei R, Motamedi F, Badavi M, Pajouhi N. Effect of parental morphine addiction on hippocampal long-term potentiation in rats offspring. Behav Brain Res, 2008; 186(1): 72-7.
[28] Yohn NL, Bartolomei MS, Blendy JA. Multigenerational and transgenerational inheritance of drug exposure: The effects of alcohol, opiates, cocaine, marijuana, and nicotine. Prog Biophys Mol Biol, 2015; 118(1-2): 21-33.
[29] Szutorisz H, DiNieri JA, Sweet E, Egervari G, Michaelides M, Carter JM, et al. Parental THC exposure leads to compulsive heroin-seeking and altered striatal synaptic plasticity in the subsequent generation. Neuropsychopharmacology, 2014; 39(6): 1315-23.
[30] Grosso A, Cambiaghi M, Concina G, Sacco T, Sacchetti B. Auditory cortex involvement in emotional learning and memory. Neuroscience, 2015; 299: 45-55.
[31] Vassoler FM, Byrnes EM, Pierce RC. The impact of exposure to addictive drugs on future generations: Physiological and behavioral effects. Neuropharmacology, 2014; 76 Pt B.۷۵-۲۶۹:
[32] Slamberova R, Schindler CJ, Pometlova M, Urkuti C, Purow-Sokol JA, Vathy I. Prenatal morphine exposure differentially alters learning and memory in male and female rats. Physiol Behav, 2001; 73(1-2): 93-103.
[33] Faraji J, Metz GA, Sutherland RJ .Characterization of spatial performance in male and female Long-Evans rats by means of the Morris water task and the ziggurat task. Brain Res Bull, 2010; 81(1): 164-72.
[34] Haeri NA, Palizvan MR, Sadegh M, Aghaei Z, Rafiei M. Prediction of seizure incidence probability in PTZ model of kindling through spatial learning ability in male and female rats. Physiol Behav, 2016; 161: 47-52.

[35] Keeley RJ, Tyndall AV, Scott GA, Saucier DM. Sex difference in cue strategy in a modified version of the Morris water task :correlations between brain and behaviour. PLoS One, 2013; 8(7): e69727.
[36] Keeley RJ, Bye C, Trow J, McDonald RJ. Strain and sex differences in brain and behaviour of adult rats: Learning and memory, anxiety and volumetric estimates. Behav Brain Res, 201٥; 3(1): 118-288.
[37] Shah DS, Prados J, Gamble J, De Lillo C, Gibson CL. Sex differences in spatial memory using serial and search tasks. Behav Brain Res, 2013; 257: 90-9.
[38] Slamberova R, Rimanoczy A, Cao D, Schindler CJ, Vathy I. Alterations of prenatal morphine exposure in mu-opioid receptor density in hypothalamic nuclei associated with sexual behavior. Brain Res Bull, 2005; 65(6): 479-85.
[39] Vathy I, Katay L. Effects of prenatal morphine on adult sexual behavior and brain catecholamines in rats. Brain Res Dev Brain Res, 1992; 68(1): 125-31.