

اثر اعتیاد به مورفین والدین بر غلظت گلوتامات پایه و تحریکی ناحیه شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ فرزندان موش صحرایی

راحله عصایی ♦ علیرضا سرکاکلی ♦ محمد بدوی ♦ ناصر پژوهی ♦♦♦

یافته / سال پنجم / شماره ۱۸

چکیده

مقدمه: شواهد نشان می‌دهد که اعتیاد یکی از والدین به مورفین منجر به اختلال در فرآیند یادگیری و حافظه فرزندان می‌شود. با توجه به نقش گلوتامات در ناحیه شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ بر یادگیری، در این مطالعه اثر اعتیاد یکی از والدین بر غلظت گلوتامات پایه و تحریکی ناحیه شکنج دندانه‌ای فرزندان موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی ۲۰ سرموش صحرایی ماده و ۸ سرموش صحرایی نر از نژاد ویستار با مصرف خوراکی مورفین با دوز ۳۲ میلی گرم / کیلوگرم، ۲ بار در روز معتاد شدند. به منظور انجام جفت گیری ۲۰ سر موش ماده معتاد با ۸ سر موش نر غیر معتاد و ۲۸ موش نر معتاد با ۲۰ سر موش ماده غیر معتاد در قفس‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند. پس از رسیدن فرزندان به سن بلوغ مایع خارج سلولی ناحیه شکنج دندانه‌ای آنها در حالت پایه و تحریک الکتریکی (بافرکانس ۱۰ هرتز و جریان ۷۰۰ میکرو آمپر) مسیر نفوذی، به روش میکرو دیالیز استخراج و با استفاده از دستگاه HPLC وردیاب فلورسنت اندازه‌گیری شد. نتایج به صورت میانگین \pm خطای معیار بیان گردید و نتایج به روش آنالیز واریانس دو طرفه مقایسه شدند.

یافته ها: در فرزندان نر گروه مادر معتاد، غلظت گلوتامات پایه و تحریکی ناحیه شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ به ترتیب $0/67 \pm 0/04$ و $1/11 \pm 0/1$ و در فرزندان ماده به ترتیب $0/47 \pm 0/06$ ؛ $0/88 \pm 0/05$ نانومول بود ($n=5$). مقادیر غلظت های مشابه در گروه پدر معتاد، به ترتیب $1/06 \pm 0/15$ ؛ $2/03 \pm 0/2$ و $0/9 \pm 0/05$ ؛ $1/75 \pm 0/11$ نانومول بود ($n=5$).

نتایج نشان داد که در فرزندان هر دو گروه مادر معتاد و پدر معتاد، غلظت گلوتامات خارج سلولی پایه و تحریکی ناحیه شکنج دندانه‌ای نسبت به گروه شاهد خود به طور معنی داری کاهش یافته است. در گروه مادر معتاد میزان گلوتامات پایه و تحریکی در ناحیه شکنج دندانه‌ای در فرزندان ماده کمتر از فرزندان نر بود. میزان گلوتامات پایه و احریکی ناحیه شکنج دندانه‌ای فرزندان در گروه مادر معتاد به طور معنی داری کمتر از گروه پدر معتاد بود.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مصرف مورفین می‌تواند منجر به کاهش غلظت گلوتامات مایع خارج سلولی ناحیه شکنج دندانه‌ای در فرزندان گردد که به نوبه خود می‌تواند موجب اختلالاتی در روند حافظه و یادگیری شود. بنابر این آگاه کردن افکار عمومی از عواقب اثر اعتیاد بر فرزندان بایستی بیشتر مورد توجه قرار گیرد.

واژه های کلیدی: گلوتامات ، مورفین ، هیپوکامپ، موش صحرایی

♦ مربی- عضو هیئت علمی گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی لرستان

♦♦ استادیار - عضو هیئت علمی گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی اهواز

♦♦♦ فوق لیسانس فیزیولوژی

مقدمه

مواد و روشها

اعتیاد معضل بزرگ جوامع امروزی است. اکثر افراد معتاد، جوان بوده و در سنین باروی می‌باشند (۱). در انسان تماس با مورفین طی بارداری^۱ موجب عقب افتادگی کلی رشد و تکامل و اختلالاتی در تکامل سیستم عصبی مرکزی از قبیل اشکال در تطابق خود با شرایط جامعه، خشم غیر قابل کنترل، اعتماد به نفس ضعیف و پرخاشگری (۲،۳) و اختلال در فرآیند یادگیری و حافظه می‌شود (۱،۴). متأسفانه توجه به نقش انفرادی زنان باردار در سلامت جنین و نوزاد موجب شده است که نقش احتمالی پدر در این خصوص کمتر مورد توجه قرار گیرد و این در حالی است که مواردی از اختلالات تکاملی از قبیل کاهش تعداد نوزادان، کاهش وزن، نقص‌های مادرزادی، اختلالات رفتاری و اختلال در یادگیری و حافظه در فرزندان پدران معتاد گزارش شده است (۵). هیپوکامپ یکی از ساختارهای مغز می‌باشد که در فرآیند یادگیری و حافظه نقش مهمی دارد (۶). مسیر عصبی نفوذی^۲ به ناحیه شکنج دندانهای^۳ هیپوکامپ، گلوتاماترژیک می‌باشد و نقش مهمی در ایجاد تقویت طولانی مدت^۴ و شکل‌پذیری سیناپسی^۵، یادگیری و حافظه دارد (۷،۸،۹).

گلوتامات خارج سلولی آزاد شده از انتهای پیش سیناپسی، توسط ترانسپورترهای موجود در غشاء نوروها و سلول‌های گلیال برداشته می‌شود. ترانسپورترهای سلول‌های گلیال نقش مهمی در تنظیم غلظت خارج سلولی گلوتامات در مغز دارند (۱۰).

با توجه به نقش گلوتامات ناحیه شکنج دندانهای هیپوکامپ در ایجاد یادگیری، در این مطالعه اثر اعتیاد یکی از والدین به مورفین بر غلظت پایه و تحریکی گلوتامات ناحیه شکنج دندانهای فرزندان در موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

در این مطالعه تجربی از موش‌های صحرایی بالغ از نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده گردید. حیوانات در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی و دمای $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$) نگهداری شدند.

روش ایجاد اعتیاد: از ۵ روز قبل از جفت‌گیری، مورفین بادوز ۳۲ میلی‌گرم / کیلوگرم (محلول دکستروز ۵٪) به صورت خوراکی و ۲ بار در روز داده شد (۱۱).

روش تعیین اعتیاد: برای این منظور، از تجویز داخل صفاقی نالوکسان با دوز ۲ mg/kg استفاده شد. علائم ترک مصرف دارو مانند پرش و بخصوص اسهال پس از گذشت ۳۰ دقیقه از زمان تزریق مشاهده شد. موش‌هایی که این علائم را نشان نمی‌دادند از دور آزمایش حذف شدند (۱۱).

حیوانات شاهد: به حیوانات ماده گروه شاهد ۱ و نر گروه شاهد ۲، هم‌حجم مورفین داده شده به حیوانات معتاد، دکستروز ۵٪ به صورت خوراکی و ۲ بار در روز داده شد. همچنین معادل نالوکسان تزریق شده به حیوانات معتاد، حیوانات شاهد نیز نالوکسان دریافت کردند.

تقسیم‌بندی حیوانات: گروه شاهد ۱: ماده غیر معتاد دریافت کننده دکستروز ۵٪ (n=۲۰) و نر غیر معتاد (n=۸).

گروه شاهد ۲: ماده غیر معتاد (n=۲۰) و نر غیر معتاد دریافت کننده دکستروز ۵٪ (n=۸).

گروه تجربی ۱: ماده معتاد (n=۲۰) و نر غیر معتاد (n=۸).

گروه تجربی ۲: ماده غیر معتاد (n=۲۰) و نر معتاد (n=۸).

جفت‌گیری و بارداری: در هر قفس، ۵ سر موش ماده و ۲ سر موش نر به مدت یک هفته قرارداد شدند.

از روز اول بارداری (زمان دیدن پلاک واژنی)، حیوانات باردار در قفس‌های جداگانه قرار گرفتند. طی دوران جفت‌گیری

1- Prenatal morphine exposure

2- Perforant path

3 - Dentate gyras

4- Long tem Potentiation

5- Synaptic Plasticity

حاصل از تحریک جمع آوری شد (۱۶). نمونه‌های جمع آوری شده بلافاصله در درجه حرارت 80°C - قرار داده شد.

در پایان برای اطمینان از قرار گرفتن پروب در ناحیه شکنج دندان‌های و الکتروود تحریکی در مسیر نفوذی، مغز حیوان خارج می‌شد و در فرمالین ۱۰٪ ثابت می‌گردید. سپس از محل پروب که قبلاً با تزریق رنگ مشخص شده و الکتروود تحریکی که قبلاً با جریان الکتریکی محل ورود آن سوزانده شده، برش‌هایی تهیه شد تا محل صحیح قرار گرفتن پروب تأیید گردد. نمونه‌هایی که محل قرار گرفتن پروب یا الکتروود تأیید نشد از نمونه‌های مورد مطالعه حذف شد.

غلظت گلوتامات نمونه‌ها با استفاده از دستگاه HPLC و ردیاب فلوروسنت اندازه‌گیری شد. ستون با ابعاد $4 \times 125 \text{ mm}$ (Spherinage C₁₈، $5 \mu\text{m}$) و ردیاب فلوروسنت (Knauer RF-10A×L) استفاده گردید. فاز متحرک حاوی بافر استات سدیم با غلظت 50 mM و متانول (۱۹٪) با $\text{pH}=7$ ، سرعت پرفیوزن^۱ میلی لیتر/دقیقه و حجم نمونه تزریق ۲۰ میکرو لیتر بود.

محاسبه مدت زمان احتباس^۲ (مدت زمان لازم برای عبور ماده از ستون و شناسایی آن توسط ردیاب)، ارتفاع پیک و مساحت سطح زیر پیک‌های حاصله به صورت اتوماتیک توسط دستگاه انجام و ثبت شد.

روش آماری: نتایج به صورت میانگین و خطای معیار (Mean±SE)، با استفاده از نرم افزار STATISTICA و آنالیز واریانس دو طرفه و تست توکی (Tukeys'HSD) مقایسه شدند. $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

غلظت گلوتامات پایه و تحریکی ناحیه شکنج دندان‌های هیپوکامپ فرزندان نر در گروه‌های شاهد ۱، شاهد ۲، تجربی ۱ و تجربی ۲ در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

و بارداری، تجویز مورفین به حیوانات معتاد ادامه داشت. جهت جلوگیری از بروز سندرم ترک^۱ در نوزادان، مقدار مورفین خوراکی مادر، طی ۱۰ روز اول پس از زایمان به تدریج کاهش داده شد تا به صفر رسید (۱۲).

نوزادان ۲۵ روزه از مادر جدا و به تفکیک جنسی در قفس‌های مجزایی نگهداری شدند تا به سن بلوغ رسیدند. سپس از هر گروه ۱۰ فرزند (از هر مادر ۲ فرزند، یکی نر و یکی ماده) در محدوده سنی ۱۴۰-۱۲۰ روز بطور تصادفی انتخاب گردید.

پروب میکرو دیالیز به شکل Y با استفاده از غشاء دیالیز از جنس سلولز با قطر داخلی ۲۰۰ میکرون و طول مؤثر ۲ میلی‌متر (شرکت Eicom ژاپن) ساخته شد (۱۳). سپس درصد استخراج گلوتامات هر پروب اندازه‌گیری شد. الکتروود تحریکی از جنس سیم استیل (AISI₃₁₆) با قطر 0.125 mm ساخته شد. حیوانات با اورتان ($1/5$ گرم/کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی بیهوشی و در دستگاه استریوتاکی قرار داده شدند. طبق اطلس پاکسینوو اعمال ضریب تصحیح، پروب در ناحیه شکنج دندان‌های با مشخصات $\text{AP}=3/8 \text{ mm}$ ، $\text{ML}=2/4 \text{ mm}$ ، $\text{DV}=3/3 \text{ mm}$ و الکتروود تحریکی در ناحیه مسیر نفوذی با مشخصات $\text{AP}=8/1 \text{ mm}$ ، $\text{ML}=4/3 \text{ mm}$ ، $\text{DV}=2/7 \text{ mm}$ کاشته شد (۱۴). تا ۱۴ تا ۱۶ ساعت پس از کاشت پروب، مایع مغزی نخاعی مصنوعی حاوی $\text{MgCl}_2=0/9 \text{ mM}$ ، $\text{CaCl}_2=1/2 \text{ mM}$ ، $\text{NaCl}=147 \text{ mM}$ ، $\text{KCl}=4 \text{ mM}$ در آب سه بار تقطیر با pH معادل $7/4-7/2$ (۱۵) توسط پمپ میکروسرنج به داخل پروب با سرعت ۲ میکرولیتر در دقیقه پرفیوز شد. ۱/۵ ساعت پس از شروع پرفیوزن (جهت تثبیت غلظت گلوتامات خارج سلولی) نمونه‌های میکرودیالیز ۱۰-۹۰ دقیقه جمع آوری شد. نمونه‌ها در ویال‌های پلاستیکی درب دار میکروسانتریفیوژ که در داخل یخ قرار داشت جمع آوری شد؛ سپس مسیر نفوذی به مدت ۲۰ دقیقه با فرکانس HZ ۱۰ و جریان ۷۰۰ میکروآمپر تحریک و طی زمان فوق نمونه

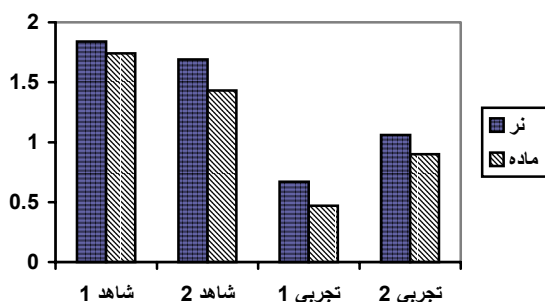
1. Withdrawal Syndrom
2. Retention Time

جدول شماره ۱: غلظت گلوتامات پایه و تحریکی فرزندان نر و ماده در گروه‌های مختلف بر حسب نانومول

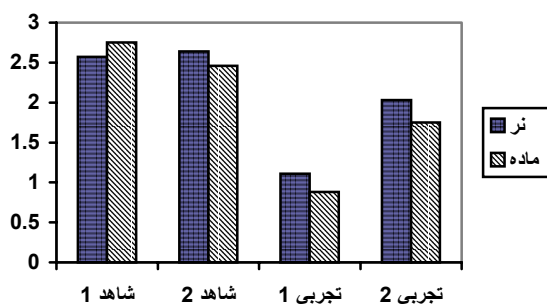
غلظت گلوتامات	پایه Mean±SD	تحریکی Mean±SD	پایه Mean±SD	تحریکی Mean±SD
شاهد ۱	۱/۸۴±۰/۰۶	۲/۵۷±۰/۰۱	۱/۷۴±۰/۰۲	۲/۷۵±۰/۰۱۶
شاهد ۲	۱/۶۹±۰/۰۵	۲/۶۴±۰/۰۱۲	۱/۴۳±۰/۰۱۴	۲/۶۴±۰/۰۲
تجربی ۱	۰/۶۷±۰/۰۴	۱/۱۱±۰/۰۱	۰/۴۷±۰/۰۰۶	۰/۸۸±۰/۰۰۵
تجربی ۲	۱/۰۶±۰/۰۵	۲/۰۳±۰/۰۲	۰/۹±۰/۰۰۵	۱/۷۵±۰/۰۱۱

n=5

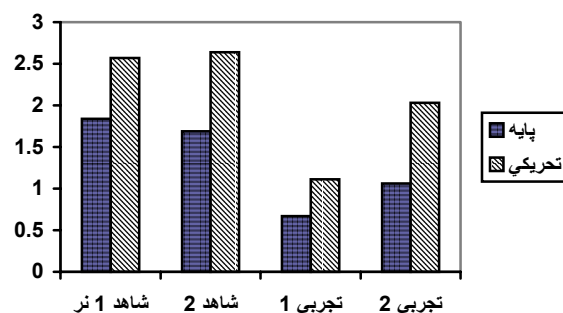
در تمام موارد فوق غلظت گلوتامات تحریکی به طور معنی داری ($P < 0.001$) بیشتر از غلظت گلوتامات پایه بود (نمودارهای ۱ و ۲).



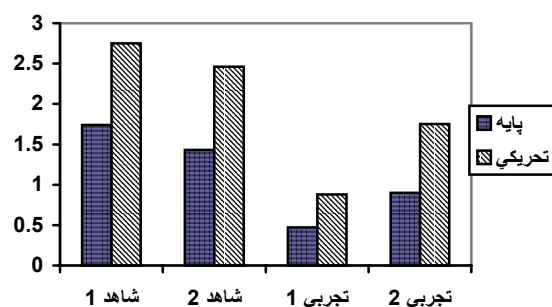
نمودار ۳- مقایسه غلظت های گلوتامات پایه ناحیه شکنج دندانهای در فرزندان نر و ماده گروههای شاهد و تجربی (معتاد) در موش صحرائی



نمودار ۴- مقایسه غلظت های گلوتامات تحریکی ناحیه شکنج دندانهای در فرزندان نر و ماده گروههای شاهد و تجربی (معتاد) در موش صحرائی



نمودار ۱- مقایسه غلظت های گلوتامات پایه و تحریکی ناحیه شکنج دندانهای فرزندان نر و ماده گروههای شاهد و تجربی (معتاد) در موش صحرائی



نمودار ۲- مقایسه غلظت های گلوتامات پایه و تحریکی ناحیه شکنج دندانهای فرزندان ماده در گروههای شاهد و تجربی (معتاد) در موش صحرائی

غلظت گلوتامات پایه و تحریکی هر دو جنس در گروههای تجربی ۱ و ۲ به طور معنی داری به ترتیب کمتر از مقادیر مشابه در گروههای شاهد ۱ ($P < 0.0001$) و شاهد ۲

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که اعتیاد موش‌های صحرائی ماده به مورفین طی بارداری موجب کاهش میزان گلوتامات پایه و تحریکی ناحیه شکنج دندانهای هیپوکامپ در فرزندان می شود. غلظت پایه گلوتامات خارج سلولی در سیستم عصبی

شکنج دندانهای هیپوکامپ در جنس ماده کمتر از جنس نر است (نمودارهای ۳ و ۴).

از آنجایی که زمان بندی تکامل مغز در دو جنس متفاوت است، تماس با مورفین در دوران بارداری می تواند پاسخهای متفاوتی در فرزندان نر و ماده ایجاد کند (۱۶). همچنین در این مطالعه غلظت گلوتامات پایه و تحریکی در فرزندان گروه تجربی ۲ (پدر معتاد) کاهش یافته بود. گزارشی مبنی بر علت کاهش گلوتامات در فرزندان پدرمعتاد وجود ندارد. از آنجاکه تنها راه اعمال اثرات مورفین مصرف شده توسط پدر بر روند تکامل جنین از راه مایع منی می باشد. لذا جهت یافتن دلایلی مبنی بر کاهش گلوتامات فرزندان پدر معتاد می توان به اثرات مورفین بر مایع منی استناد کرد. اخیرا چندین مکانیسم احتمالی که به وسیله آن تماس پدر به داروها ممکن است موجب اختلالاتی در فرزندان گردد، بررسی شده است (۲۲). مکانیسمهای احتمالی شامل تغییرات ژنتیکی اسپرم (اثر بر سلولهای ژرمینال)، اثرات سمی یا اپی ژنتیک اسپرم (تغییرات غیر موتاسیونی که روی بیان ژن اثر می گذارد) (۲۳، ۲۴)، اثرات غیر مستقیم داروها روی بیضه، اپی دیدیم، ارگانهای فرعی جنسی و انتقال مستقیم مواد سمی به دستگاه تناسلی ماده از طریق مایع منی است (۲۵). همچنین ممکن است داروها به اسپرم چسبیده و با ورود به اووسیت منجر به اثرات سمی در جنین شوند (۲۵).

غلظت گلوتامات پایه و تحریکی فرزندان گروه تجربی ۱ کمتر از مقادیر مشابه در گروه تجربی ۲ بود. این کاهش می تواند به دلیل تماس بیشتر فرزندان گروه تجربی ۱ به مورفین طی دوران جنینی باشد. بررسی سایر مکانیسمهای احتمالی از جمله اثرات مورفین در مسیرهای بیوشیمیایی ترشح گلوتامات و اختلالات احتمالی ناشی از تغییرات اپیوئیدهای داخلی بدنبال مصرف مورفین نیاز به بررسی بیشتر دارد. با توجه به نتایج این مطالعه اعتیاد به مورفین والدین می تواند منجر به کاهش غلظت

مرکزی پستانداران عمدتا توسط دو ترانسپورتر $GLT-1$ و $GLAST$ واقع در غشاء آستروسیت تنظیم می شود (۱۷). با توجه به اینکه مورفین موجب تغییر بیان mRNA ترانسپورتر $GLT-1$ می شود (۱۰). بنابر این احتمال دارد که کاهش غلظت پایه گلوتامات ناشی از اثر مورفین بر بیان mRNA ترانسپورتر $GLT-1$ باشد. در سیستم عصبی مرکزی غلظت اسید آسکوربیک نسبت عکس با غلظت گلوتامات دارد که این به دلیل وجود یک سیستم تبادلی آسکوربات/گلوتامات در مغز است (۱۸). مصرف مورفین از طریق تحریک این سیستم تبادلی سبب کاهش غلظت گلوتامات می شود (۱۸). بنابر این احتمال دارد که تماس با مورفین در دوران بارداری از طریق تغییراتی در تکامل این سیستم تبادلی آسکوربات/گلوتامات، باعث بازجذب بیشتر گلوتامات و در نتیجه کاهش غلظت پایه گلوتامات خارج سلولی ناحیه شکنج دندانهای شده باشد.

گلوتامات نوروترانسمیتر بسیاری از مسیرهای هیپوکامپ می باشد و شواهد زیادی مبنی بر نقش محوری افزایش کلسیم داخل سلولی بدنبال دیپولار یزاسیون، در رهایش نوروترانسمیتر وجود دارد. کانالهای کلسیمی P-Q و N نقش مهمی در افزایش غلظت یون کلسیم داخل سلولی و در نتیجه رهایش گلوتامات از انتهای اعصاب دارند (۱۹). مهار کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ، واقعه سلولی است که اساس اثرات اپیوئیدی در جهت کاهش تحریک پذیری سلولی و آزاد شدن نوروترانسمیتر موجب می شود. کاهش جریان کلسیمی وابسته به ولتاژ ناشی از فعال شدن گیرندههای اپیوئیدی مو (μ) و دلتا (Δ) و از طریق پروتئینهای G_i و G_o می باشد (۲۰). مصرف اپیوئیدها در دروان بارداری سبب تغییر در فعالیت $GTPase$ ، G_i ، G_o می شود (۲۱). بنابراین احتمال دارد که این تغییرات منجر به کاهش جریان کلسیمی وابسته به ولتاژ و در نتیجه کاهش رهایش گلوتامات شود.

نتایج این مطالعه نشان می دهد که در فرزندان گروه تجربی ۱ (ماده معتاد) غلظت گلوتامات پایه و تحریکی ناحیه

1. Glutamate transporter
2. Glutamate aspartate transporter

References

- Slamberova R, Schindler CJ, Pometlova M, Urkati C, Purow- Schindler JA, and Vathy I. Prenatal morphine exposure differentially alters learning and memory in male and female rats. *Physiology and Behavior*, 2001; 73: 93-103
- Siddiqui A, HaQ S, and Shah Bh. Perinatal exposure to morphine disrupts brain norepinephrine, ovarian cyclicity, and sexual receptivity in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1997; 58(1): 243-48
- Siddiqui A, HaQ S, Shahary S, and Haider G. Morphine induces Reproductive changes in female rats and their male offspring. *Reproductive Toxicology*, 1995; 9 (2): 143-151
- ۴- علیزاده منصوری، ف؛ معتمدی، ف؛ فتح الهی و همکاران. نقش تجویز مزمن مورفین بر روند تقویت طولانی مدت (LTP) در ناحیه CA1 برش‌های هیپوکامپ موش صحرایی. *مجله فیزیولوژی فارماکولوژی*، جلد، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۷۶، صص
- Nelson Bk, Moorman WJ and Schrader SM. Review experimental male mediated behavioral and neurochemical disorders. *Neurotoxicology and Teratology*, 1996; 18(6): 611-616
- Tavares M and Silva M. Body weight gain and hippocampal volumes of rat exposed neonatally to Psychostimulants. *Brain Res*, 1993; 619: 137-145
- Itoy- Tabata K, Makimura M, Fukuda H. Acute and Chronic intracerebro ventricular morphine infusion affect long term potentiation differently in the lateral perforant path. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2001; 70: 353-358
- گلوتامات مایع خارج سلولی ناحیه شکنج دندانه‌ای در فرزندان واحتمالا اختلالاتی در روند حافظه و یادگیری شود. بنابر این آگاه کردن افکار عمومی از عواقب اثر اعتیاد بر فرزندان بایستی بیشتر مورد توجه قرارگیرد.
- Maleszka R, Helliwell P, Kucharski R, Pharmacological interference with glutamate re-uptake impairs long term memory in the honeybee, *apis mellifera*. *Behavioral Brain Research*, 2000; 115: 49- 53
- Saransaar P, and Oja SS. Age related changes in the uptake and release of glutamate and aspartate in the mouse brain. *Mechanisms of aging and development*, 1995; 81: 61-71
- Ozawa T, Nakagawa T, Shige K, Minami M, Satoh M. Changes in the expression of glial glutamate transporters in the rat brain accompanied with morphine dependence and naloxone precipitated withdrawal. *Brain Research*, 2001; 905: 254-258
- Manning BH, Mao J, Frenk H, Price DD and Mayer DJ Continuous co-administration of dextromethorphan or MK- 801 with morphine: attenuation of morphine dependence and naloxone reversible attenuation of morphine tolerance, *Pain*, 1996; 67: 79-88
- Tsang D, and Nasg SC. Effect of antinatal exposure to opiates on the development of opiates receptors in rat brain. *Brain Resesrch*, 1980; 188:199-206
- Itashimoto A, Kanada J and Oka T. Effects of N- methyl- D- aspartate. Kainate or veratridine on extracellular concentration of free D- serine and L- glutamate in rat Striatum:An in vivo microdialysis study. *Brain Research Bulletin*, 2000; 53(3): 347-351

14. Robinson GB, and Racine RJ. Interaction between septal and entorhinal inputs to the rat dentate gyrus: facilitation effects. *Brain Res*, 1986; 379: 63-67
15. Vathy I. Prenatal opiate exposure: long term CNS consequences in the stress system of the offspring. *psychoneuroendocrinology*, 2002; 27: 273-283
16. Florin- Lencher SM, Druhan JP, Aston-Jones G, and Valentino RJ. Enhanced norepinephrine release in prefrontal cortex with burst stimulation of the locus coeruleus, *Brain Research*, 1996; 742: 89-97
17. Mullany P, Connolly S, and Lynch MA. Aging is associated with changes in glutamate release, protein tyrosine kinase and Ca^{2+} / calmodulin- dependent protein kinaseII in rat hippocampus. *European Journal of Pharmacology*, 1996; 309: 311-315
18. Enrico P, Mura MA, Esposito G, Serra P, Migheli R, De Natale G, Desole MS and et al. Effect of naloxone on morphine-induced changes in striatal dopamine metabolism and glutamate, ascorbic acid and uric acid release in freely moving rats. *Brain Research*, 1998; 797: 94-102
19. Pereira DB, Carvalho AP, And Duarte CB. Non specific effects of the MEK inhibitors PD098059 on glutamate release from hippocampal synaptosomes. *Neuropharmacology*, 2002; 48: 9-19
20. Rimanoczy A, and Vathy I. Prenatal exposure to morphine alters brain μ opioid receptor characteristics in rats. *Brain Reserch*, 1995; 690: 245-248
21. Zamir I, and Yanai J. GTPase activity in mouse hippocampus membranes following prenatal exposure to heroin and phenobarbital. *Biochemical Pharmacology*, 1995; 50(1): 127-130
- 22- Hales BF, Grossman K, and Robaire B. Increased post implantation loss and malformations among the F2 progeny of male rats chronically treated with cyclophosphamide. *Teratol*, 1992; 45: 671-678.
23. Wyrobek AJ, Gordon LA, Burkhart JG. An evaluation of human sperm as indicators of chemically induced alterations of spermatogenic function. *Mutation Res*, 1983; 15: 73-148
24. Wyrobek AJ. Methods and concepts in detecting abnormal reproductive outcomes of paternal origin. *Reprod Toxicolo Suppl*, 1993; 1: 3-16
25. Friedler G. Paternal exposures: impact on reproductive and developmental outcome An overview. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1996; 55(4): 691-700