

## Transgenerational Effects of Parental Morphine Withdrawal on Learning and Spatial Memory Processes and Hippocampal BDNF Protein Levels across Two Generations of Male Rats

Saeid Ataei<sup>1++</sup>, Seyedehfatemeh Hosseini<sup>2++</sup>, Samaneh Seyyedi<sup>3</sup>, Mina Ranjbaran<sup>3</sup>, Mohammadreza Zarrindast<sup>1</sup>, Ghorbangol Ashabi<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Iranian National Center for Addiction Studies (INCAS), Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### Article Info:

Received: 27 Sep 2025

Revised: 25 Nov 2025

Accepted: 7 Feb 2026

## ABSTRACT

**Introduction:** The aim of this study was to investigate the effects of parental morphine withdrawal (maternal and paternal) on learning and spatial memory behaviors and hippocampal BDNF protein levels in first and second-generation offspring in a Wistar rat model. The focus of the research was on evaluating the behavioral and cognitive changes across two subsequent generations following parental exposure to morphine administration and withdrawal.

**Materials and Methods:** Rats were divided into three groups: control, maternal morphine withdrawal group (MMW), and paternal morphine withdrawal group (PMW). Parental morphine dependence was induced using escalating oral doses (10 to 40 mg/kg for 3 weeks), followed by a 10-day withdrawal period to induce the morphine withdrawal phase. After confirming withdrawal symptoms, first and second generations were bred for behavioral assessments. Cognitive behavior of offspring was evaluated using the Barnes maze test.

Afterward, rats were euthanized, and hippocampal brain tissue was extracted to measure hippocampal BDNF protein levels using an ELISA kit. In the learning phase, initial delay times on days four and five showed a significant difference between the MMW group and control. Initial error counts on day five in the first generation differed significantly between the MMW and control groups. Moreover, initial error counts on day three in the first generation showed a significant difference between the PMW and control groups. In the second generation, initial error counts also showed a significant difference, but only on day three between the PMW and control groups. In the spatial memory test (day six), both MMW and PMW groups in the first generation exhibited greater delay times and error counts compared to controls. However, in the second generation, delay time and error count factors did not show a significant difference compared to controls. Furthermore, hippocampal BDNF protein levels in the first generation were significantly reduced in the morphine withdrawal offspring groups compared to the control group.

**Conclusion:** The findings of this study indicate that parental morphine withdrawal results in significant behavioral and cognitive impairments in offspring. These results underscore the importance of monitoring and preventing morphine use in parents to reduce vulnerability in future generations.

### Keywords:

1. Substance Withdrawal Syndrome
2. Paternal Exposure
3. Maternal Exposure
4. Hippocampus

\*Corresponding Author: Ghorbangol Ashabi

Email: Gh-ashabi@tums.ac.ir

++ These authors contributed equally to this work



# اثرات بین‌نسلی ترک مورفین والدینی بر فرآیندهای یادگیری و حافظه فضایی و سطوح پروتئین BDNF هیپوکامپ در دو نسل از موش‌های صحرایی نر

سعید عطایی<sup>۱++</sup>، سیده فاطمه حسینی<sup>۲++</sup>، سمانه سیدی<sup>۲</sup>، مینا رنجبران<sup>۲</sup>، محمدرضا زرین دست<sup>۱</sup>، قربانگل اصحابی<sup>۳\*</sup>

<sup>۱</sup>مرکز ملی مطالعات اعتیاد، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران  
<sup>۲</sup>گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
<sup>۳</sup>گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

## اطلاعات مقاله:

پذیرش: ۱۸ بهمن ۱۴۰۴

اصلاحیه: ۴ آذر ۱۴۰۴

دریافت: ۵ مهر ۱۴۰۴

## چکیده

**مقدمه:** هدف از این مطالعه، بررسی اثرات ترک مورفین والدینی (مادری و پدری) بر رفتارهای یادگیری و حافظه فضایی و سطوح پروتئین BDNF هیپوکامپ در فرزندان نسل اول و دوم در یک مدل موش صحرایی نژاد ویستار بود. تمرکز پژوهش بر ارزیابی تغییرات رفتاری و شناختی در دو نسل متوالی متعاقب مواجهه والدین با تجویز مورفین و به دنبال آن، دوره ترک است. **مواد و روش‌ها:** موش‌ها به سه گروه کنترل، گروه ترک مورفین مادری (MMW) و گروه ترک مورفین پدری (PMW) تقسیم شدند. وابستگی به مورفین در والدین با استفاده از دوزهای خوراکی افزایش‌یافته (۱۰ تا ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت ۳ هفته) القا شد و سپس یک دوره ترک ۱۰ روزه برای القای فاز ترک مورفین اعمال گردید. پس از تأیید علائم ترک، نسل‌های اول و دوم برای ارزیابی‌های رفتاری پرورش یافتند. رفتار شناختی فرزندان با استفاده از آزمون ماز بارنز ارزیابی شد. پس از آن، موش‌ها کشته شدند و بافت مغز هیپوکامپ برای اندازه‌گیری سطوح پروتئین BDNF هیپوکامپ با استفاده از کیت الیزا استخراج گردید. **یافته‌ها:** در مرحله یادگیری، زمان‌های تأخیر اولیه در روزهای چهارم و پنجم بین گروه MMW و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان داد. تعداد خطاهای اولیه در روز پنجم در نسل اول بین گروه‌های MMW و کنترل تفاوت معنی‌داری داشت. علاوه بر این، تعداد خطاهای اولیه در روز سوم در نسل اول بین گروه‌های PMW و کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان داد. در نسل دوم، تعداد خطاهای اولیه نیز تفاوت معنی‌داری را نشان داد، اما تنها در روز سوم بین گروه‌های PMW و کنترل. در آزمون حافظه فضایی (روز ششم)، هر دو گروه MMW و PMW در نسل اول زمان‌های تأخیر و تعداد خطاهای بیشتری را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند. با این حال، در نسل دوم، عوامل زمان تأخیر و تعداد خطاها در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند. علاوه بر این، سطوح پروتئین BDNF هیپوکامپ در نسل اول در گروه‌های فرزندان دارای والدین با ترک مورفین در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافته بود. **نتیجه‌گیری:** یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که ترک مورفین والدینی منجر به اختلالات رفتاری و شناختی معنی‌داری در فرزندان می‌شود. این نتایج بر اهمیت پایش و پیشگیری از مصرف مورفین در والدین به منظور کاهش آسیب‌پذیری در نسل‌های آینده تأکید می‌کند.

## واژه‌های کلیدی:

- ۱- سندرم ترک مواد
- ۲- مواجهه پدری
- ۳- مواجهه مادری
- ۴- هیپوکامپ

\*نویسنده مسئول: قربانگل اصحابی

پست الکترونیک: Gh-ashabi@tums.ac.ir

این نویسندگان به نسبت مساوی در نگارش مقاله مشارکت داشته‌اند.

## مقدمه

در تست‌های جستجوی هدف در فرزندان می‌شود (۹، ۸).

مطالعات تجربی نشان داده‌اند که مصرف مورفین، یا ترک آن، در والدین (چه والد مادر چه والد پدر) موجب کاهش بیان فاکتورهای نوروتروفیک مثل BDNF<sup>۱</sup> و CREB<sup>۲</sup> در ساختارهای نورونی فرزندان، و همین‌طور آسیب در مسیرهای دوپامینرژیک می‌شود که همگی منجر به ضعف یادگیری و حافظه فضایی است (۹، ۶). کاهش BDNF که یک فاکتور حیاتی برای پلاستیسیته سیناپسی و یادگیری است، به‌طور مستقیم می‌تواند به مشکلات حافظه و یادگیری در نسل‌های بعدی منجر شود. این تغییرات نشان می‌دهند که مورفین می‌تواند بر ساختارهای هیستونی تغییر ایجاد کرده و به فرزندان نسل بعد منتقل شود (۸، ۳). با این شواهد، می‌توان نتیجه گرفت که اختلال حافظه و کارکردهای شناختی در نسل اول فرزند موش‌های والد معتاد به مورفین یک پدیده مستند و قابل ارزیابی با تست‌های رفتاری استاندارد است و می‌تواند به‌عنوان نمونه‌ای از انتقال اثرات اپی‌ژنتیک و عصبی اعتیاد مطرح شود.

پژوهش‌های تجربی روی مدل‌های حیوانی (به ویژه موش) نشان داده‌اند که نه تنها نسل اول، بلکه نسل دوم نیز می‌تواند آسیب‌های رفتاری و تکوینی ناشی از تماس مادر با مورفین را تجربه کند. تغییرات اپی‌ژنتیک، اختلال در سازوکار حافظه، اضطراب و افزایش یا کاهش حساسیت به مواد مخدر در نسل دوم مشاهده شده است. یکی از اولین شواهد واضح اثرات بین‌نسلی، کاهش گرایش به خود-تجویزی مواد مخدر و تغییر بیان ژن‌های مرتبط با پلاستیسیته سیناپسی و پروتئین‌های میلینی در مغز نسل دوم حیواناتی بود که مادر آنها در طی بارداری در معرض مورفین قرار گرفته بود (۱۰). با این وجود شواهد کمی در خصوص فرزندان نسل‌های بعد در والدین دچار ترک استفاده از مورفین دیده شده است و بیشتر مطالعات بر روی فرزندان والد مادر در دوران بارداری و یا کمی قبل از بارداری انجام شده است.

در مدل‌های حیوانی، آزمون‌های رفتاری مانند ماز بارنز به‌عنوان ابزاری استاندارد برای سنجش حافظه فضایی و یادگیری جوندگان مورد استفاده قرار گرفته و نسبت به شرایط عصبی، سطح استرس والدین، و مواجهه قبلی با مواد حساسیت‌بالایی دارد. با توجه به این موارد گفته شده، مطالعه حاضر به بررسی تغییرات

اعتیاد به مواد مخدر به ویژه اپیوئیدهایی مانند مورفین در دهه‌های اخیر به یکی از جدی‌ترین معضلات سلامت عمومی تبدیل شده است. شیوع مصرف مواد افیونی و عوارض آن در زنان باردار طی دو دهه گذشته به‌طور قابل توجهی افزایش پیدا کرده است؛ به طوری که بر اساس مطالعات بزرگ در ایالات متحده، در یک نمونه ۹۱۰/۲۴ نوزاد، حدود ۶/۷ درصد به صورت پره‌ناتال در معرض مواد افیونی قرار گرفته‌اند و این کودکان ریسک بالاتری برای اختلالات تکوین عصبی نشان داده‌اند. در کشورهای آسیایی و اروپایی نیز افزایش موارد گزارش شده است. استفاده از مورفین یا مواد افیونی در بارداری با بروز مشکلات رفتاری و شناختی در نسل اول (فرزندان مستقیم) و حتی نسل دوم (نوه‌ها) ارتباط مستقیم دارد (۲، ۱). استفاده مکرر از مورفین می‌تواند عوارض جانبی متعدد، از جمله تحمل دارویی و بروز وابستگی شدید را ایجاد کند. این موضوع نه‌تنها زندگی فرد مصرف‌کننده را تحت تأثیر قرار می‌دهد، بلکه مطالعات جدید نشان داده‌اند که رفتار و وضعیت روانشناختی نسل‌های بعد نیز تحت تأثیر عوامل محیطی و اپی‌ژنتیکی مرتبط با اعتیاد والدین قرار می‌گیرد (۴، ۳).

مدارهای نورونی درگیر در اعتیاد مورفین، از جمله نواحی تگمنتوم شکمی، هسته اکومبنس و هیپوکامپ مغز، در تنظیم رفتارهای پاداش، حافظه، و یادگیری نقش کلیدی دارند. یکی از نتایج مهم وابستگی به مواد افیونی، اختلالات شناختی به خصوص در حافظه فعال و حافظه فضایی است. مورفین می‌تواند موجب کاهش انعطاف‌پذیری سیناپسی شود، مثلاً کاهش القای تقویت طولانی مدت و مختل شدن تضعیف طولانی مدت در نواحی مهمی مانند هیپوکامپ و قشر مغز رخ می‌دهد (۵). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که در موش‌های دارای والد معتاد، فرزندان دچار افت معنی‌دار حافظه فضایی و کاهش عملکرد شناختی به ویژه در آزمون‌های رفتاری مانند ماز آبی موریس می‌شوند. این اختلال مستقل از مواجهه جنینی مستقیم با مورفین و ناشی از تغییرات اپی‌ژنتیکی و تنظیم مولکولی مغز فرزندان است (۷، ۶). به‌طور خاص، گزارش شده است که مواجهه پیش و پس از زایمان با مورفین موجب کاهش سیناپس‌های هیپوکامپی، تغییر در وزن و حجم هیپوکامپ، افت سطح گلوتامات و در نتیجه اختلال در یادگیری و حافظه فضایی

<sup>۱</sup> Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

<sup>۲</sup> CAMP response element-binding protein (CREB)

گروه کنترل: والدین سالم، فاقد مواجهه با مورفین  
گروه والد ماده ترک مورفین: گروه موش‌های  
صحرائی ماده ترک‌کرده مورفین × موش‌های  
صحرائی نر سالم: ماده‌ها با پروتکل وابستگی  
و ترک مورفین سپس جفت‌گیری با نر سالم  
گروه والد نر ترک مورفین: گروه موش‌های  
صحرائی نر ترک‌کرده مورفین × موش‌های  
صحرائی ماده سالم: نرها با پروتکل وابستگی به  
مورفین و ترک سپس جفت‌گیری با ماده سالم  
وابستگی به مورفین در والدین با دوز خوراکی بصورت  
تصاعدی (۱۰ تا ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۳  
هفته) القا شد و سپس قطع مورفین به مدت ده روز  
به جهت ایجاد فاز ترک مورفین صورت گرفت. اثبات  
وابستگی و ترک با مشاهده علائم رفتاری و آزمایش‌های  
مربوطه انجام شد. در مرحله ابتدایی، اثبات وابستگی به  
مورفین پس از دوره اعتیاد به آن با تزریق نالوکسان تایید  
شد و علائم ترک مانند تحریک‌پذیری، استفراغ، لرزش  
بدن، اسهال، سیخ شدن موها مشاهده شد (۱۱، ۱۲).  
در مرحله پس از دوره ترک در موش‌های والد، فرآیند  
جفت‌گیری آغاز شد. پس از مشاهده و تأیید تشکیل  
پلاک لقاح در موش‌های ماده، آنها از نرها جدا شده  
و به صورت انفرادی تا زمان زایمان در قفس‌های  
جداگانه نگهداری شدند. پس از تولد نوزادان، مادر و

یادگیری و حافظه فضایی در نسل اول و نسل دوم فرزندان  
موش‌های صحرائی دچار ترک مورفین می‌پردازد.  
همچنین به منظور بررسی‌های ملکولی، میزان پروتئین  
BDNF مغزی در این گروه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها حیوانات و شرایط نگهداری

دوازده موش صحرائی نر و دوازده موش صحرائی ماده  
نژاد ویستار (وزن ۱۶۰-۱۸۰ گرم، سن ۸-۱۰ هفته) از  
انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. حیوانات در شرایط  
کنترل شده آزمایشگاه شامل دوره‌های ۱۲ ساعت  
روشنایی- تاریکی، دسترسی آزادانه به آب و غذا، رطوبت  
۵۰-۳۰ درصد، درجه حرارت  $22 \pm 2$  درجه سانتیگراد و  
در قفس‌های استاندارد پلکسی گلس به تعداد ۴ سر  
در هر قفس نگهداری شدند. کلیه اقدامات جراحی و  
آزمایشگاهی روی حیوان مورد تایید کمیته اخلاق و بر  
اساس پروتکل کار با حیوانات در دانشگاه علوم پزشکی  
تهران بود (کد اخلاق IR.TUMS.AEC.۱۴۰۲.۰۷۶).

گروه‌بندی آزمایش و روند اجرای آزمایش  
تعداد موش‌های صحرائی مورد استفاده قرار گرفته در هر  
گروه و هر نسل در جدول ۱ مشخص شده است. در مرحله  
اول، موش‌های صحرائی به سه دسته اصلی تقسیم شدند:

جدول ۱- تعداد حیوانات استفاده شده در هر نسل در طی آزمایش.

نسل صفر	نسل ۱	آزمایش روی نسل ۱	نسل ۲	آزمایش روی نسل ۲
۴ نر سالم ۴ ماده سالم	۲۲ نر ۲۱ ماده	انجام تست رفتاری بر روی ۱۰ نر در نسل ۱ ایجاد شده به‌عنوان گروه کنترل	۱۸ نر ۱۸ ماده	انجام تست رفتاری بر روی ۱۰ نر در نسل ۲ ایجاد شده به‌عنوان گروه کنترل
۴ نر سالم ۴ ماده دچار ترک مورفین	۲۰ نر ۲۲ ماده	انجام تست رفتاری بر روی ۱۰ نر در نسل ۱ ایجاد شده به‌عنوان دارای والد مادر دچار ترک مورفین MMW	۱۹ نر ۲۴ ماده	انجام تست رفتاری بر روی ۱۰ نر در نسل ۲ ایجاد شده به‌عنوان دارای والد مادر دچار ترک مورفین MMW
۴ نر دچار ترک مورفین ۴ ماده سالم	۲۱ نر ۲۱ ماده	انجام تست رفتاری بر روی ۱۰ نر در نسل ۱ ایجاد شده به‌عنوان دارای والد مادر دچار ترک مورفین PMW	۱۶ نر ۱۹ ماده	انجام تست رفتاری بر روی ۱۰ نر در نسل ۲ ایجاد شده به‌عنوان دارای والد مادر دچار ترک مورفین PMW

## روند اجرای تست رفتاری ماز بارنز

تست ماز بارنز با استفاده از یک صفحه دایره‌ای (قطر  
۹۰-۱۲۲ سانتی‌متر) با ۲۰ سوراخ محیطی (قطر هر  
سوراخ ۱۰ سانتی‌متر) انجام شد. یکی از این سوراخ‌ها  
به‌عنوان محل فرار بود و جعبه‌ای در زیر آن به نام جعبه  
فرار قرار داشت. سایر سوراخ‌ها باز بودند. روی سطح  
دیوار در آزمایشگاه، نشانه‌های محیطی مختلف (اشکال،  
رنگ‌ها، اجسام) به‌عنوان سرخ فضایی قرار داده شد  
(۱۳). اجرای تست‌های رفتاری توسط فردی انجام گرفت  
که از شرایط گروه‌بندی حیوانات آگاه نبود (تک‌سو  
کور)، تا نتایج معتبرتر باشند. تعداد ۱۰ سر موش  
صحرائی نر در هر گروه برای تست رفتاری استفاده شد.  
آزمون شامل سه مرحله اصلی بود:

نوزادان به مدت یک ماه در کنار یکدیگر در همان  
قفس باقی ماندند. در روز سیام پس از تولد، فرزندان  
براساس جنسیت از هم جدا و در قفس‌های جدید  
قرار گرفتند؛ به طوری که نرها و ماده‌ها هر کدام  
جداگانه و با تراکم چهارتایی در هر قفس تا سن ۶۰  
روزگی نگهداری شدند. سپس، روی تمام افراد نسل اول  
تست رفتاری ماز بارنز برای مدت ۶ روز انجام گردید.  
بعد از اتمام این آزمایش، موش‌های صحرائی نر و ماده  
نسل اول طبق جدول تقسیم‌بندی (جدول ۱) برای لقاح  
مجدد و تشکیل نسل دوم کنار هم قرار داده شدند. در نسل  
دوم نیز، همان روند نگهداری در دوران بارداری، زایمان،  
شیردهی و جداسازی پس از تولد همانند نسل قبل انجام  
شد. نهایتاً، در روز شصتم زندگی نسل دوم، آزمون رفتاری  
ماز بارنز مطابق پروتکل بر روی آنها به اجرا درآمد.

۴EDTA، mM ۱/۰، درصد سدیم آزید، ۲ درصد آلبومین سرم گاوی، ۲ درصد Triton-X1۰۰، ۱/۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پیستاتین A) به نسبت بیست برابر حجم وزن بافت (mg) هموژن‌سازی شد. هموژن حاصل در سرعت  $14,000 \times g$  به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محلول سوپرناتانت رویی جدا شده و مقدار پروتئین BDNF در هر نمونه اندازه‌گیری شده و با استفاده از ELISA تحلیل شد. سپس سطح BDNF به وزن بافت مرطوب طبیعی‌سازی شد.

### آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری استاندارد تحلیل واریانس یک‌طرفه و دوطرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی تست Tukey's در نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۱۰ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. انتخاب حیوانات در هر گروه به شکل تصادفی و با تعداد برابر انجام شد تا امکان سوگیری حداقل شود. نتایج هر حیوان به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار میانگین (SEM) گزارش شد و اختلاف‌های بین گروه‌ها با سطح معنی‌داری  $P < 0.05$  به‌عنوان تفاوت آماری معتبر محسوب گردید.

### یافته‌ها

#### آزمون یادگیری فضایی

در فاز یادگیری، موش‌های صحرایی به مدت ۵ روز آموزش دیدند (تصویر ۱). آنالیز آماری آنوای دوطرفه نشان می‌دهد که زمان تاخیر اولیه در نسل اول در بین گروه‌ها اختلاف معنی‌دار ندارند [Interactions:  $F(8, 108) = 1/82, P = 0.08$ ]. با توجه به نتایج آزمون ANOVA دوطرفه، هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده نگردید ( $P < 0.05$ ). برای مقایسه‌های دقیق‌تر، از آزمون‌های تعقیبی استفاده شد که در برخی مقایسات تفاوت‌های معنی‌دار مشاهده گردید. آزمون تعقیبی تست توکی بر داده‌های زمان تاخیر در نسل اول در روزهای چهارم و پنجم، اختلاف معنی‌داری بین گروه والد ماده ترک مورفین و کنترل نشان داد (میزان P به ترتیب: ۰.۰۰۰۷ و ۰.۰۰۰۲). (تصویر ۱الف). آنالیز آماری آنوای دوطرفه نشان می‌دهد که تعداد خطاهای اولیه در نسل اول در بین گروه‌ها اختلاف معنی‌دار دارند [Interactions:  $F(8, 108) = 4/47, P = 0.001$ ]. آزمون تعقیبی تست توکی بر داده‌های تعداد خطاهای اولیه در نسل اول در روز سوم، اختلاف معنی‌داری بین گروه والد نر ترک مورفین و کنترل نشان داد ( $P < 0.03$ ). همچنین اختلاف معنی‌داری بین گروه والد ماده ترک مورفین و کنترل در روز پنجم وجود دارد ( $P > 0.01$ ). (تصویر ۱ب). در نسل دوم، آنالیز آماری آنوای دوطرفه بر روی داده‌های زمان تاخیر اولیه در بین گروه‌ها انجام شد [Interactions:  $F(8, 135) = 2/12, P = 0.04$ ]. آزمون

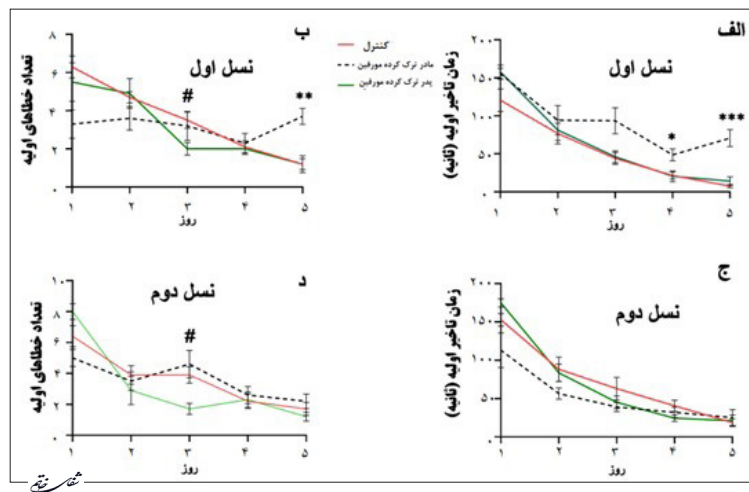
۱- مرحله آشنایی: در روز قبل انجام تست، هر حیوان برای کاهش استرس به مدت ۲ دقیقه در جعبه فرار قرار گرفت و سپس به قفس برگردانده شد. ۲- مرحله آموزش: در روزهای ۱ تا ۵ هر حیوان به طور روزانه در مرکز ماز قرار گرفت و با روشی محیط تحریک شد تا محل فرار را پیدا کند. هر روز دو تکرار آزمایش (هر بار حداکثر ۲ دقیقه) اجرا شد و زمان رسیدن به جعبه فرار، تعداد اشتباه (ورود به سوراخ اشتباه)، و سرعت ثبت شد. اگر موش جعبه فرار را پیدا نمی‌کرد، بصورت دستی موش را در جعبه فرار داده و ۳۰ ثانیه نگه می‌داشتیم تا فرایند یادگیری صورت گیرد. بین مراحل، سطح صفحه با الکل پاک می‌شد تا از اثر بویایی جلوگیری شود. ۱- مرحله آزمون حافظه: بعد از تکمیل آموزش، در روز ۶م محل فرار حذف شد و توانایی حیوان در یادآوری مسیر و نشانه‌های محیطی سنجیده شد. اگر حیوان در زمان مشخص ۹۰ ثانیه به محل نرسد، بیشترین زمان ثبت می‌شود. کل دوره تست رفتاری با دوربین ضبط و در نرم‌افزار Etho Vision XT مورد آنالیز قرار گرفت. متغیرهای اندازه‌گیری و آنالیز شده شامل این موارد می‌باشد: زمانی است که موش در طی پنج روز یادگیری اولین بار به جعبه فرار می‌رسد (زمان تاخیر اولیه). تعداد خطاهایی که موش قبل از پیدا کردن جعبه فرار در طی پنج روز یادگیری داشته است و سوراخ‌های اشتباه را چک کرده است (تعداد خطاهای اولیه). زمانی که موش در روز ششم به محل سوراخ جعبه فرار می‌رسد (کل زمان تاخیر). تعداد خطاهایی که موش قبل از پیدا کردن محل سوراخ جعبه فرار در روز ششم داشته و سوراخ‌های دیگر را چک می‌کند (تعداد کل خطاها). کشتن حیوانات، نمونه برداری از مغز و اندازه‌گیری میزان پروتئین BDNF مغزی پس از انجام تست‌های رفتاری در روز ششم تست ماز بارنز، نمونه هیپوکامپ مغزی موش‌ها جدا سازی شد (تعداد ۵ سر موش در هر گروه استفاده شد). برای این منظور، ابتدا دوز بالایی از کتامین ۱۲۰ میلی‌گرم و زایلازین ۲۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم از وزن حیوانات به صورت داخل صفاقی تزریق و حیوان کاملاً بیهوش شد، سپس یوتانزی حیوانات از طریق اوردوز کردن با کتامین با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم انجام شد. سر موش‌ها جداسازی شده و مغزهای آن‌ها به سرعت برداشته شد و ناحیه هیپوکامپ مغزی جداسازی شد. نمونه‌ها به سرعت به فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. سطح پروتئین BDNF با استفاده از کیت ELISA تجاری (شرکت پادگین طب، ایران) اندازه‌گیری شد. بافت در بافر لیزکننده (۱۰۰ mM Tris، ۷۰ pH، ۱۰۰ mM NaCl)

که در نسل اول، هر دو گروه فرزند والد ترک مورفین به‌طور معنی‌داری کل زمان تاخیر بالاتر و تعداد کل خطاهای بیشتری نسبت به کنترل داشتند ( $P < 0/001$ ). این تفاوت‌ها در تصویر ۲ الف و ب با نمودار ستونی و علامت‌های آماری مشخص شده است. در نسل دوم، روند اختلال حافظه فضایی در روز تست حافظه، همچنان در هر دو گروه فرزند والد ترک مورفین نسبت به کنترل مشاهده شد، ولی تفاوت گروه‌ها با کنترل معنی‌دار نبود ( $P < 0/05$ ). به منظور مقایسه بین نسلی، آزمون آنوای دوطرفه بین گروه‌های دو نسل اول و دوم انجام شد که نتایج نشان می‌دهند که میزان تعداد کل خطاها در نسل دوم در هر دو گروه فرزند والد ترک مورفین با همان گروه‌ها در نسل اول اختلاف معنی‌داری دارد ( $P < 0/001$ ). همچنین، نتایج نشان داد که میزان کل زمان تاخیر در نسل دوم در گروه فرزند والد ماده ترک مورفین با همان گروه در نسل اول اختلاف معنی‌داری دارد ( $P < 0/01$ ). و مشابهاً میزان کل زمان تاخیر در نسل دوم در گروه فرزند والد نر ترک مورفین با همان گروه در نسل اول اختلاف معنی‌داری دارد ( $P < 0/001$ ). (تصویر ۲).

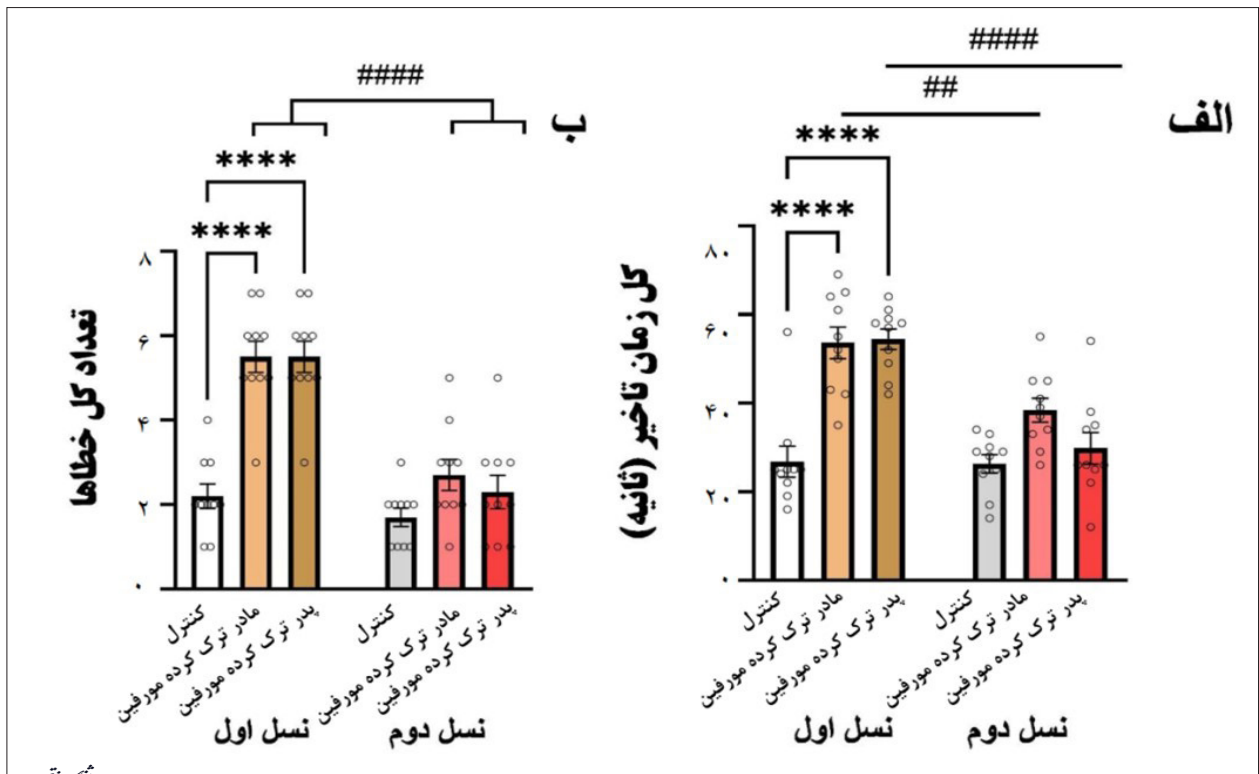
تعقیبی تست توکی بر داده‌های زمان تاخیر در نسل دوم اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها در روزهای یادگیری نشان نداد ( $P < 0/05$ ). (تصویر ۱ج). در ادامه آنالیز آماری آنوای دوطرفه نشان می‌دهد که تعداد خطاهای اولیه در نسل دوم در بین گروه‌ها اختلاف معنی‌دار دارند [Interactions:  $F(8, 135) = 3/57, P < 0/009$ ]. آزمون تعقیبی تست توکی بر داده‌های تعداد خطاهای اولیه در نسل اول در روز سوم، اختلاف معنی‌داری بین گروه والد نر ترک مورفین و کنترل نشان داد ( $P = 0/03$ ) و همچنین اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های والد نر ترک مورفین و والد ماده ترک مورفین وجود دارد ( $P = 0/001$ ) (تصویر ۱د، در تصویر نشان داده نشده است).

### آزمون حافظه فضایی

در مرحله بعد و در روز ششم آزمون حافظه فضایی بر روی موش‌های صحرائی انجام شد. شاخص‌های کل زمان رسیدن به محل جعبه فرار (کل زمان تاخیر) و تعداد کل خطاها در هر دو نسل اول و دوم ثبت شد. تحلیل واریانس یک طرفه داده‌ها (ANOVA) نشان می‌دهد



**تصویر ۱- نمودارهای روزهای یادگیری فضایی در ماز بارنز در گروه‌های مورد آزمایش. الف) زمان تاخیر اولیه در نسل اول (ثانیه). ب) تعداد خطاهای اولیه در نسل اول. ج) زمان تاخیر اولیه در نسل دوم (ثانیه). د) تعداد خطاهای اولیه در نسل دوم. داده‌ها به‌صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار میانگین نشان داده شده‌اند. \*  $P < 0/05$ , \*\*  $P < 0/01$ , \*\*\*  $P < 0/001$  مقایسه گروه والد ماده ترک مورفین نسبت به گروه کنترل در روز مشخص شده می‌باشد. #  $P < 0/05$  مقایسه گروه والد نر ترک مورفین نسبت به گروه کنترل در روز مشخص شده می‌باشد.**

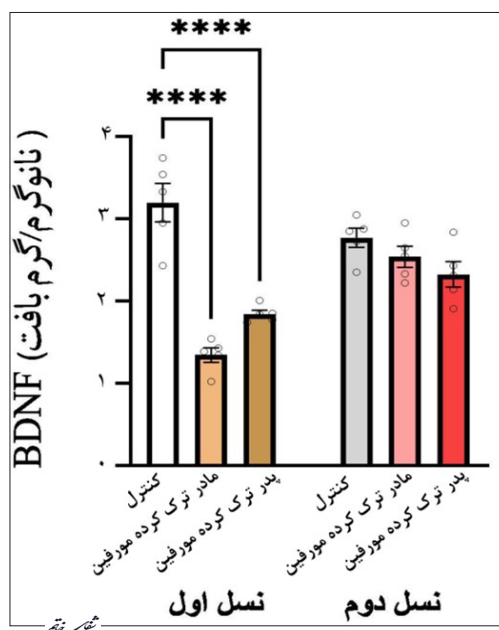


تصویر ۲- نمودار روز حافظه فضایی در ماز بارنز در در گروه های مورد آزمایش. الف) کل زمان تاخیر در نسل اول و دوم (ثانیه). ب) تعداد کل خطاها در نسل اول و دوم. داده های به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار میانگین نشان داده شده اند.  $***P < 0.001$  مقایسه نسبت به گروه کنترل در همان نسل می باشد.  $###P < 0.01$  و  $####P < 0.001$  مقایسه نسبت به گروه مشابه در نسل اول می باشد

پروتئین BDNF مشاهده نشد و تفاوت معنی داری با گروه کنترل وجود نداشت ( $P < 0.05$ ). به منظور مقایسه بین نسلی، آزمون آنوای دوطرفه بین گروه های دو نسل اول و دوم انجام شد که نتایج نشان می دهند که میزان پروتئین BDNF هیپوکمپی در نسل دوم در هر دو گروه فرزند والد ترک مورفین با همان گروه ها در نسل اول اختلاف معنی داری ندارد ( $P < 0.05$ ).

#### میزان پروتئین BDNF هیپوکمپی

آنالیز نتایج نشان داد که میزان پروتئین BDNF در نسل اول موش ها در گروه های فرزند والدین ترک مورفین نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافته بود ( $P < 0.001$ ). که این کاهش در نسل اول نشان دهنده اثرات منفی ترک مورفین والدین بر عملکرد حافظه فضایی و یادگیری فرزندان است (تصویر ۳). در مقابل، در نسل دوم، این کاهش در سطح



تصویر ۳- میزان پروتئین BDNF هیپوکمپی در نسل اول و دوم در گروه های فرزند والدین ترک مورفین و گروه کنترل. داده ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار میانگین نشان داده شده اند.  $***P < 0.001$  مقایسه نسبت به گروه کنترل در همان نسل می باشد

## بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن است که ترک مورفین در والدین منجر به اختلالات معنی‌دار در حافظه فضایی و یادگیری نسل‌های بعدی شده است؛ به‌ویژه در نسل اول، شاخص‌های عملکردی مانند زمان تاخیر و تعداد خطاها در گروه‌های فرزند والد ترک‌کرده مورفین به طور معنی‌داری نسبت به کنترل بالا بود، در حالی که این اثرات در نسل دوم کمتر و از نظر آماری معنی‌دار نبود. این یافته‌ها با مطالعات اخیر همسو است که اثرات بین‌نسلی<sup>۳</sup> مواجهه با مواد را بر عملکردهای شناختی، حافظه کاری و حافظه فضایی در فرزندان نشان داده‌اند (۱۶-۱۴).

تحقیقات گذشته نشان داده‌اند که مواجهه والدین با مورفین، به‌خصوص در دوره‌های حساس رشد مغز، باعث نقص بلندمدت در حافظه و فرآیند یادگیری فرزندان می‌شود و این نتایج عمدتاً با تست‌هایی مانند ماز آبی موریس و ماز بارنز بررسی شده‌اند. مکانیسم‌های زمینه‌ای مربوط به اختلال شناختی ناشی از ترک مورفین شامل تغییرات نوروبیولوژیک در هیپوکامپ، افزایش استرس نوروشیمیایی، و تغییرات در بیان ژن‌های مرتبط با پلاستیسیته سیناپسی است (۱۷، ۱۵). در پژوهش حاضر نیز همین روند در بررسی‌های رفتاری حافظه و بررسی پروتئین BDNF مغزی دیده شد و داده‌ها نشان داد که اثر مخرب ترک مورفین والدین بر حافظه فضایی نسل اول قوی‌تر بوده و در نسل دوم تضعیف شده است. توجیه احتمالی این اختلاف، وجود سازوکارهای جبرانی و یا تسهیل تطابق زیستی در نسل‌های بعدی است که نیازمند مطالعات مولکولی و رفتاری بیشتر می‌باشد. شواهد گسترده‌ای حاکی از این است که BDNF نقش محوری در پشتیبانی از پلاستیسیته سیناپسی، یادگیری و حافظه فضایی دارد. به‌عنوان مثال، در مطالعه‌ای نشان داده شده است که تزریق BDNF به هیپوکامپ می‌تواند از کاهش عملکرد حافظه در شرایط استرس مزمن جلوگیری کند (۱۸). همچنین در مدل‌های وابستگی به اپیوئید، مصرف مزمن و ترک مورفین موجب تغییر در بیان BDNF در مناطق مختلف مغز می‌شود (۱۹، ۳). بنابراین، کاهش معنی‌دار BDNF هیپوکامپی مشاهده شده در نسل اول فرزندان والدینی که ترک مورفین کردند، با اختلال رفتار یادگیری و حافظه فضایی سازگار است و می‌تواند مکانیسم مولکولی زیر بنای این اختلالات باشد. از سوی دیگر، عدم مشاهده کاهش BDNF در نسل دوم ممکن است نشان‌دهنده پدیده

سازگاری یا جبران زیستی<sup>۴</sup> در نسل‌های بعدی باشد، پدیده‌ای که در مطالعات آینده می‌تواند با تمرکز بر تنظیم بیان BDNF در مسیرهای اپی‌ژنتیک بررسی شود. همچنین در مطالعه حاضر، بین دو گروه نسل اول فرزندان دارای والد مادر ترک مورفین و والد پدر ترک مورفین، ضعیف تری نسبت به گروه کنترل شده بودند که اهمیت والد ماده را نشان می‌دهد. احتمالاً والد ماده در نسل اول نقش مهم‌تری دارد چرا که بخش شیردهی و پرستاری نوزادان به عهده والد ماده می‌باشد. مطالعات نشان داده‌اند که نقش والد ماده (مادر) در انتقال اثرات مواد مخدر و رفتارهای شناختی فرزندان مهم‌تر است و جدایی از مادر پس از تولد با افزایش میزان مرگ و میر نوزادان همراه است. همچنین شواهدی وجود دارد که در نسل دوم اثرات هر دو والد در انتقال این پیامدها و رفتارها موثر است و تفاوت میان اثر مادر و پدر کاهش می‌یابد. به عنوان مثال، مطالعه احمدیان مقدم و همکاران به طور خاص اهمیت نقش مادر در اختلال حافظه و رفتار فرزندان را تأیید می‌کند و نقش هر دو والد را در نسل‌های بعدی مورد ارزیابی قرار می‌دهد (۲۱، ۲۰). در این بررسی، برای حذف این مورد پرستاری نوزادان، بایستی حیوانات را پس از تولد از والد مادر جدا می‌کردیم که این عامل سبب افزایش مرگ و میر در نوزادان می‌شد و به همین دلیل برای حذف فاکتور اثر شیردهی و پرستاری مادر بر نوزادان، نسل دوم مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به داده‌های حاضر، مشخص شد که در مسیر یادگیری در نسل دوم والد ماده و نه هر دو نقش مهمی دارند و حتی آنالیز آماری داده‌ها نشان می‌دهد که والد نر هم موثر است در مجموع، این یافته‌ها اهمیت توجه به پیامدهای شناختی رفتارهای مصرف و ترک مواد در والدین را برجسته می‌کند، چراکه اختلالات حافظه و یادگیری می‌تواند به شکل پایدار و بین‌نسلی بر سلامت روانی و اجتماعی نسل‌های بعد اثرگذار باشد. همچنین، این نتایج از اهمیت BDNF به‌عنوان بیومارکر بالقوه‌ای برای پیامدهای بین‌نسلی اعتیاد به مورفین حمایت می‌کنند. مطالعات آینده باید به روشن شدن دقیق‌تر مکانیسم‌های سلولی و مولکولی و نیز بررسی مداخلات جبرانی مانند فعالیت بدنی و تغذیه بپردازند.

## تقدیر و تشکر

این کار با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تهران (شماره گرنت: ۶۷۵۸۸-۱۱۳-۲-۱۴۰۲) انجام شده است.

<sup>3</sup> Intergenerational

<sup>4</sup> Compensatory adaptation

1. Vassoler FM, Wimmer ME. Consequences of Parental Opioid Exposure on Neurophysiology, Behavior, and Health in the Next Generations. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2021; 11(10).
2. Wen X, Lawal OD, Belviso N, Matson KL, Wang S, Quilliam BJ, et al. Association Between Prenatal Opioid Exposure and Neurodevelopmental Outcomes in Early Childhood: A Retrospective Cohort Study. *Drug Saf.* 2021; 44(8): 863-75.
3. Akbarabadi A, Sadat-Shirazi MS, Kabbaj M, Nouri Zadeh-Tehrani S, Khalifeh S, Pirri F, et al. Effects of Morphine and Maternal Care on Behaviors and Protein Expression of Male Offspring. *Neuroscience.* 2021; 466: 58-76.
4. Soltani H, Sadat-Shirazi MS, Pakpour B, Ashabi G, Zarrindast MR. Toxic effect of calcium/calmodulin kinase II on anxiety behavior, neuronal firing and plasticity in the male offspring of morphine-abstinent rats. *Behav Brain Res.* 2020; 395: 112877.
5. 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.
6. Ashabi G, Matloob M, Monfared Neirizi N, Behrouzi M, Safarzadeh M, Rajabpoor Dehdashti A, et al. Activation of D1-like dopamine receptors is involved in the impairment of spatial memory in the offspring of morphine-abstinent rats. *Neurosci Res.* 2020; 158: 37-46.
7. Schindler CJ, Slamberova R, Vathy I. Prenatal morphine exposure decreases susceptibility of adult male rat offspring to bicuculline seizures. *Brain Res.* 2001; 922(2): 305-9.
8. Wu PL, Suen JL, Yang CH, Kuo KC, Yang YSH, Yang SN. Enhanced H3K4 Trimethylation in TNF-alpha Promoter Gene Locus with Cell Apoptosis in the Ventral-Medial Striatum following Opioid Withdrawal of Neonatal Rat Offspring from Morphine-Addicted Mothers. *Mediators Inflamm.* 2021; 2021: 9828.
9. Yang SN, Huang LT, Wang CL, Chen WF, Yang CH, Lin SZ, et al. Prenatal administration of morphine decreases CREBSerine-133 phosphorylation and synaptic plasticity range mediated by glutamatergic transmission in the hippocampal CA1 area of cognitive-deficient rat offspring. *Hippocampus.* 2003;13(8): 915-21.
10. Gilardi F, Augsburger M, Thomas A. Will Widespread Synthetic Opioid Consumption Induce Epigenetic Consequences in Future Generations? *Front Pharmacol.* 2018; 9: 702.
11. Dunn KE, Bird HE, Bergeria CL, Ware OD, Strain EC, Huhn AS. Operational definition of precipitated opioid withdrawal. *Front Psychiatry.* 2023; 14: 1141980.
12. Sadat-Shirazi MS, Monfared Neirizi N, Matloob M, Safarzadeh M, Behrouzi M, Rajabpoor Dehdashti A, et al. Possible involvement of nucleus accumbens D1-like dopamine receptors in the morphine-induced condition place preference in the offspring of morphine abstinent rats. *Life Sci.* 2019; 233: 116712.
13. Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 1979; 93(1): 74-104.
14. Alipour V, Shojaei A, Rezaei M, Mirnajafi-Zadeh J, Azizi H. Intergenerational consequences of adolescent morphine exposure on learning and memory. *Neurosci Lett.* 2023; 808: 137303.
15. Saberi Moghadam A, Sepehri G, Sheibani V, Haghpanah T, Divsalar K, Hajzadeh MA, et al. The Effect of Opium Dependency of Parent (s) on Offspring's Spatial Learning & Memory in Adult Male Rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2013; 16(5): 694-9.
16. Ferrante JR, Blendy JA. Advances in animal models of prenatal opioid exposure. *Trends Neurosci.* 2024; 47(5): 367-82.
17. Tolomeo S, Davey F, Steele JD, Baldacchino AM. Effects of Opioid Dependence on Visuospatial Memory and Its Associations With Depression and Anxiety. *Front Psychiatry.* 2019; 10: 743.
18. Radecki DT, Brown LM, Martinez J, Teyler TJ. BDNF protects against stress-induced impairments in spatial learning and memory and LTP. *Hippocampus.* 2005; 15(2): 246-53.
19. Rohbani K, Sabzevari S, Sadat-Shirazi MS, Nouri Zadeh-Tehrani S, Ashabi G, Khalifeh S, et al. Parental morphine exposure affects repetitive grooming actions and marble burying behavior in the offspring: Potential relevance for obsessive-compulsive like behavior. *Eur J Pharmacol.* 2019; 865: 172757.
20. Ahmadian-Moghadam H, Sadat-Shirazi MS,

Seifi F, Niknamfar S, Akbarabadi A, Toolee H, et al. Transgenerational influence of parental morphine exposure on pain perception, anxiety-like behavior and passive avoidance memory among male and female offspring of Wistar rats. *EXCLI J.* 2019; 18: 1019-36.

21. Nyberg H, Bogen IL, Nygaard E, Achterberg M, Andersen JM. Maternal exposure to buprenorphine, but not methadone, during pregnancy reduces social play behavior across two generations of offspring. *Psychopharmacology (Berl).* 2025; 242(3): 663-80.