مجله‌ی علمی، پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
دوره‌ی ۱۹, شماره‌ی ۷۵, تابستان ۱۳۹۰, صفحات ۳۷ تا ٤٧

اثرات دوگانه مرفین بر روی فعالیت‌های صرعی خود بخودی در برش‌های هیپوکامپ مغز موش

دکتر محمدحسین اسماعیلی[۱]، دکتر مهین گنج‌خانی[۲]، دکتر علی‌اوسط ملتی[۳]، دکتر هاشم حق‌دوست‌یزدی[۱]، دکتر محمدصوفی آبادی[۱]

نویسنده‌ی مسئول: قزوین، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده‌ی پزشکی، گروه فیزیولوژی esmail66@yahoo.com

دریافت: ۸۹/٤/۱ پذیرش: ۸۹/۸/۲٤

چکیده

زمینه و هدف: *اپیوییدها اثرات پیچیده‌ای بر فعالیت تشنجی دارند. آن‌ها بسته به شرایط آزمایش دارای اثرات ضدتشنج و تشنج‌زا می‌باشند. هدف از مطالعه‌ی ما بررسی اثرات دوزهای مختلف مرفین و نالوکسان بر فعالیت تشنجی خود بخودی در برش‌های هیپوکامپ مغز موش بود.*

روش بررسی: *فعالیت تشنجی خودبخودی در برش‌های هیپوکامپ مغز موش به‌وسیله‌ی پرفیوژن مداوم مایع مغزی نخاعی مصنوعی با منیزیم کم، القا گردید. ثبت خارج سلولی از لایه سلول‌های هرمی ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ به‌عمل آمد. تا اثرات داروها بر دامنه، مدت زمان و شمار حوادث ایکتال و همچنین شمار اسپایک‌های بین ایکتال بررسی گردد.*

یافته‌ها: *کاربرد مرفین اثری دوگانه بر حوادث شبه تشنجی خودبخودی داشت. مرفین در غلظت کم (۱۰میکرومول) فعالیت تشنجی را کاهش داد و در غلظت‌های بالاتر (۳۰ و۱۰۰ میکرومول) این فعالیت تشنجی را به صورت وابسته به دوز افزایش داد. نالوکسان به‌عنوان آنتاگونیست غیرانتخابی اپیوییدها عمل تشنج‌زای مرفین را مهار کرد.*

نتیجه‌گیری: *نتایج این مطالعه نشان داد که اثرات مرفین بر تشنج، وابسته به دوز می‌باشد. به‌طوری که دوز پایین مرفین اثر ضد تشنج و دوز بالای آن تشنج‌زا می‌باشد.*

واژگان کلیدی: مرفین، صرع، CA1 هیپوکامپ، مایع مغزی نخاعی مصنوعی با منیزیم کم

مقدمه

اپی‌لپسی در اثر به‌هم خوردن تعادل بین نوروترنسمیترهای تحریکی و مهاری به‌وجود می‌آید. مهم‌ترین سیستم نوروترنسمیتری مهاری سیستم گاباارژیک (GABAergic) و مهم‌ترین سیستم نوروترنسمیتر تحریکی سیستم گلوتامینرژیک می‌باشد (۲و۱) و هر دو سیستم تحت تأثیر مرفین قرار می‌گیرند (٤و۳). مرفین سیستم گاباارژیک را از طریق گیرنده‌های گابا و بنزودیازپینی تحت تأثیر قرار می‌دهد. مصرف مزمن مرفین سیستم گاباارژیک را تغییر می‌دهد به‌طوری که مرفین می‌تواند اثرات بنزودیازپین‌ها و نیز اعمال گیرنده‌ی $GABA_A$ را تشدید کند (۵) و تغییر در سیستم گاباارژیک با تغییر در حساسیت نسبت به اپی‌لپسی همراه است (٦). در این رابطه چندین گزارش وجود دارد

۱- دکترای تخصصی فیزیولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۲- دکترای تخصصی فیزیولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان
۳- دکترای تخصصی بیوشیمی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان

که نشان می‌دهد گیرنده‌های اپیوئیدی بر روی اینترنورون‌های مهاری گاباارژیک در هیپوکامپ قرار دارند (۷). مرفین همچنین بر روی گیرنده‌های گلوتامینرژیک به‌ویژه گیرنده‌ی NMDA و کاینیک اسید اثر دارد، به‌طوری که یک دوز مرفین با غلظت کم، رفتارهای اپی‌لپتیک ایجاد شده به‌وسیله‌ی NMDA را مهار می‌کند و برعکس دوز مزمن یا غلظت بالای آن اپی‌لپسی ایجاد شده به وسیله‌ی NMDA را تشدید می‌کند. به‌علاوه در سندرم ترک اعتیاد، گیرنده NMDA به‌شدت فعال می‌شود و اپی‌لپسی کوتاه مدت ایجاد می‌کند (۱۱-۷). آدنوزین و پپتیدهای اپیوئیدی در ختم خودبخودی فعالیت‌های اپی‌لپتیک مغز دخالت دارند (۱۲). اپیوئیدها دارای اثرات پیچیده و متناقضی بر روی فعالیت‌های اپی‌لپتیک می‌باشند، به‌طوری که بسته به نوع و شرایط آزمایش هم اثرات ضد اپی‌لپتیک و هم اثرات تشدید کننده‌ی اپی‌لپسی برای آن‌ها گزارش شده است. به نحوی که مرفین صرع ایجاد شده به وسیله‌ی روش کیندلینگ را تضعیف و بر عکس صرع ایجاد شده به وسیله‌ی بیکوکولین را تشدید می‌کند (۱۳). به‌علاوه آزمایشات دیگر نشان داد که پارامتر غلظت نیز در ارتباط با اثرات مرفین بر صرع اهمیت دارد به گونه‌ای که غلظت کم مرفین اثر تضعیف کننده بر روی صرع دارد اما غلظت بالای آن اثر تشدید کننده دارد (۱۶- ۱٤). به‌طور مشابه تزریق حاد آن به درون بطن‌های مغز یا به درون بافت مغز باعث تشدید اپی‌لپسی می‌شود (۱٤) و تزریق مزمن آن باعث افزایش حساسیت نسبت به صرع در موش‌های بالغ می‌شود (۱۸و۱۷) و از طرف دیگر قطع ناگهانی مصرف مرفین نظیرسندرم ترک اعتیاد می‌تواند صرع کوتاه مدت ایجاد کند (۱۹). مطالعات بالا مشخص می‌کند که مرفین اثرات متعدد و پیچیده‌ای بر روی تحریک و مهار نرون‌های مؤثر در صرع دارد. این مطالعه با توجه به تناقضات موجود و با توجه به عدم وجود مطالعه‌ای بر روی اثرات مستقیم مرفین و آنتاگونیست آن یعنی نالوکسان بر روی فعالیت‌های اپی‌لپتیک خودبخودی برش‌های هیپوکامپ، طراحی گردید. برای ایجاد صرع از مدل Low-Mg^{2+} ACSF استفاده شد. زیرا در این مدل احتمالا سیستم‌های نوروترنسمیتری مغز کمتر تحت تاثیر قرار می‌گیرند. کم بودن غلظت Mg^{2+} در محلول ACSF موجب حذف انسداد موجود در کانال‌های کلسیمی گیرنده‌ی NMDA گلوتامات شده، در نتیجه باعث ورود کلسیم به داخل سلول و دپلاریزاسیون آن می‌گردد که می‌تواند به شکل حمله‌ی صرعی آشکار گردد (۲۱ و ۲۰).

روش بررسی

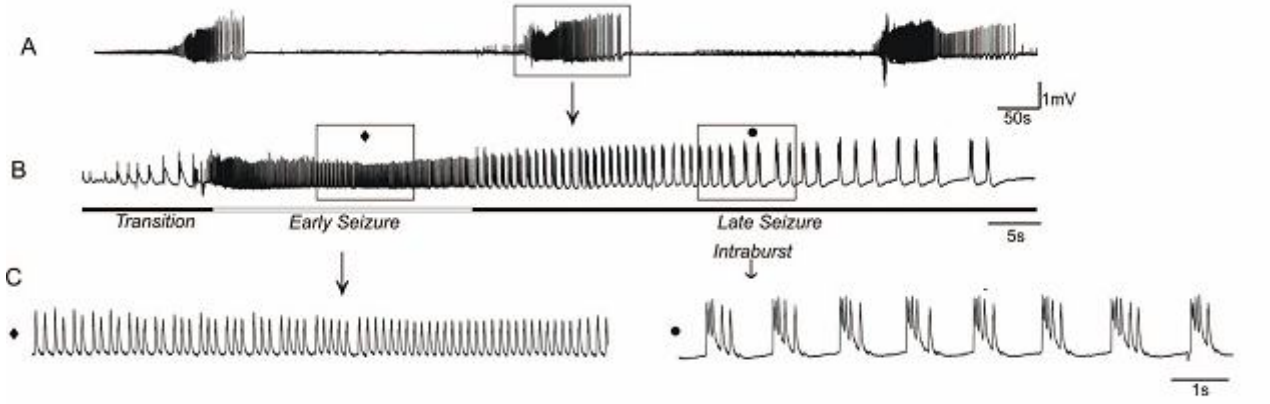
آماده سازی برش‌های مغزی: در این تحقیق از برش‌های مغز (n=۶) موش‌های ۱۰تا ۲۵ روزه‌ی نژاد C57/BL استفاده شد. با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی، حیوانات ابتدا به وسیله‌ی هالوتان بی‌هوش و سپس مغز آن‌ها بلافاصله بعد از جداشدن سر، از جمجمه خارج گردید و به مدت ۵ دقیقه داخل مایع مغزی نخاعی سرد که دائما اکسیژنه می‌شد، قرار گرفت. این محلول دارای ۲۶ میلی‌مول $NaHCO_3$، ۰/۹ میلی‌مول $MgCl_2$، ۱/۸ میلی‌مول $CaCl_2$، ۲/۵ میلی‌مول KCl، ۱۰ میلی‌مول glucose، ۱۲۵ میلی‌مول NaCl، ۱/۲۵ میلی‌مول NaH_2PO_4 بود. در مرحله‌ی بعد دو نیمکره‌ی مغز در خط Mid Sagittal با یک برش از هم جدا شدند. پس از جدا کردن کورتکس خلفی و مخچه و قسمت قدامی مغز (Forebrain) بر روی یک بلوک آلومینیومی با زاویه‌ی ۱۲ درجه به کمک چسب Cyanoacrylate در ویبروتوم فیکس شد (Series 1000, Technical productsinternational, St. Louis, MO) و به کمک آن برش‌های ۴۰۰ میکرومتری از مغز تهیه شد. برش‌ها برای مدت یک ساعت داخل مایع مغزی نخاعی اکسیژنه معمولی قرار گرفتند. بعد از آن برش‌ها جهت ثبت فعالیت‌های الکتریکی ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ به Chamber منتقل شدند. جهت ایجاد امواج صرعی در برش‌ها از مایع مغزی نخاعی مصنوعی با منیزیم کم (Low-Mg^{2+} ACSF)

استفاده شد که مشابه مایع مغزی نخاعی سرد بود، با این تفاوت که غلظت‌ها به‌صورت ۵ میلی‌مول Kcl و ۰/۲۵ میلی‌مول $MgCl_2$ بود.

ثبت فعالیت‌های الکتریکی: برای ثبت پتانسیل‌های میدانی خارج سلولی (Extracellular Field Potentials) نورون‌های پیرامیدال ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ از پیپت شیشه‌ای پرشده با ۱۵۰ میلی‌مول NaCl که میزان مقاومت آن ۳ تا ۵ MΩ بود، استفاده گردید. تمام آزمایشات در دمای ثابت ۳۲ درجه‌ی سانتی‌گراد صورت گرفت. فعالیت‌های الکتریکی هیپوکامپ به کمک آمپلی‌فایر نوع Axoclamp-2A تقویت و در 3 kHz فیلتر می‌گردید. دریافت و تبدیل و آنالیز اطلاعات به کمک برنامه نرم‌افزاری PClamp Version 8 صورت گرفت. ثبت از هیپوکامپ قبل و بعد از Tetanization و همینطور قبل و بعد از کاربرد داروها ادامه داشت. تغییر در پتانسیل‌های فیلد از قبیل فرکانس و دامنه و مدت امواج و الگوی امواج به کمک برنامه‌ی نرم افزاری Clampfit مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. امواج اپی‌لپتیک خودبخودی ماندگار (Sustained Spontaneous Epileptiform Discharges) هر ۱۰ دقیقه یک بار تکرار می‌شد. بعد از آنکه این امواج ۱۰ بار تکرار شدند، مرفین یا نالوکسان استفاده شد. مدت زمان ظهور امواج اپی لپتیک به عنوان Ictal Activity درون گروه‌ها قبل و بعد از کاربرد داروها به کمک آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و Paired T Test با هم مقایسه شدند و سطح معنی‌داری در این حالات $P<0/05$ در نظر گرفته شد

یافته‌ها

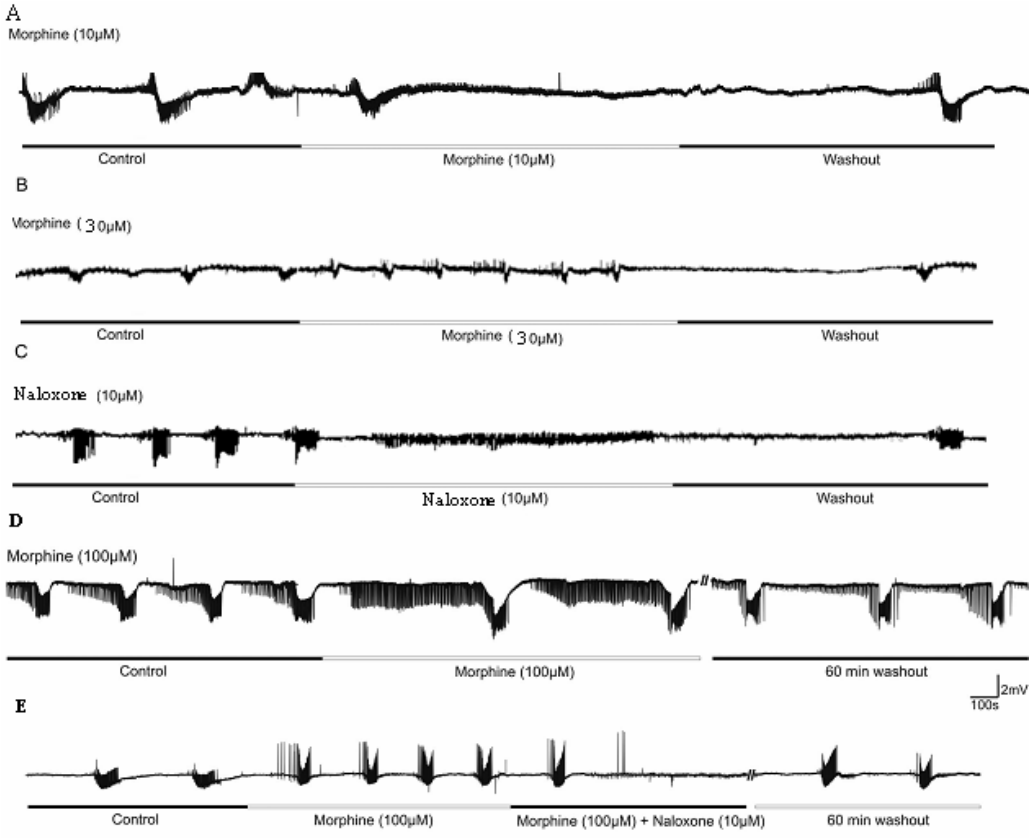
در این مطالعه پارامترهای فرکانس، مدت زمان و دامنه‌ی وقایع شبه حمله یا Seizure-Like Events (SLE) قبل و بعد از کاربرد داروها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصله به شرح زیر می‌باشد. در آزمایش مربوط به گروه کنترل در هر ۱۰ برش هیپوکامپ مختلف SLE اتفاق افتاد و در طول ۱ تا ۲ ساعت ثبت از هیپوکامپ الگوی آن ثابت بود.



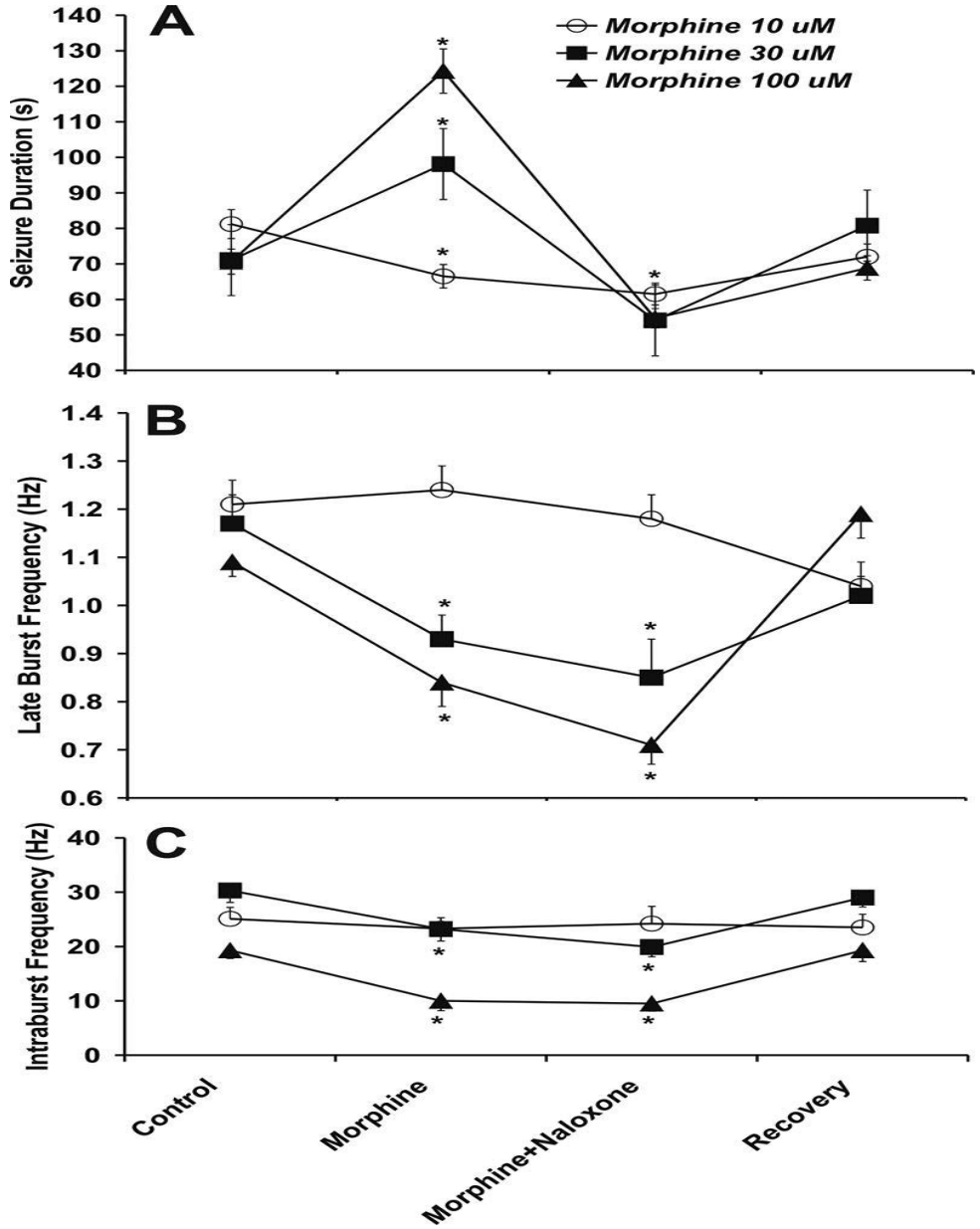
شکل ۱: وقایع شبه حمله SLE ثبت شده از برش هیپوکامپ مغز در طول پرفیوژن با $Low\text{-}Mg^{2+}$ ACSF .

A) ثبت الکتروفیزیولوژیک وقوع ۳ حمله SLE را در برش هیپوکامپ مغز که به‌وسیله‌ی پرفیوژن $Low\text{-}Mg^{2+}$ ACSF ایجاد شده را نشان می‌دهد. B) جزئیات Scale زمانی یک SLE را نشان می‌دهد که از ۳ فاز تشکیل شده است: فاز انتقالی با اسپایک‌های کم فرکانس، فاز تشنج اولیه و فازتشنج تاخیری. C) جزئیات Scale زمانی فازهای دوم و سوم را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود فاز سوم از Slow Late Burst و Fast Intraburst تشکیل شده است.

میانگین مدت زمان ظهور SLE، ۵ ±۸۷ ثانیه بود و به طور متوسط در هر ۱۰ دقیقه ۲±۰/۶۵ بار این وقایع بروز می‌کردند معمولا این وقایع SLE خود به خودی تکراری هیپوکامپ، ۶ تا ۱۲ دقیقه بعد از شروع پرفیوژن با Low-Mg^{2+} ACSF شروع شد و برای ۹۵ تا ۱۲۰ دقیقه بعد از آن با فرکانس و الگوی تقریبا ثابت ادامه داشت. برای ارزیابی سلامت برش‌های هیپوکامپ از تحریک مسیر Schafer Collateral برای ایجاد پتانسیل‌های القاء شده سیناپسی در نورون‌های پیرامیدال ناحیه‌ی CA1 استفاده شد. زمانی‌که دامنه‌ی پتانسیل‌های القا شده‌ی سیناپسی به کمتر از ۷۵ درصد دامنه‌ی همین امواج در شروع آزمایش کاهش یافت، آزمایش متوقف شد. هر SLE منفرد ثبت شده شامل سه فاز بود، فاز اول فاز انتقالی یا Transition با اسپایک‌های با فرکانس کم، فاز دوم فاز Early Seizure که از یک‌سری اسپایک‌های ساده با فرکانس کم و میانگین ۱ هرتز تشکیل شده بود و فاز سوم فاز Late Seizure که از Slow Late Burst با میانگین Hz ۱/۳و Fast Intra Burst تشکیل شده بود (شکل ۱)



شکل ۲: اثرات مرفین با دوزهای مختلف و نالوکسان با دوز ۱۰میکرومول بر وقایع شبه حمله ثبت شده از برش هیپوکامپ مغز در طول پرفیوژن با Low-Mg^{2+} ACSF. (A)، مرفین در دوز کم ۱۰میکرومول باعث حذف کامل SLE ها شد در حالی که دوز بالای مرفین (۳۰ و۱۰۰ میکرومول) موجب افزایش وابسته به دوز فعالیت اپی‌لپتیک هیپوکامپ شد (B, D,E)، مرفین در دوز ۱۰۰ میکرومول در موش ۲۵ روزه مدت زمان بروز وقایع شبه حمله را افزایش داد (D) ولی در موش ۱۰ روزه تعداد دفعات بروز SLE ها را افزایش داد (E)، اثرات مرفین ۱۰۰ میکرومول به وسیله‌ی نالوکسان ۱۰ میکرومول بلوکه شد (E)، نالوکسان نه تنها اثرات تشدید کننده‌ی مرفین ۱۰۰میکرومول بر اپی لپسی را بلوکه کرد، بلکه استفاده از دوز ۱۰ میکرومول آن به تنهایی مشابه مرفین ۱۰ میکرومول باعث حذف SLE ها شد، ولی فعالیت زمینه را افزایش داد (C).



شکل ۳. اثرات وابسته به دوز مرفین بر وقایع شبه حمله برش‌های هیپوکامپ.

مرفین ۱۰ مایکرومول مدت زمان بروز وقایع شبه حمله برش‌های هیپوکامپ را نسبت به قبل از کاربرد آن (کنترل) به صورت معنی‌داری کاهش می‌دهد و مرفین ۳۰ و ۱۰۰ مایکرومول برعکس آن را نسبت به قبل از کاربرد آنها (کنترل) به صورت معنی‌داری افزایش می‌دهد. مرفین ۳۰ و ۱۰۰ مایکرومول Slow Late Burst و Fast Intraburst فاز سوم اپی‌لپسی را نسبت به قبل از کاربرد آن‌ها (کنترل) به صورت معنی‌داری Suppress کرد (B,C). نالوکسان ۱۰ مایکرومول اثرات مرفین ۳۰ و ۱۰۰ مایکرومول بر طول مدت زمان بروز وقایع شبه حمله را معکوس کرد ولی بر روی فرکانس Slow Late Burst و Fast Intraburst فاز سوم اپی‌لپسی بی‌اثر بود. هرکدام از دوز های مرفین در ۱۲ برش هیپوکامپ از ۶ موش مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت که در مقایسه با گروه کنترل (قبل از کاربرد دارو) معنی‌دار بود (P <۰/۰۵).

اثرات مرفین بر فعالیت‌های اپی‌لپتیک برش‌های هیپوکامپ دوفازی بود، به این معنی که مرفین باغلظت ۱۰مایکرومول باعث کاهش طول مدت و تعداد دفعات بروز تکراری وقایع شبه حمله و نهایتاً منجر به حذف آن‌ها شد به طوری که اختلاف مدت زمان ظهور SLE (Duration) در قبل و بعد از کاربرد مرفین (۱۰مایکرومول) با (P< ۰/۰۵) معنی‌دار بود. (شکل 2A, 3A). این اثرات با شستشوی برش‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با Low-Mg^{2+} ACSF کاملا معکوس شدند و مجددا امواج اپی‌لپتیک SLE ظاهر شدند. در آزمایش بعدی وقتی از غلظت بالای مرفین ۳۰ و ۱۰۰ مایکرومول استفاده شد این بار بر عکس مرفین ۱۰ میکرومول، طول مدت و تعداد دفعات بروز امواج اپی‌لپتیک SLE برش‌های هیپوکامپ به صورت وابسته به دوز افزایش یافت به طوری که اختلاف مدت زمان ظهور SLE در قبل و بعد از کاربرد مرفین (۳۰ و ۱۰۰ مایکرومول) با (P< ۰/۰۵) معنی‌دار بود. (شکل ۲B ,D ,E و ۳A). نکته قابل توجه این قسمت در این بود که اضافه کردن مرفین ۱۰۰ مایکرومول به برش هیپوکامپ موش‌های ۲۵ تا ۳۰ روزه موجب افزایش طول مدت ولی کاهش تعداد دفعات بروز SLE گردید (شکل ۲D). در حالی که اضافه کردن آن به برش هیپوکامپ موش‌های ۵ تا ۱۰ روزه برعکس موجب افزایش تعداد دفعات SLE شد (شکل 2E) که نشان می‌دهد اثرات مرفین نه تنها وابسته به غلظت آن است، بلکه وابسته به سن نیز می‌باشد. دوز بالای مرفین (۳۰ و ۱۰۰ مایکرومول) بر روی فاز دوم Seizure یعنی فاز Early Seizure تغییر معنی‌داری ایجاد نکرد، ولی باعث کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۵) فرکانس Slow Late Burst و Fast Intraburst فاز سوم اپی‌لپسی نسبت به قبل از کاربرد آنها شد (شکل 3B,C)

نالوکسان به عنوان آنتاگونیست غیر اختصاصی مرفین باغلظت ۱۰ مایکرومول نه تنها اثرات تشدید کننده مرفین ۱۰۰ میکرومول بر اپی‌لپسی را بلوکه کرد، بلکه توانست SLE زمینه را نیز حذف کند. کاربرد دوز ۱۰ میکرومول آن به تنهایی باعث حذف SLE های دوره‌ای شد، ولی فعالیت‌های الکتریکی هیپوکامپ را تشدید کرد (شکل 2E, C). اضافه کردن دوز بالای مرفین (۳۰ و ۱۰۰ مایکرومول) به برش‌های هیپوکامپی که با محلول استاندارد ACSF پرفیوز شدند، باعث ایجاد هیچ نوع فعالیت اپی‌لپتیکی در برش‌ها نشد. به‌علاوه افزایش فعالیت اپی‌لپتیک برش‌های هیپوکامپ پرفیوز شده با Low-Mg^{2+} ACSF حاوی دوز بالای مرفین بعد از پرفیوز کردن همان نمونه با محلول استاندارد ACSF ادامه پیدا نکرد و بروز امواج اپی‌لپتیک متوقف شد (نتایج نشان داده نشده است).

بحث

نتایج ما نشان داد که غلظت کم مرفین ۱۰ میکرومول فعالیت‌های اپی‌لپتیک را تضعیف می‌نماید. در حالی که غلظت متوسط و بالای مرفین ۳۰ و ۱۰۰ میکرومول این اثر را به صورت وابسته به دوز تشدید می‌کند و این اثرات تشدید کننده‌ی مرفین به وسیله‌ی نالوکسان ۱۰ میکرومول کاملاً مهار می‌گردد. در این رابطه فولر و همکاران (۲۲) نشان دادند که غلظت کم مرفین باعث تشدید اپی‌لپسی ایجاد شده به وسیله‌ی کاینیک اسید (KA) می‌شود، در حالی که سایر محققین (۲۳و۱۶،۱۵،۱۰،۱۱) نشان داده‌اند که غلظت کم مرفین اپی‌لپسی ایجاد شده به وسیله‌ی NMDA را تضعیف و برعکس غلظت بالای آن این نوع اپی‌لپسی را تشدید می‌کند. از این نظر نتایج ما با نتایج گروه اول مغایرت داشته ولی با نتایج گروه دوم هم‌خوانی دارد.

با توجه به این اثرات دوگانه و متضاد مرفین بر روی اپی‌لپسی، می‌توان نتیجه‌گرفت که مرفین در غلظت‌های مختلف بر روی گیرنده‌های متفاوت و یا به کمک مکانیسم‌های مختلف عمل می‌کند. در این رابطه مشخص گردیده است که مرفین اثرات خود را بر روی رفتار حیوان یا مستقیماً به کمک گیرنده‌ی

خودش و یا غیر مستقیم از طریق تعدیل گیرنده‌های GABA و NMDA اعمال می‌نماید (۲۴و۱۷). به‌علاوه بعضی از رفتارها از جمله تعدیل رفتارهای اپی‌لپتیک، یادگیری و حافظه، به وسیله‌ی هر دو اگونیست‌های گیرنده‌های GABA و گیرنده‌های اپیوئیدی به‌وجود می‌آید (۲۶و۱). تحقیقات اخیر نیز مشخص کرده‌اند که گیرنده‌های اپیوئیدی بر روی نورون‌های بینابینی مهاری GABAergic هیپوکامپ قرار دارند و مرفین از طریق این گیرنده‌ها باعث مهار آزاد شدن GABA از این اینترنورون‌ها می‌شود (۲۵و۲۴و۷).

براساس نتایج اخیر و نتایج به‌دست آمده از دیگر تحقیقات بنظر می‌رسد که فعال کردن گیرنده‌های اپیوئیدی به کمک مرفین در غلظت‌های بالا منجر به کاهش آزاد شدن GABA از اینترنرون‌های مهاری GABAergic هیپوکامپ می‌شود و بنابراین از طریق رفع مهار (Disinhibition) نرون‌های پیرامیدال هیپوکامپ باعث تشدید اپی‌لپسی ایجاد شده به وسیله‌ی Low-Mg^{2+}-ACSF در هیپوکامپ می‌شود. از طرف دیگر اثرات ضد صرعی غلظت پایین مرفین (۱۰ میکرومول) مشاهده شده در این تحقیق، ممکن است به‌دلایل زیر باشد.

۱- مهار سلول‌های پیرامیدال از طریق تداخل عمل با گیرنده‌های NMDA موجود بر روی سلول‌های پیرامیدال که نقش مهمی در ایجاد اپی‌لپسی بر عهده دارند. برخی شواهد نشان می‌دهد که آنتاگونیست گیرنده‌های NMDA در تعدیل صرع ایجاد شده به‌وسیله‌ی مرفین نقش مهمی برعهده دارند (۲۷). در این رابطه محققین نشان داده‌اند که فیبرهای خزه‌ای ناحیه‌ی CA_3 هیپوکامپ نسبت به مرفین بسیار حساس می‌باشند (۲۸). علاوه بر حساسیت فیبرهای خزه‌ای نسبت به مرفین این فیبرها از جهت دیگری نیز جالب توجه می‌باشند، زیرا محققین نشان داده‌اند که دینورفین به‌عنوان یک پپتید اپیوئیدی اندروژن به‌همراه گلوتامات از فیبرهای خزه‌ای آزاد می‌شود، تا باعث تعدیل میزان آزاد شدن گلوتامات شود. بنابراین ممکن است مرفین از آزاد شدن گلوتامات از فیبرهای خزه‌ای جلوگیری کرده باشد (۲۸).

۲ـ دوز کم مرفین قادر است پروتئین Gs را تحریک کند (۲۹). در صورت درستی فرض جفت شدن گیرنده‌ی اپیوئیدی با پروتئین Gs در اینترنورون‌های گاباارژیک، به نظر می‌رسد که دلیل مهار تشنج در دوز کم مرفین این باشد که مرفین در دوز کم، گیرنده‌های موجود در نورون‌های گاباارژیک را فعال کرده، سپس پروتئین Gs را تحریک می‌کند و با فعال شدن Gs سلول‌های گاباارژیک تحریک شده که نتیجه‌ی تحریک این سلول‌ها افزایش تون گاباارژیک است. نتیجه‌ی افزایش آزادسازی نوروترنسمیتر GABA افزایش اثر مهاری آن بر روی نورون‌ها و شبکه‌های نورونی و در نتیجه کاهش تشنج است.

۳- ممکن است از تداخل عمل بین اپیوئیدها با دیگر سیستم‌های نروترنسمیتری که در تسهیل و مهار اپی‌لپسی دخالت دارند، ناشی شود. به‌عنوان مثال نشان داده شده است که تحمل وابستگی به مرفین می‌تواند باعث تشدید حساسیت گیرنده‌های آدنوزین شود و همینطور می‌تواند باعث افزایش آزاد سازی نوراپی‌نفرین و افزایش تولید cAMP تحریک شده به وسیله‌ی گیرنده D_1 دوپامین شود (۳۱و۳۰). بنابراین محتمل است که مرفین در غلظت کم از طریق اعمال اثر بر این سه سیستم آدنوزین ـ اپی‌نفرین ـ دوپامین باعث تضعیف امواج اپی‌لپتیک شود.

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نشان می‌دهند که مرفین در دوز کم فعالیت‌های اپی‌لپتیک خودبخودی هیپوکامپ را تضعیف و مهار می‌کند و برعکس دوزهای بالای مرفین (۱۰۰ میکرومول) در موش‌های جوانتر دفعات بروز حملات اپی‌لپسی و در موش‌های مسن‌تر طول مدت زمان بروز هرکدام از حملات اپی‌لپتیک را

طولانی می‌نماید. نتایج ما به‌همراه نتایج سایر محققین (۳۲) نشان می‌دهد که اثرات مرفین و داروهای شبه مرفین بر روی اپی‌لپسی به دوز و سن و روش تحقیق بستگی دارد.

References

1- Engel J. Excitation and inhibition in epilepsy. *Can J Neurol Sci*. 1996; 23: 167-74.

2- Holmes GL. Epilepsy in the developing brain: lessons from the laboratory and clinic. *Epilepsia*. 1997; 38: 12-30.

3- Breuker E, Dingledine R, Iversen LL. Evidence for naloxone and opiates as GABA antagonists. *Br J Pharmacol*. 1976; 58: 458-60.

4- Collingridge GL, Singer W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci*. 1990; 11: 290-6.

5- Lopez F, Miller LG, Thompson ML, Schatzki A. Chronic morphine administration augments benzodiazepine binding and GABA-A receptor function. *Psychopharmacol (berl)*. 1990; 101: 545-9.

6- Morimoto K. Seizure-triggering mechanisms in the kindling model of epilepsy: collapse of GABA-mediated inhibition and activation of NMDA receptors. *Neurosci Biobehav Rev*. 1989; 13: 253-60.

7- Madison DV, Nicoll RA. Enkephalin hyperpolarizes interneurones in the rat hippocampus. *J Physiol*. 1988; 398: 123-130.

8- Fundytus M E, Coderre TJ. Effect of activity at metabotropic as well as ionotropic (NMDA), glutamate receptors on morphine dependence. *Br J Pharmacol*. 1994; 113: 1215-20.

9- Kreeger JS, Yukhananov AA, Larson YR. Altered *N*-methyl-D- aspartate (NMDA) activity in the mouse spinal cord following morphine is mediated by sigma activity. *Brain Res*. 1995; 672: 83-8.

10- Ahmad I, Pleuvry BJ. Interactions between opioid drugs and propofol in laboratory models of seizures. *Br J Anaesth*. 1995; 74: 311-4.

11- Yukhananov RY, Larson AA. Morphine modulates excitatory amino acid-induced activity in the mouse spinal cord: short-term effects on *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) and long-term effects on kainic acid. *Brain Res*. 1994; 646: 194-200.

12- Albertson TE, Joy RM, Stark LG. Modification of kindled amygdaloid seizures by opiate agonists and antagonists. *J Pharmacol Exp Ther*. 1984; 228: 620-7.

13- Foot F, Gale K. Morphine potentiates seizures induced by GABA antagonist and attenuates seizures induced by electroshock in the rat. *J Pharmacol*. 1983; 95: 259-64.

14- Frenk H. Pro- and anticonvulsant actions of morphine and the endogenous opioids: involvement and interactions of multiple opiate And non-opiate systems. *Brain Res*. 1983; 287: 197-210.

15- Yahyavi-Firoz-Abadi N. Melatonin enhances the anticonvulsant and proconvulsant effects of

morphine in mice: role for nitric oxide signaling pathway. *Epilepsy Res.* 2007; 75: 138-44.

16- Shafaroodi H, Asadi S, Sadeghipour H, Ghasemi M, Ebrahimi F, Tavakoli S, Hajrasouliha AR, Dehpour AR. Role of ATP-sensitive potassium channels in the biphasic effects of morphine on pentylenetetrazole-induced seizure threshold in mice. *Epilepsy Res.* 2007; 75: 63-9.

17- Puglisi-Allegra S, Cabib A. Pharmacological evidence for a protective role of the endogenous opioid system on electroshock-induced seizures in the mouse, *Neurosci Lett.* 1985; 62: 241–247.

18- Rocha L, Ackermann RF, Engel JJ. Effects of chronic morphine treatment on amygdaloid kindling development, ostictal seizure suppression and benzodiazepine receptor binding in rats. *Epilepsy Res.* 1996; 23: 225-33.

19- Tanganelli S, Antonelli T, Morari M, Bianchi C, Beanin L. Glutamate antagonists prevent morphine withdrawal in mice and guinea pigs. *Neurosci Lett.* 1991; 122: 270-2.

20- Avolli M, D'Antuono M, Louvel J, Kohling R, Biagini G, Pumain R, et al. Network and pharmacological mechanisms leading to epileptic synchronization in the limbic system in vitro. *Prog Neurobiol*. 2002; 68: 167-207.

21- Wu C, Shen H, Zhang LA. Fundamental oscillatory state of isolated rodent hippocampus. *J Physiol*. 2002; 540: 509-27.

22- Fuller TA, Olney JW, Conboy VT. Naloxone blocks morphine enhancement of Kainic acid neurotoxicity. *Life Sci.* 1982; 31: 229-33.

23- Alreja M, Aghajanian G. Opiates suppress a restin sodium dependent inward current and activate an outward potassium current in locus coeruleus neurons. *J Neurosic.* 1993; 13: 3525-32.

24- Vaughan CW, Ingram SL, Connor MA, Christie MJ. How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. *Nature*. 1997; 390: 611-4.

25- Dichiara G, North RA. Neurobiology of opiate abuse. *Trends Pharmacol* Sci. 1992; 13: 185-93.

26- Yajima Y, Narita M. Effects of differential modulation of mu, delta-and kappa opioid systems on bicuculline-induced convulsions in the mouse. *Brain Res.* 2000; 869: 120-6.

27- Lutfy K, Woodward RM, Keana JF, Weber E. Inhibition of clonic seizure-like excitatory effects induced by intrathectal morphine using two NMDA receptor antagonists: MK-801 and ACEA-1011. *Eur J Pharmacol*. 1994; 252: 261-6.

28- Weisskopf MG, Zalutsky RA, Nicoll RA. The opioid peptide dynorphine mediates heterosynaptic depression of hippocampal mossy fiber synapses and modulates long-term potentiation. *Nature*. 1993; 362: 423-7.

29- Honar H, Riazi K, Homayoun H. Ultra-low dose naltrexone potentates the anticonvulsant effect of low dose morphine on clonic seizure. *Neurosci.* 2004; 129: 733-42.

30- Aghajanian MK, Takemori AE. Changes in adenosine receptor sensitivity in morphine-tolerant and dependent mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1986; 236: 615-20.

31- Devries TJ, Tjon Tien Ril, GHK, Van der Laan JW. Chronic exposure to morphine and naltrexone induces changes in catecholaminergic neurotransmision in rat brain without altering mu opioid receptor sensitivity. *Life Sci*. 1993; 52: 1685-93.

32- Schindler CJ, Veliskova J, Slamberova R. Prenatal morphine exposure alters susceptibility to bicuculline seizures in a sex-and age-specific manner. *Developmental Brain Res*. 2000; 121: 119-22.

Dual Effects of Morphine on Spontaneuse Seizure Activity in Mouse Brain Hippocampal Slices

Esmaeili MH[1], Ganjkhani M[2], Melati AA[3], Haghdoost-Yazdi H[1], Sofiabadi M[1]

[1]Dept. of Physiology, Qazvine University of Medical Sciences, Qazvine, Iran

[2]Dept. of Physiology, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

[3]Dept. of Biochemistry, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

***Corresponding Author**:* Esmaeili MH, Dept. of Physiology, Qazvine University of Medical Sciences, Qazvine, Iran

E-mail: Esmail66@yahoo.com

Received: 22 Jun 2010 **Accepted:** 15 Nov 2010

Background and Objective: Opiates have complex effects on seizure activity. They have both anti- and proconvulsive effects depending on experimental conditions.

The aim of this study was to determine the effects of different doses of morphine and naloxon on spontaneous seizure activity in mouse brain hippocampal slices.

Materials and Methods: Spontaneous epileptic activity in the brain hippocampal slices of mouse was induced by continuous perfusion of low magnesium artificial cerebrospinal fluid (low -Mg^{2+} ACSF). Extra cellular recordings were performed in the hippocampal CA1 pyramidal cell layer to account for the effects of the drugs on amplitude, duration and number of the ictal events as well as number of interictal spikes.

Results: Application of morphine had a biphasic effect on the recorded spontaneous seizure-like events. In a low concentration (10 µM), morphine decreased seizure activity. Higher morphine concentrations (30 & 100 µM) enhanced seizure activity in an apparent dose-dependent manner. Naloxone, a nonselective opiate antagonist, blocked the proconvulsant action of morphine.

Conclusion: The results of this study showed that the effect of morphine on seizure in mouse is dose dependent. In other words, low systemic doses of morphine have anticonvulsant effects while high doses are proconvulsant.

Keywords: Morphine, Seizure, Hippocampal CA1, Low- Mg^{2+} ACSF