

## تأثیر مصرف خوراکی مورفین در دوران بارداری بر تکامل عضو زبان جنین موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نژاد ویستار

مینا رمضانی<sup>1</sup>؛ وحید حکیمی گیلانی<sup>2</sup>؛ هاله عاملی<sup>2</sup>؛ حسین بهادران<sup>3</sup>؛ هدایت صحرائی<sup>4\*</sup>

### چکیده

زمینه: مصرف مورفین در دوران بارداری می‌تواند باعث ایجاد نقص و تأخیر در تکامل دستگاه عصبی جنین شود. در این مطالعه، تکامل زبان جنین موش‌های بارداری که در دوران بارداری، مورفین خوراکی دریافت کرده بودند مورد بررسی قرار گرفته است.

روش‌ها: موش‌های ماده نژاد ویستار (300-250 گرم)، پس از بارداری به‌طور تصادفی به گروه‌های شاهد و آزمایش تقسیم شدند. گروه شاهد، آب شرب شهری و گروه آزمایش، آب حاوی مورفین (0/05mg/ml) دریافت کردند. در روز 19 بارداری، موش‌ها با تجویز دوز بالای کلروفوم کشته شده و جنین‌ها از بدن حیوان خارج و در فرمالین 10 درصد فیکس شدند. در ضمن خون موش‌ها برای تعیین سطح کورتیکوسترون، مورد استفاده قرار گرفت. وزن و طول جنین‌ها اندازه‌گیری شد و سپس مغز حیوانات را درآورده و مراحل پردازش بافتی، برش‌گیری و رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین-ائوزین انجام شد. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری و نرم‌افزار موتیک مورد بررسی قرار گرفتند و نیز شمارش سلول‌ها در آن‌ها انجام شد. اطلاعات با روش آزمون تی غیرمزدوج مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: تفاوت معناداری در سطح کورتیکوسترون پلاسما و طول و وزن جنین‌ها در گروه آزمایش و شاهد دیده نشد. قطر بزرگ زبان در گروه آزمایش، کاهش اما قطر کوچک زبان در دو گروه تفاوتی نداشت. تعداد سلول‌های زبان در گروه آزمایش، افزایش اما اندازه آن‌ها کاهش یافته بود.

نتیجه‌گیری: کاهش قطر بزرگ زبان و افزایش تعداد و کاهش اندازه سلول‌ها، نشان‌دهنده تأثیر تجویز مورفین در دوران بارداری بر نقص در تکوین زبان در جنین‌ها می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: تکامل زبان، مورفین، موش بزرگ آزمایشگاهی

«دریافت: 1388/11/9 پذیرش: 1389/2/28»

1. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آشتیان

2. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران

3. گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات علوم رفتاری، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

4. گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

\*عهده‌دار مکاتبات: نیاوران، سه راه اراج، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج).

صندوق پستی: 19395-6558، تلفاکس: 021-26127257.

Email: h.sahraei@bmsu.ac.ir

### مقدمه

بیرونی هستند، نقش اساسی و مهم را ایفا می‌کنند (1). در این میان، سیستم چشایی با ایجاد ارتباط بین محرک‌های خارجی مرتبط با تغذیه و دستگاه عصبی و به‌طور موازی ایجاد ارتباط با سایر سیستم‌های حسی، به‌خصوص حس

همه موجودات زنده برای زنده ماندن نیاز به برقراری ارتباط با محیط اطراف دارند. برای ایجاد این ارتباط، اندام‌های حسی به‌دلیل این‌که گیرنده‌های تحریکات

گرم، خریداری شده از انستیتو پاستور ایران) مورد استفاده قرار گرفتند (دو موش در هر قفس). حیوانات در درجه حرارت محیط ( $24 \pm 1$  درجه سانتیگراد) با دوره نوری 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی نگهداری شدند. 24 ساعت بعد از جفت شدن حیوانات با موش‌های نر و حصول اطمینان از بارداری (مشاهده اسپرم در گسترش واژنی)، موش‌های نر جدا شده و روز صفر بارداری (روز صفر جنینی - E0) تعیین شد. سپس موش‌های باردار به دو گروه شاهد و آزمایش تقسیم شدند. گروه شاهد در مدت تیمار، آب شرب شهری و گروه آزمایش، آب شرب شهری حاوی مورفین ( $0/05 \text{mg/ml}$ ) دریافت کردند (4).

در روز 19 بارداری موش‌ها با استفاده از دوز بالای کلروفرم کشته شده و جنین آن‌ها به همراه رحم، توسط جراحی از بدن خارج شد. نمونه‌های خونی از موش‌های گروه آزمایش، جمع‌آوری و در لوله‌های اپندورف حاوی  $0/1 \text{cc}$  سیرتات سدیم 5 درصد به مدت یک‌ماه در فریزر در دمای  $-20$  درجه نگهداری شدند. سپس این نمونه‌ها پس از گرم شدن، در دور 3000 به مدت 5 دقیقه در سانتریفوژ یخچال‌دار در دمای 4 درجه سانتریفوژ شده و محلول رویی آن‌ها برای سنجش غلظت کورتیکوسترون پلاسما با استفاده از کیت الایزای کورتیکوسترون رت مورد استفاده قرار گرفت. جنین‌ها به مدت یک‌ماه در محلول فرمالین 10 درصد فیکس شدند. سپس جنین‌ها از رحم جدا و وزن آن‌ها به وسیله ترازوی دیجیتال با دقت  $0/0001$  گرم و طول سری-دمی آن‌ها به عنوان معیاری از طول جنین با کولیس با دقت  $0/05$  میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

سر جنین‌ها جدا و به صورتی در داخل پارافین قرار گرفت که پوزه جنین در زاویه 90 درجه نسبت به خط افق قرار داشت. پس از گذراندن مرحله پردازش بافتی و تهیه برش‌هایی با ضخامت 5 میکرون، به روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی شدند (8). سپس نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده به وسیله میکروسکوپ نوری متصل به رایانه و نرم‌افزار موتیک مورد بررسی قرار

بویایی و نیز عصب سه قلو، نقش مهمی را در حفظ حیات موجود زنده بازی می‌کند (2). در این میان، زبان به دلیل قرار گرفتن گیرنده‌های حس چشایی، نقش ویژه را در عملکرد صحیح این حس بازی می‌کند و تکامل صحیح آن اثر مهمی را در بهبود عملکرد حس چشایی در آینده دارد (2). اگر در هنگام تکامل زبان (در زندگی جنینی)، جنین در معرض مواد خارجی غیرطبیعی قرار بگیرد ممکن است دچار نقص و یا تأخیر در تکوین زبان و در نتیجه عملکرد غیرطبیعی سیستم چشایی شود. یکی از موادی که می‌تواند به راحتی از سد جفت عبور کرده و به جنین برسد، مورفین است (3). پژوهش‌های قبلی ثابت کرده‌اند که مصرف مورفین می‌تواند باعث ایجاد تأخیر در تکامل صفحه عصبی (4)، لوله عصبی (5) و قشر مخ (6) در جنین موش‌های بزرگ آزمایشگاهی شود. با توجه به این‌که در جوامع انسانی به خصوص کشور ما مشکل مصرف مواد مخدر حاوی مورفین (مانند هروئین یا تریاک) نسبتاً شایع است (7)، به نظر می‌رسد که عوارض مصرف این‌گونه داروها علاوه بر آن‌که متوجه فرد می‌باشد، به فرزندان و خانواده فرد ضرر می‌رساند. با توجه به این‌که همسران باردار این‌گونه افراد به‌طور مستقیم در معرض دوزهای نسبتاً کم مورفین قرار دارند (استنشاق دود این مواد)، احتمال تأثیرپذیری جنین این مادران از دوزهای پایین مورفین بسیار زیاد است. همان‌طور که اشاره شد در تحقیقات قبلی تأثیر دوزهای کم مورفین بر تکوین بخش‌های متفاوت دستگاه عصبی در موش آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفته است. با توجه به اهمیت تکامل صحیح زبان در عملکرد طبیعی سیستم چشایی و حفظ بقای فرد و ارتقای زندگی او، پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر دوزهای کم مورفین خوراکی تجویز شده به موش‌های باردار بر تکوین زبان در جنین‌ها انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

در این آزمایش تعداد 20 سر موش ماده بزرگ آزمایشگاهی نژاد ویستار (با میانگین وزنی 250-300

دو قطر بلند و کوتاه است. قطر بلند زبان در گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد کاهش یافته اما قطر کوتاه تغییری نکرده بود. بر همین اساس مساحت زبان در گروه

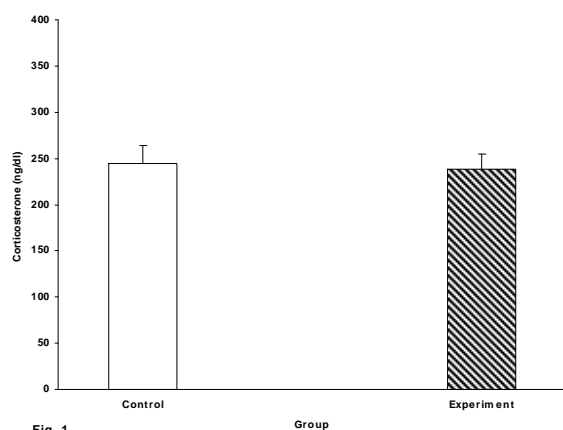


Fig. 1

تصویر 1- تغییرات غلظت کورتیکوسترون پلاسما در خون مادران باردار گروه کنترل و آزمایش در روز نوزدهم بارداری.

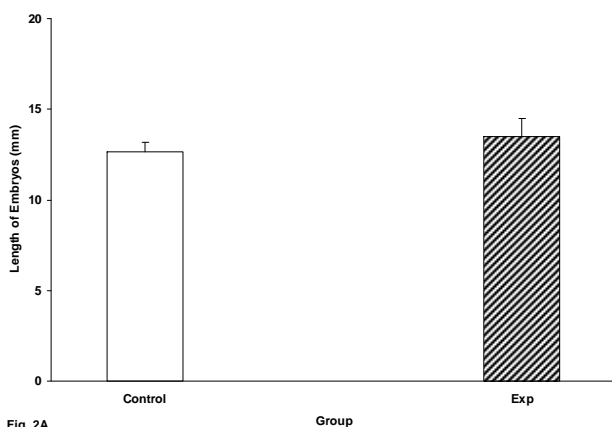


Fig. 2A

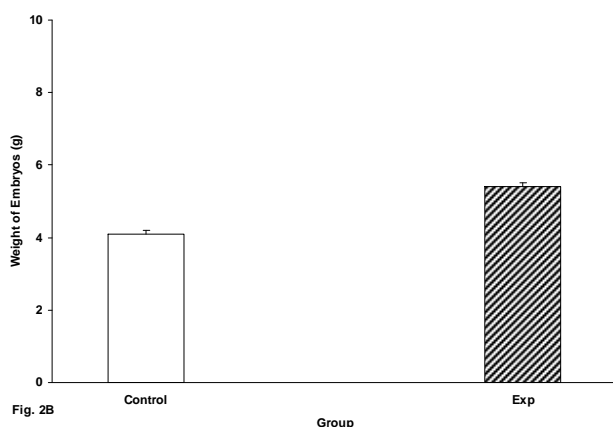


Fig. 2B

تصویر 2A و 2B: تغییرات اندازه طول سری-دمی (A) و وزن (B) جنین‌های گروه آزمایش و کنترل.

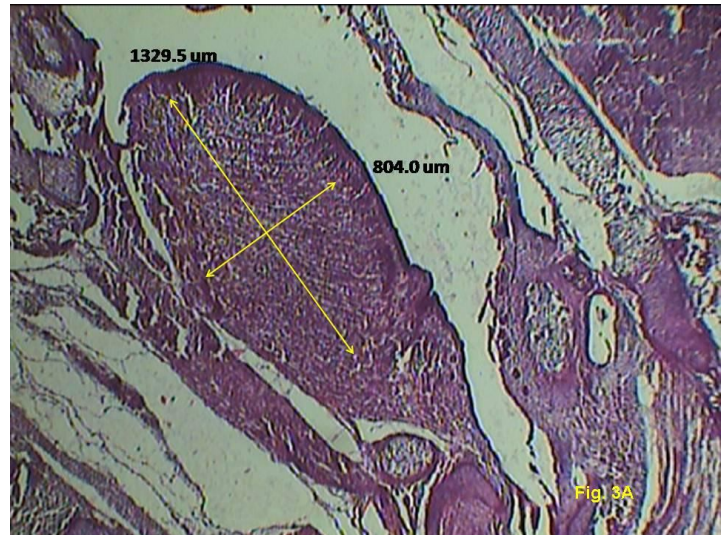
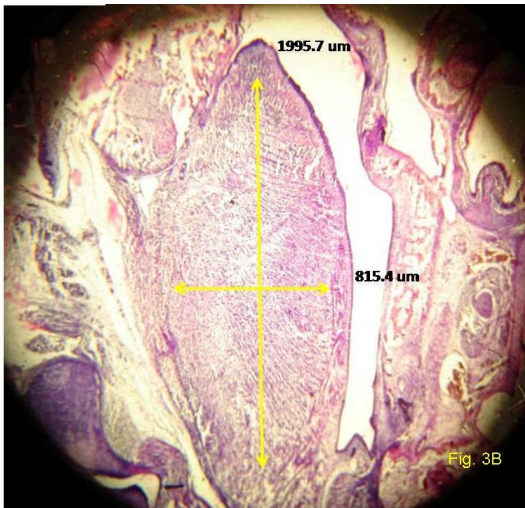
گرفتند. در این مطالعه طول و عرض عضله زبان مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور، برش‌هایی از عضله زبان که در فاصله 1 میلی‌متری از خط وسط فرق سر قرار داشت بررسی شد. طول و عرض عضله زبان از زیر ناحیه اپی‌تلیوم مورد سنجش قرار گرفت. در شمارش سلولی نیز تنها سلول‌های عضلانی مورد شمارش قرار گرفت. تعداد و مساحت سلول‌های زبان (با بزرگنمایی  $\times 1000$ ) مورد بررسی میکروسکوپی با میکروسکوپ نوری و نرم‌افزار موتیک قرار گرفت. لازم به توضیح است که این نرم‌افزار قادر به تعیین اندازه (طول) و مساحت تصاویر بر اساس بزرگنمایی مشخص شده می‌باشد. برای بررسی تعداد سلول‌ها از روش شمارش تصادفی (تعداد سلول‌ها در  $5$  مربع  $2 \times 2$  سانتی‌متری در یک مساحت  $10 \times 10$  سانتی‌متری) در تصاویری با بزرگنمایی  $\times 400$  استفاده شد. به این منظور پس از تثبیت تصویر و مربع بزرگ‌تر، تعداد سلول‌ها شمارش شد. برای محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS آزمون تی غیرمزدوج (Un-paired t-test) استفاده شد.

## یافته‌ها

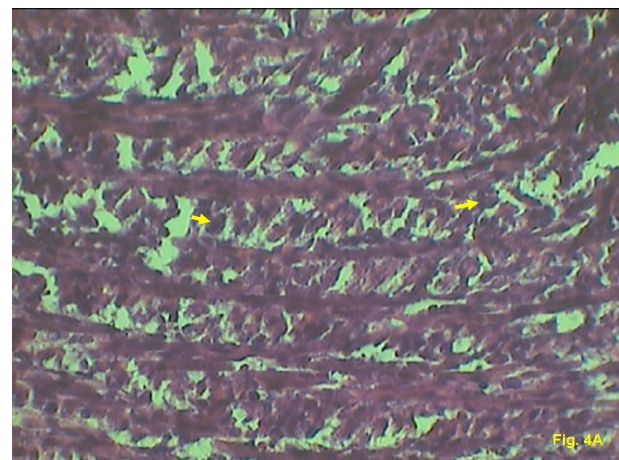
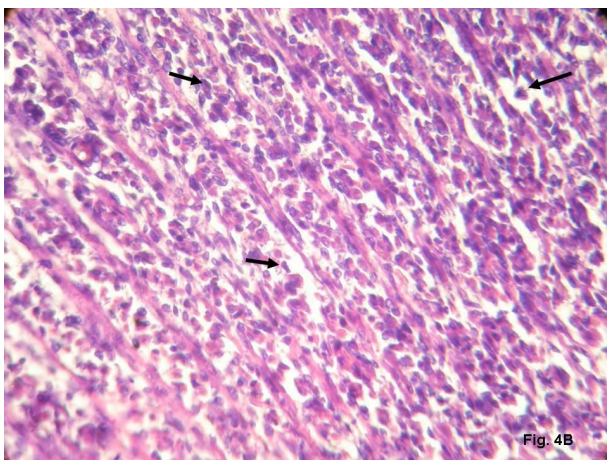
اندازه‌گیری سطح کورتیکوسترون پلاسما در گروه آزمایش با استفاده از روش الیزا در طول موج 450 نانومتر نشان داد که سطح این هورمون در خون حیوانات گروه شاهد، تقریباً مشابه سطح آن در گروه آزمایش بود ( $P > 0/05$ ) (تصویر 1).

بررسی ماکروسکوپی اندازه‌گیری طول و وزن جنین‌ها، شاخص‌های طول و وزن در حیوانات گروه شاهد و آزمایش نشان داد که وزن و طول جنین‌ها در گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد تفاوت معناداری نداشت ( $P > 0/05$ ) (تصویر 2A و 2B).

بررسی‌های میکروسکوپی نشان دادند که مساحت زبان در گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد کاهش معناداری را نشان می‌دهد. در بررسی برش‌های سهمی (ساجیتال) به‌صورت بیضوی، دیده شد که زبان دارای



تصویر 3A و 3B - تغییرات قطر بزرگ و کوچک زبان در گروه آزمایش (A) و کنترل (B).



تصویر 4A و 4B - تعداد سلول‌های زبان در گروه آزمایش (A) و کنترل (B).

تحقیقات قبلی، تجویز مورفین باعث کاهش معنادار وزن و اندازه طول جنین‌ها به‌عنوان معیارهای کمی رشد جنین نشد.

در تحقیق حاضر، تجویز مورفین باعث تغییر طول و وزن جنین‌ها در گروه آزمایش نشد که می‌تواند به معنای عدم توانایی مورفین در القای کاهش رشد جنین در گروه آزمایش باشد. در تحقیقات قبلی مشخص شده است که تجویز خوراکی مورفین باعث کاهش طول و وزن جنین‌ها در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی می‌گردد (5). مورفین با اتصال به مولکول‌های پروتئینی ویژه‌ای به نام

آزمایش نسبت به گروه شاهد کاهش معناداری یافته بود ( $P < 0/05$ ) (تصویر 3A و 3B). همچنین تعداد سلول‌های ناحیه زبان در گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد افزایش، ولی از نظر اندازه کاهش نشان می‌داد (تصویر 4A و 4B).

## بحث

نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر نشان می‌دهد که مصرف مورفین خوراکی در طی بارداری، می‌تواند منجر به تأخیر در تکامل سیستم چشایی شود. برخلاف

غلظت پلاسمایی کورتیکوسترون در موش‌های گروه آزمایش که مورفین دریافت کرده بودند نسبت به گروه شاهد تغییر معناداری را نشان نمی‌دهد. همچنین آزمایشات متعدد نشان داده‌اند که کورتیکوسترون، یک گلوکوکورتیکوئید مهم در جوندگان است که در پاسخ به استرس ترشح شده و برای عملکرد سیستم ایمنی و حفظ همئوستاز بدن، نقش اساسی را ایفا می‌کند (13). ایجاد هرگونه تغییر غیرطبیعی در میزان سطح کورتیکوسترون پلازما باعث ایجاد اختلال سیستم اندوکرین بدن می‌شود (14). آزمایش‌های قبلی نشان داده‌اند که القاء استرس باعث افزایش کورتیکوسترون موش‌های بارداری و در نتیجه بروز اختلال در رشد و نمو طبیعی دستگاه عصبی جنین این موش‌ها شده است (15). این عقب‌ماندگی رشدی در نواحی مختلف دستگاه عصبی از جمله سیستم لیمبیک (16)، دستگاه حرکتی و قشر مخ (17) گزارش شده است. وجود گیرنده‌های اویپوئیدی هم در هیپوتالاموس و هم بر روی کورتکس آدرنال در چندین آزمایش به اثبات رسیده است (18). ولی آزمایش‌ها نشان داده‌اند که جایگاه اصلی فعالیت مورفین بر روی کورتکس آدرنال است که باعث افزایش ترشح کورتیکوسترون از کورتکس آدرنال می‌شود (19). براساس مطالعات قبلی انجام‌شده، هرگونه افزایش در سطوح کورتیکوسترون پلاسمای خون مادر می‌تواند باعث افزایش بیشتر سطح این هورمون در جنین شود که این می‌تواند باعث ایجاد نقص و یا تأخیر در تکامل آن گردد. کورتیکوسترون دارای اثرات بسیار گسترده‌ای بر تکوین، تکثیر و مهاجرت سلول‌هاست. کورتیکوسترون باعث تکثیر بیش از حد سلول‌ها و اختلال در رشد آن‌ها می‌شود، همچنین این هورمون باعث به تأخیر افتادن مهاجرت سلول‌ها در طی تکامل جنین می‌شود (20). درحالی‌که در تحقیق ما خونی که از مادران بارداری در روز نوزدهم بارداری گرفته شد تغییر معناداری را در غلظت این هورمون‌ها بین گروه شاهد و آزمایش نشان نداد. به‌همین دلیل شاید به‌نظر برسد که مورفین در القاء

گیرنده‌های اویپوئیدی موجود بر روی غشاء سلولی، اثرات خود را اعمال می‌کند. این گیرنده‌ها دارای انواع متعددی هستند که مهم‌ترین آن‌ها شامل گیرنده‌های مو، دلتا و کاپا می‌باشند (9). این گیرنده‌ها پراکندگی زیادی در سلول‌های مختلف جنین دارند. مورفین به‌دلیل کوچکی و لیپوفیل بودن مولکول آن، به‌راحتی می‌تواند از سد جفتی عبور کرده و به جنین برسد و احتمالاً باعث ایجاد تغییرات در عملکرد سلول‌های آن شود (10). وجود گیرنده‌های اویپوئیدی بر روی جفت نیز به اثبات رسیده است ولی نقش آن‌ها هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است. تحقیقات قبلی نشان می‌دهند که مورفین با اثر بر گیرنده‌های اویپوئیدی جفت و انقباض عروق جفتی می‌تواند باعث کاهش خون‌رسانی به جنین و در نتیجه احتمالاً بروز نقص و تأخیر در تکامل تمام اندام‌های جنین شود (11). درحالی‌که حداقل در تحقیق حاضر، وزن و اندازه جنین‌های گروه آزمایش با گروه شاهد تفاوت معناداری نداشته است. در تحقیقات قبلی مشخص شده است که مصرف خوراکی مورفین، تکوین عقده‌های قاعده‌ای را در روزهای 12، 14 و 17 به تأخیر می‌اندازد (12) و همچنین باعث ایجاد نقص و تأخیر هم از نظر زمانی و هم از نظر ساختار بافتی در لوله صفحه عصبی و لوله عصبی می‌شود (4 و 5). محققان در توجیه اثر دیده‌شده از مورفین به این نکته تأکید کرده‌اند که ممکن است این اثر به‌دلیل تأثیر مستقیم مورفین بر گیرنده‌های اویپوئیدی موجود در غشاء سلول‌های جنین و یا جفت بوده است. ممکن است در تحقیق حاضر نیز همین اثر اعمال شده باشد. با این حال با توجه به میزان بسیار کم دوز مورفین از سویی و غیرفعال بودن گیرنده‌های اویپوئیدی جنین از سوی دیگر، به‌نظر می‌رسد که حداقل قسمتی از این توجیه چندان درست نباشد. آزمایشات متعدد نشان داده‌اند که مورفین توانایی القای ترشح کورتیکوسترون از قشر غده فوق کلیوی موش را دارد و این اثر بیشتر به دلیل تحریک گیرنده‌های اویپوئیدی موجود بر روی سلول‌های این غده است. نتایج ما نشان دادند که

با توجه به مطالب مذکور به نظر می‌رسد که مورفین در روزهای آغازین بارداری با ترشح کورتیکوسترون، اثر منفی خود را بر تکامل جنین القا میکند اما به دلیل بروز تحمل یا دلایل دیگر، این امر در روزهای پایانی بارداری فقط در نواحی حساس مانند دستگاه عصبی مرکزی به خوبی قابل مشاهده است.

### نتیجه‌گیری

تأثیر مورفین بر تکوین دستگاه عصبی، تأثیری همه‌جانبه است. با توجه به تحقیقات قبلی و پژوهش حاضر، خطر مصرف اپیوئیدها به خصوص مورفین، هرچند در دوزهای بسیار کم برای مادران باردار و جنین‌های آنها وجود دارد. توجه به این که بیشترین داروی مصرفی در کشور ما استامینوفن کدئین است و کدئین در بدن، تبدیل به مورفین شده و اثرات خود را القاء می‌کند این نکته مهم بیشتر برجسته می‌شود.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) انجام شد.

ترشح کورتیکوسترون در آزمایش ما ناتوان بوده است. اما 3 دلیل برای توجیه این عدم تفاوت وجود دارد: اول آن که مادران باردار در معرض دوز بالای کلروفورم کشته می‌شدند که این افزایش می‌تواند منجر به افزایش کورتیکوسترون در هر دو گروه شده، به نحوی که تأثیر مورفین در القای ترشح کورتیکوسترون پوشیده شده باشد. دلیل دوم آن است که در روزهای پایانی بارداری، ترشح کورتیکوسترون هم توسط مادر و هم توسط جفت و هم توسط قشر غده فوق کلیه افزایش می‌یابد تا تکامل نهایی برخی دستگاه‌های حیاتی بدن مانند ریه‌ها انجام گیرد. به همین دلیل ممکن است تأثیر مورفین پوشیده شده باشد. دلیل سوم آن است که ممکن است که در غده فوق کلیه مادر و جنین و یا در جفت، نسبت به اثر مورفین، نوعی تحمل به وجود آمده باشد. به هر حال تحمل به اثرات مختلف مورفین، امری شناخته شده است و ممکن است در آزمایش ما این تحمل صورت گرفته باشد. بایستی در نظر داشت که تحریک ترشح کورتیکوسترون توسط مورفین در موش‌های باردار در روزهای 12، 13 و 14 بارداری دیده شده است و ممکن است کاهش این اثرات منطبق با توجیه آخر که همانا القای تحمل به اثرات مورفین است صحیح باشد.

### References

- Kardong K. Vertebrate comparative anatomy function evolution. Mc Graw Hill 2002; 762.
- Lundy RF Jr, Norgren R. Gustatory. In: Paxinos G. The Rat Nervous System. 1<sup>st</sup>ed. New York: Academic Press 1995; 891-921.
- Kopcky EA, Simone C, Knie B, Koren G. Transfer of morphine across the human placenta and its interaction with naloxone. Life Sci 1999; 65(22): 2359-71.
- Nasiraei-Moghadam S, Bahadoran H, Saeedabady S, Shams J, Sahraei H. [Oral administration of morphine delay neural plate development of rat embryos (Persian)]. Physiology and Pharmacology 2009; 12(4): 314-19.
- Nasiraei-Moghadam S, Sahraei H, Bahadoran H, Sadooghi M, Salimi SH, Kaka GR, et al. Effects of maternal oral morphine consumption on neural tube development in Wistar rats. Dev Brain Res 2005; 159(1): 12-7.
- Sadraie SH, Kaka GR, Sahraei H, Dashtnavard H, Bahadoran H, Mofid M, Mahdavi-Nasab H, Jafari F. Effects of maternal oral administration of morphine Sulfate on developing rat fetal cerebrum: a morphometrical evaluation. Brain Res 2008; 1245: 36-40.
- Iranian Drug Control Headquarter. [The Year Book of Iranian Drug Control Headquarter (Persian)]. 1<sup>st</sup>ed. Tehran: NAJA Publisher 2007; 12-3.
- Chan K, Lowe J. Techniques in neuropathology: In: Bancroft JD, Gamble M. Theory and practice of histological techniques. 5<sup>th</sup>ed. Sidney: Churchill Livingstone Publishers 2002; 371-414.
- Kapas S, Purbrick A, Hinson JP. Action of opioid peptides on the rat adrenal cortex: Stimulation of steroid secretion through a specific mu opioid receptor. J Endocrinol 1995; 144(3): 503-10.

10. Fowden AL, Forhead AG, Coan MP, Burton GJ. The placenta and intrauterine programming. *J Neuroendocrinol* 2008; 20(4): 439-50.
11. Ahmed MS, Schoof T, Zhou DH, Quarles C. Kappa opioid receptors of human placental villi modulate acetylcholine release. *Life sci* 1989; 45(25): 2383-93.
12. Soleimani M, Sahraei H, Sadooghi M, Maleki P. [Effects of prenatal morphine exposure on the basal ganglia development in rat embryo (Persian)]. *The Scientific Journal of Arak Medical University* 2006; 9: 53-61.
13. Derijk RH, de Kloet ER. Corticosteroid receptor polymorphism: determinants of vulnerability and resilience. *Eur J Pharmacol* 2007; 583(2-3): 303-11.
14. Gutteling BM, Weerth CDE, Buttelaar JK. Prenatal stress and mixed-handedness. *Pediatr Res* 2007; 62(5): 586-90.
15. Mulder EJJ, de Medina RPG, Huizink AC, Van den Bergh BRH, Buitelaar GK. Prenatal maternal stress: effects on pregnancy and the (unborn) child. *Early Hum Dev* 2002; 70(1-2): 3-14.
16. Meany MJ, Brake W, Gratton A. Environmental regulation of the development of mesolimbic dopamine systems: a neurobiological mechanism for vulnerability to drug abuse. *Psychoneuroendocrinology* 2002; 27(1-2): 127-38.
17. Van den Bergh BR, Mulder EJ, Mennes M, Glover V. Antenatal maternal anxiety and stress and the neurobehavioural development of the fetus and child: links and possible mechanisms. A review. *Neurosci Biobehav Rev* 2005; 29(2): 237-58.
18. Pascoe John E, Williams KL, Mukhopadhyay P, Rice KC, Woods JH, Ko MC. Effects of mu, kappa, and delta opioid receptor agonists on the function of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in monkeys. *Psychoneuroendocrinology* 2008; 33(4): 478-86.
19. Prinik Z, Schwendt M, Jezova D. Single dose of morphine influences plasma corticosterone and gene expression of main NMDA receptor subunit in the adrenal gland but not in the hippocampus. *Endocrine Regulations* 2001; 35(4): 187-93.
20. Jenkins SA, Muchow M, Richards MP, Mc Murtry JP, Porter TE. Administration of adrenocorticotrophic hormone during chicken embryonic development prematurely induces pituitary growth hormone cells. *Endocrinology* 2007; 148(8): 3914-21.