

اثر مرفین بر حملات صرعی ایجاد شده بوسیله مایع مغزی نخاعی با منیزیم کم در هیپوکامپ کامل موش

دکتر بهنام حشمتیان*، دکتر احسان صبوری*، دکتر علی نسیمی**

دریافت: ۸۶/۱۰/۹ ، پذیرش: ۸۷/۷/۱۳

چکیده:

مقدمه و هدف: مرفین قادر به ایجاد اثر تشدید و نیز تضعیفی بر فعالیت صرعی بر حسب شرایط آزمایش می باشد. بررسی اثرات متضاد مرفین بر برخی فعالیت‌های عصبی مثل صرع می تواند مکانیسم بعضی از رخدادهای عصبی و سازش‌های نرونی را توجیه نماید. هدف از انجام این مطالعه تعیین اثر مرفین بر حملات صرعی ایجاد شده بوسیله مایع مغزی نخاعی با منیزیم کم در هیپوکامپ کامل در خارج بدن بوده است.

روش کار: در این مطالعه تجربی موش‌های نوع C57/BL6 ۱۱ تا ۱۹ روزه مورد استفاده قرار گرفت. موش‌ها بی‌هوش شده و مغز آنها خارج گردید و در Artificial CerebroSpinal Fluid (ACSF) سرد- یخ که بطور مداوم اکسیژن گیری می شد به مدت ۳ دقیقه قرار گرفت (n=۲۵). سپس هیپوکامپ زنده بصورت سالم و دست نخورده با دقت از بقیه مغز جدا شد و در ACSF استاندارد حداقل به مدت یک ساعت قبل از ثبت نگهداری شد. ACSF با منیزیم کم برای مشروب کردن بافت همراه با اکسیژن مورد استفاده قرار گرفت که باعث ایجاد فعالیت صرعی در بافت شد. ثبت الکتروفیزیولوژیک بطور عمده از لایه هرمی در ناحیه CA1 به عمل آمد. فعالیت‌های صرعی از نظر طول مدت و درصد زمان حمله مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج: مرفین با غلظت ۱۰ و ۲۰۰ میکرومول فعالیت‌های صرعی را تضعیف کرد، درحالی‌که غلظت‌های متوسط مرفین (۳۰ و ۱۰۰ میکرومول) این فعالیت‌ها را تشدید نمود. نالوکسان (۱۰ μM) نه تنها اثرات تحریکی مرفین را مهار کرد، بلکه فعالیت‌های صرعی ایجاد شده بوسیله ACSF با منیزیم کم را نیز تضعیف نمود. غلظت‌های مختلف مرفین بصورت توأم با نالوکسان (۱۰ μM) حملات صرعی را تضعیف نمود. نتیجه نهائی: مطالعه حاضر نشان داد که مرفین در غلظت‌های حدود ۳۰ و ۱۰۰ میکرومول ممکن است باعث تشدید فعالیت صرعی شود و در بیماران صرعی باید با احتیاط بیشتری مصرف گردد. بر عکس، نالوکسان اثرات ضد صرعی نشان داده و می تواند در این مورد مفید واقع شود.

کلید واژه ها: صرع / مرفین / نالوکسان / هیپوکامپ

مقدمه:

(۱۰ تادر روز) سبب کاهش تعداد گیرنده های مو و دلتا در هیپوکامپ، هیپوتالاموس و هسته دم دار شده اما در ساقه مغز و کورتکس فرونتال چنین تغییری را ایجاد نمی کند (۲). همچنین در یک مطالعه میکرودیالیز بصورت in vivo نشان داده شد که به دنبال استرس میزان بتا اندورفین و مت انکفالین در قسمت‌های زیادی از مغز از جمله هیپوکامپ و هیپوتالاموس افزایش می یابد (۳). این

صرع یکی از عوامل تهدید کننده مهم سلامتی انسان بوده و داروهای جدید و پیشرفتهای جراحی اعصاب در درمان قطعی این بیماری ناتوان هستند. مدار نرونی و پایه سلولی صرع به مقدار ناچیزی روشن شده و ۲۰ تا ۲۵٪ از بیماران به درمان‌های موجود پاسخ ضعیفی می دهند (۱،۲). گزارش شده است که الکتروشوک‌های تکراری

* استادیار گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه (saboory@umsu.ac.ir)

** دانشیار گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

بود. در این مدل کم بودن غلظت یون Mg^{2+} در محلول ACSF موجب حذف انسداد موجود در کانالهای کلسیمی گیرنده NMDA گلوتامات شده، در نتیجه باعث ورود کلسیم به داخل سلول و دیپولاریزاسیون آن می گردد. این موضوع می تواند در بافتهای تحریک پذیر و در محلهای مناسب باعث شروع تخلیه های الکتریکی در دستجات نرونها به شکل حمله صرعی گردد (۹-۱۲).

روش کار:

حیوانات و روش آزمایش: در این مطالعه تجربی از ۲۵ سر موش نژاد C57/ black 6 استفاده شد. تمام مراحل کار با حیوانات مطابق دستورالعمل استاندارد نگهداری و حمایت از حیوانات انجام شد. حیوانات با استفاده از گازهاوتان به طریق استنشاقی بی هوش شده و بلافاصله سر حیوان جدا شده و مغز خارج گردید و به مدت ۳ دقیقه در ACSF نرمال سرد بدرجه حرارت ۴-۰ درجه سانتی گراد که به طور مرتب اکسیژنه می شد (۹۵٪ اکسیژن و ۵٪ دی اکسید کربن) قرار گرفت. هیپوکامپها ($n=50$) با دقت و سرعت هر چه تمامتر خارج شده و به داخل ACSF نرمال که بطور مرتب اکسیژنه می شد انتقال داده شده و حداقل به مدت یک ساعت (۱۰،۱۳،۱۴) در دمای آزمایشگاه در داخل ACSF اکسیژنه معمولی نگهداری گردید. سپس برای ثبت الکتروفیزیولوژیک به داخل ظرف مخصوصی بنام interface-type chamber منتقل شد. هیپوکامپ در داخل Chamber مرتباً بوسیله ACSF پرفیوز شد (۱۰). در این مطالعه از دو نوع محلول استفاده کردیم. یکی از آنها ACSF معمولی بود که به هنگام خارج کردن هیپوکامپ، آنکوباسیون و پرفیوژن استفاده می شد و دارای محتویات زیر بود (بر حسب میلی مول): $26 NaHCO_3$, $2.5 KCl$, $2 CaCl_2$, $2 MgSO_4$, $1.25 NaH_2PO_4$, $125 NaCl$ and $14 glucose$. ACSF دیگر $Low Mg^{2+}$ بود که برای ایجاد امواج صرعی مورد استفاده قرار گرفت که دارای

محتویات زیر بود (بر حسب میلی مول):

$26 NaHCO_3$, $5 KCl$, $2 CaCl_2$, $0.2 MgSO_4$, $1.25 NaH_2PO_4$, $125 NaCl$ and $14 glucose$. اسمولالیتته محلولهای بکار رفته در این مطالعه ۳۰۰ تا ۳۰۷ میلی اسمول بود (۱۰،۱۱،۱۵،۱۶).

هر هیپوکامپ بعد از انتقال به محفظه ثبت به مدت ۱۵ دقیقه با ACSF استاندارد پرفیوز شد و سپس Input/ output (I/O) گرفته شد. پس از حصول اطمینان

مشاهدات با مطالعاتی که نشان داده اند، الکتروشوک باعث افزایش آزاد شدن پپتیدهای اپیوئیدی می شود سازگار است. این احتمال وجود دارد که افزایش آزاد شدن این پپتیدها باعث تنظیم کاهشی گیرنده های اپیوئیدی شود. البته بعضی از مطالعات نتایج متضادی را گزارش کرده و نشان داده اند که بدنبال استفاده از الکتروشوک مزمن تعداد گیرنده های اپیوئیدی افزایش یافته است (۱،۲،۴). همچنین برخی مطالعات عدم تغییر تعداد گیرنده های اپیوئیدی بدنبال استفاده از الکتروشوک را گزارش کرده اند (۴-۶). مهمترین یافته مشترک بین بیشتر محققین در این زمینه عدم تغییر تعداد این گیرندهها بدنبال یک الکتروشوک منفرد است. دلایل این تناقضها مشخص نیست اگر چه نیازمند مطالعات بیشتری است، ولی یک احتمال در مورد این تناقضها به روش آزمایش، دوز و نحوه استفاده از مواد شیمیایی و نوع الکتروشوک مربوط می باشد.

مواد مخدر اثرات پیچیده ای روی آستانه حمله صرعی دارند. هم اثرات تشدید کننده و هم تضعیف کننده حمله صرعی برحسب نوع و شرایط آزمایش از این مواد گزارش شده است (۵،۷). مرفین القاء حمله صرعی بوسیله الکتروشوک را مسدود می کند در حالیکه تعداد و شدت حملات ایجاد شده بوسیله Bicuculine (آنتاگونیست گیرنده گابا A) در موشهای صحرایی را تشدید می کند. مطالعه برروی پیش درمانی با مرفین سولفات روی تظاهرات EEG حمله ایجاد شده بوسیله بیکوکولین در موشهای صحرایی freely moving یک اثر دوفازی وابسته به دوز از مرفین را نشان داد (۵،۸).

صرع در اثر به هم خوردن تعادل بین سیستمهای تحریکی و مهارتی بوجود می آید. مهمترین سیستم تحریکی مغز گلوتامات و مهمترین سیستم مهارتی گابا می باشد. در یکی از دو حالت زیر حملات صرعی می تواند ایجاد شود: (۱) کاهش فعالیت سیستم گاباژیک (۲) افزایش فعالیت سیستم گلوتاماترژیک (۶،۷،۹،۱۰). جالب اینکه هردو سیستم فوق الذکر تحت تاثیر مرفین و سیستم اپیوئیدی مغز قرار می گیرند (۸-۱۰).

بنابراین هدف از انجام این مطالعه تعیین اثر دوزهای مختلف مرفین در حمله صرعی ایجاد شده بوسیله مدل $Low Mg^{2+}$ Artificial CerebroSpinal Fluid (ACSF)

از سالم و پایدار بودن بافت، برای ایجاد فعالیتهای صرعی با ACSF با منیزیم کم پرفیوز شد. در ادامه بسته به نوع آزمایش داروها به محلول پرفیوزن اضافه شده و در نهایت شستشوی دارو از بافت از طریق تغییر محلول به ACSF با منیزیم کم بدون دارو انجام شد. در هر گروه حداقل ۸ هیپوکامپ با جواب قابل قبول آزمایش شده و گروههای مورد آزمایش بر اساس غلظت و نوع داروی مورد استفاده تعیین شدند. برای هر غلظت مورد استفاده از دارو (مرفین و نالوکسان) یک گروه آزمایش در نظر گرفته شد (۶ گروه کلی) و برای هر کدام از گروههای اصلی، حداقل سه زیر گروه: کنترل، دارو و شستشو مورد مطالعه قرار گرفت.

ثبت الکتروفیزیولوژی: به کمک میکروپپیت شیشه‌ای پر شده از محلول NaCl (۱۵۰ میلی مول) و با مقاومت الکتریکی ۳ تا ۵ مگا اهم ($M\Omega$) از نواحی مختلف هیپوکامپ به ویژه ناحیه CA1 ثبت خارج سلولی به عمل آمد. نوک میکروپپیت در ناحیه stratum pyramidale گذاشته شد. میزان جریان مایع پرفیوزن $5\text{ml}/\text{min}$ و درجه حرارت مایع در 34 درجه سانتی‌گراد حفظ شد. فعالیتهای صرعی که قبلاً توسط محققین دیگر (۱۰، ۱۱، ۱۷) وقایع شبه حمله یا SLE نامیده شده بوسیله ACSF Low Mg^{2+} القاء و بطور مستمر ثبت شد. زمان ثبت ۱۵ دقیقه بعد از انتقال بافت به محفظه ثبت شروع شد و بسته به نوع آزمایش ۴۵ دقیقه تا سه ساعت ادامه یافت. البته هر ۱۰ تا ۲۰ دقیقه به صورت یک فایل مجزا ذخیره شد. امواج ثبت شده به کمک آمپلی فایر Axoclamp 2A (Axon Instruments) تقویت و فیلتر (1 kHz) شد. پتانسیل‌های میدانی قبل و بعد از ایجاد امواج صرعی و همینطور قبل و بعد از بکار بردن داروها ثبت شد. امواج ثبت شده بوسیله برنامه نرم‌افزاری P Clamp version 8.2 (Axon Instruments) از نظر متغیرهای طول مدت یک حمله و درصد حمله قبل و بعد از بکار بردن داروها مورد بررسی قرار گرفت.

$100 \times \text{کل زمان ثبت} / \text{جمع زمان حمله} = \text{درصد حمله}$
در این مطالعه اثر غلظتهای مختلف مرفین سولفات (۱۰، ۳۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکرو مول) بر فعالیت هیپوکامپ کامل جدا شده به صورت In vitro بررسی شد.

یک آزمایش ساده برای کنترل هیپوکسی: کاهش میزان اکسیژن در مایع بین سلولی و در نتیجه کاهش فشار اکسیژن داخل سلولی وضعیت اکسیداسیون و احیای داخل سلولی بویژه میتوکندریای را تغییر داده و از القاء پتانسیلهای تحریکی جلوگیری می‌کند (۱۸). پتانسیلهای القاء شده سیناپسی (SEP) Synaptic Evoked Potentials به جز هنگام هیپوکسی معمولاً همیشه در هیپوکامپ کامل می‌تواند ایجاد شود. در واقع SEP در مقایسه با سایر فعالیتهای هیپوکامپ بیشترین حساسیت را به هیپوکسی نشان می‌دهد (۱۹، ۱۸، ۱۲). منظور از SEP فعالیتهای الکتریکی می‌باشد که پس از تحریک مسیر کولترالهای ارسالی از ناحیه CA3 به ناحیه CA1 بوسیله الکتروود فلزی، از سیناپس بین این مسیر و نرونهای پیرامیدال لایه CA1 عبور کرده و باعث تحریک نرونهای هرمی این ناحیه می‌شود که بوسیله الکتروود شیشه‌ای قابل ثبت می‌باشد. وقتی بافت هیپوکسیک شود فعالیتهایی ictal و interictal ایجاد شده ولی SEP بوجود نمی‌آید. بنا بر این در تمام آزمایشات این مرحله سلامت بافت از نظر هیپوکسی بوسیله SEP آزمایش شد و اگر در یک نمونه این آزمایش منفی بود، اطلاعات مربوط به آن نمونه در آنالیز وارد نشد.

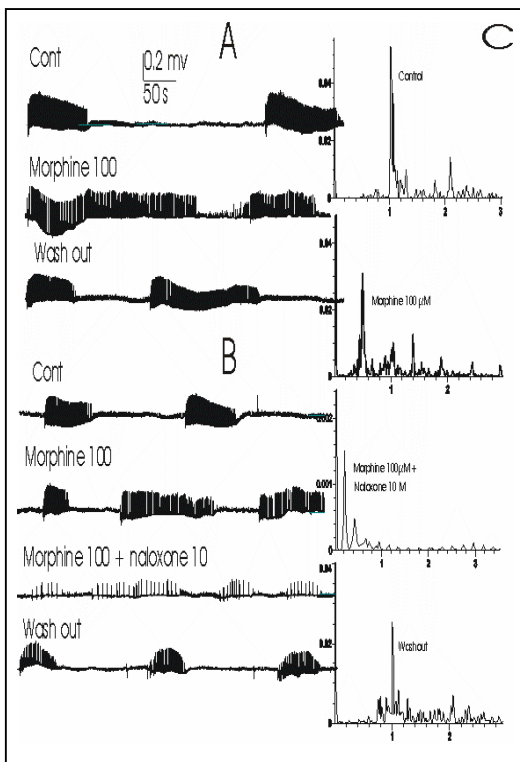
تجزیه و تحلیل آماری: طول مدت یک حمله و درصد حمله در فعالیتهای ثبت شده بوسیله آزمون ANOVA یک طرفه و در صورت وجود تفاوت معنی‌دار از طریق تست تعقیبی Tukey مطالعه شد. در هر مورد $p < 0.05$ معنی‌دار تلقی شد و نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ نشان داده شدند.

نتایج:

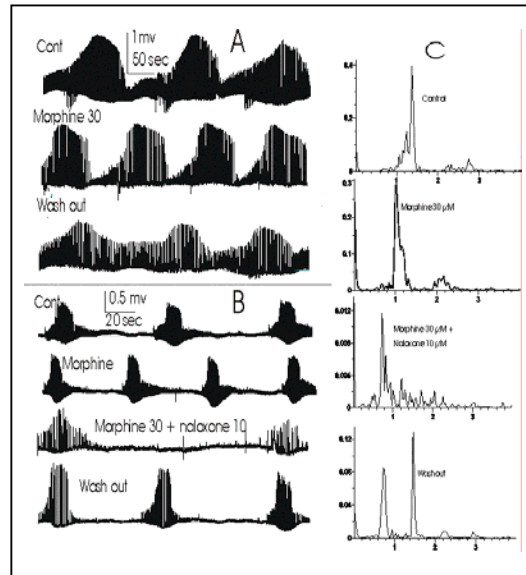
یافته‌های ذکر شده در این مطالعه حداقل حاصل از ۸ آزمایش مستقل می‌باشد. بنابراین هر جا که تعداد نمونه ذکر نشده $n = 8$ می‌باشد.
مرفین با غلظت $30\mu\text{M}$ و $100\mu\text{M}$ فعالیت صرعی را تشدید کرد: غلظت‌های مختلف مرفین اثرات متفاوتی روی فعالیت هیپوکامپ کامل گذاشت. مرفین با غلظت $30\mu\text{M}$ به طور عمده با طولانی کردن طول مدت فعالیت صرعی ($p < 0.01$) باعث تشدید فعالیتهای هیپوکامپ کامل شد (شکل ۱ و جدول ۱).

متناوب به حالت صرعی ممتد (SE) Status Epilepticus شد.

مرفین با غلظت $100\ \mu\text{M}$ در ۶ تا ۱۰ نمونه باعث تشدید حمله شد که به طور عمده با طولانی کردن زمان حمله (شکل ۲ و جدول ۱) و یا افزایش تعداد حمله ها در یک فاصله زمانی معین همراه بود (شکل ۲ B). در حالی که در بقیه نمونه ها باعث تضعیف حمله شد و یا اثر محسوسی نداشت. اثرات تشدید کننده مرفین با غلظتهای $30\ \mu\text{M}$ و $100\ \mu\text{M}$ بعد از شستشوی بافت برگشت پذیر بود.



شکل ۴: اثر مرفین $100\ \mu\text{M}$ بر فعالیت صرعی هیپوکامپ کامل در موش ۱۵ روزه بصورت *in vitro*. ابتدا فعالیت صرعی بر قرار شد (بالا) سپس مرفین اضافه شده (وسط) و washout صورت گرفت (پائین). (B) شبیه پانل A بوده با این تفاوت که مرفین $100\ \mu\text{M}$ و نالوکسان $10\ \mu\text{M}$ همزمان بافت را مشروب می کند. در هر دو پانل مرفین فعالیت صرعی را تشدید کرده که با washout برگشت پذیر بوده است. (C) FFT (fast Fourier transform) مربوط به پانل B نمایش داده شده، مرفین $100\ \mu\text{M}$ فرکانس فعالیت صرعی را از $1/1$ هرتز به $0/5$ هرتز رسانده است. ترکیب مرفین و نالوکسان فرکانس را باز هم بیشتر کم کرده و به $0/2$ هرتز رسانده است. مجدداً بعد از washout فرکانس به $1/1$ هرتز رسیده است.



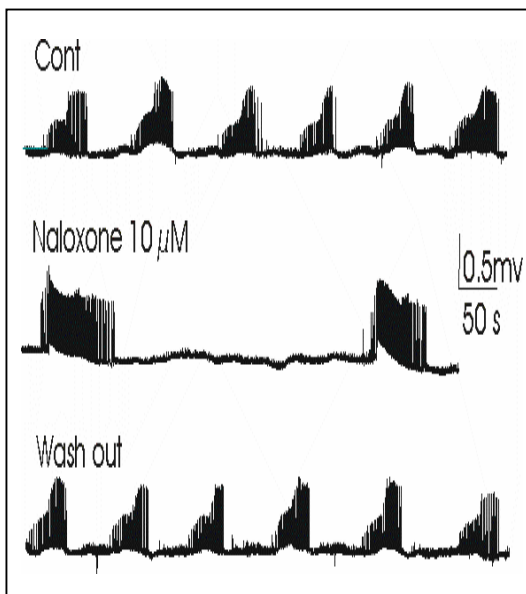
شکل ۱: اثر مرفین $30\ \mu\text{M}$ بر فعالیت صرعی هیپوکامپ کامل در موش ۱۳ روزه *in vitro*. (A) فعالیت صرعی در Low Mg^{2+} ACSF بر قرار شده (بالا) مرفین اضافه شد (وسط)، مرفین بوسیله Low Mg^{2+} ACSF شسته شد (پائین). (B) شبیه پانل A بوده با این تفاوت که یک مرحله بیشتر شامل مرفین $30\ \mu\text{M}$ و نالوکسان $10\ \mu\text{M}$ همزمان بافت را مشروب می کند. در هر دو پانل مرفین فعالیت صرعی را تشدید کرده که با washout برگشت پذیر بوده است. (C) Fast Fourier Transform مربوط به پانل B نمایش داده شده، مرفین فرکانس فعالیت صرعی را از $1/5$ هرتز به 1 هرتز رسانده است. ترکیب مرفین و نالوکسان فرکانس را باز هم بیشتر کم کرده و به $0/8$ هرتز رسانده است.

جدول ۱: اثر غلظتهای مختلف مرفین به تنهایی یا همراه با نالوکسان $10\ \mu\text{M}$ بر فعالیت صرعی هیپوکامپ کامل موش به صورت *In vitro*

مرفین	درصد زمان حمله			
	$10\ \mu\text{M}$	$30\ \mu\text{M}$	$100\ \mu\text{M}$	$200\ \mu\text{M}$
کنترل	$58/6 \pm 3/32$	$42/28 \pm 2/73$	$32/31 \pm 2/62$	$39/8 \pm 4/45$
مرفین	$48/3 \pm 2/21$	$73/82 \pm 6/29$	$56/75 \pm 3/10$	$17/0 \pm 3/88$
مرفین + نالوکسان	$69/3 \pm 2/20$	$32/64 \pm 6/62$	$21/0 \pm 2/36$	$16/0 \pm 2/68$
شستشو	$72/3 \pm 3/53$	$43/91 \pm 2/23$	$48/43 \pm 3/12$	$41/9 \pm 2/45$
طول مدت حمله (ثانیه)				
کنترل	$81/3 \pm 2/76$	$61/0 \pm 2/52$	$70/63 \pm 8/31$	$63/92 \pm 2/53$
مرفین	$66/5 \pm 2/32$	$98/0 \pm 6/51$	$124/3 \pm 14/76$	$41/29 \pm 2/72$
مرفین + نالوکسان	$61/5 \pm 1/36$	$54/0 \pm 9/16$	$54/67 \pm 9/5$	$42/14 \pm 3/45$
شستشو	$62/2 \pm 2/15$	$80/78 \pm 6/25$	$58/86 \pm 6/7$	$89/2 \pm 5/41$

داده ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ می باشد.

همچنین مرفین $30\ \mu\text{M}$ فرکانس مرحله تونیک حمله را کاهش داد ($p < 0/01$) و در بعضی موارد باعث تبدیل حمله



شکل ۴: اثر نالوکسان ۱۰ μM بر فعالیت صرعی هیپوکامپ کامل در موش ۱۵ روزه بصورت *in vitro*. ابتدا فعالیت صرعی در ACSF Low Mg²⁺ بر قرار شد (بالا-کنترل)، سپس به محلول پرفیوژن نالوکسان اضافه شده (وسط) و washout انجام شد (پائین). نالوکسان ۱۰ μM تعداد حمله ها را به شدت کاهش داد. در این نمونه ۶ حمله (کنترل) به ۲ حمله (نالوکسان) کاهش یافته است

جدول ۲: اثر نالوکسان بر فعالیت صرعی هیپوکامپ در موش

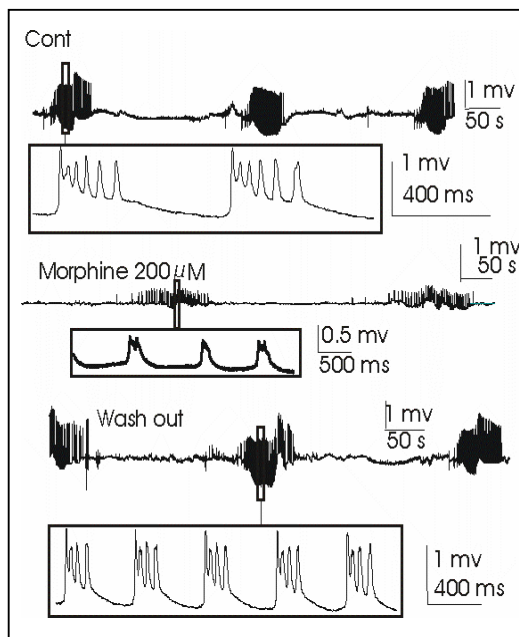
نالوکسان		
۱۰ μM	۵ μM	
		درصد زمان حمله
۷۰/۲±۴/۷۸	۵۹/۱۱±۳/۴۹	کنترل
۴۹/۳±۳/۷۵	۶۲/۲۲±۴/۸۱	نالوکسان
۶۷/۱±۴/۵۲	۶۶/۱۸±۳/۶۹	شستشو
		طول مدت حمله (ثانیه)
۱۱۸/۱±۸/۳۶	۹۸/۷۸±۹/۷	کنترل
۷۳/۵۶±۳/۴۶	۱۰۲/۲±۱۰/۲۳	نالوکسان
۸۴/۶۱±۳/۶۷	۱۰۵/۱±۸/۸۶	شستشو

داده ها به صورت Mean±SEM می باشد. (P<۰/۰۱)

استفاده توأم نالوکسان ۱۰ μM و مرفین با غلظت‌های ۱۰۰ μM، ۳۰ μM نه تنها اثرات تحریکی و تشدید مرفین را حذف کرد، بلکه در مقایسه با حالت کنترل باعث تضعیف فعالیت صرعی هیپوکامپ کامل شد (جدول ۱، شکل ۱-B-۱ و ۲-B).

استفاده توأم مرفین ۱۰ μM و نالوکسان ۱۰ μM اثرات مهاری ایجاد شده توسط مرفین را حذف کرد (جدول ۱). هیچ کدام از غلظت‌های قید شده مرفین در این مطالعه هنگام استفاده در داخل ACSF نرمال نتوانست فعالیت

مرفین با غلظت ۱۰ و ۲۰۰ میکرومول فعالیت صرعی را تضعیف کرد: مرفین ۲۰۰ μM باعث تضعیف فعالیت‌های هیپوکامپ شد. یعنی طول مدت حمله و درصد زمان حمله را کاهش داد (p<۰/۰۱). همچنین فرکانس فعالیت‌های Ictal، Interictal و Intraburst را کم کرد (شکل ۳ و جدول ۱). از طرف دیگر غلظت ۱۰ μM مرفین فرکانس، دامنه و طول مدت حمله را کاهش داد (p<۰/۰۱).



شکل ۳: اثر مرفین ۲۰۰ μM بر فعالیت صرعی هیپوکامپ کامل در موش ۱۶ روزه بصورت *in vitro*. ابتدا فعالیت صرعی در ACSF Low Mg²⁺ بر قرار شد (بالا-کنترل) سپس به محلول پرفیوژن مرفین اضافه شده (وسط) و washout انجام شد (پائین). در هر قسمت یک ناحیه بزرگ شده نمایش داده شده که امواج صرعی در آن به شکل باز شده و مجزا قابل مشاهده است. مرفین ۲۰۰ μM بطور واضح bursting activity را تضعیف کرده و فرکانس آن را از ۲۰ هرتز (بالا) به ۴ هرتز (وسط) رسانده است. مجدداً در هنگام washout فرکانس امواج مذکور به ۱۸ هرتز افزایش یافته است.

اثرات مهاری مرفین ۱۰ و ۲۰۰ میکرومول بعد از شستشو برگشت پذیر بود (جدول ۱). غلظت ۵ μM نالوکسان اثر محسوسی روی فعالیت هیپوکامپ نداشت اما مصرف نالوکسان ۱۰ μM فرکانس و دامنه فعالیت‌های interictal و Ictal را کاهش داد (شکل ۴)، به علاوه درصد و طول مدت حمله به طور محسوسی (p<۰/۰۱) کم شد (جدول ۲). اثرات مهاری نالوکسان ۱۰ μM بعد از شستشو برگشت پذیر بود.

با عمل گیرنده اپیوئیدی μ تداخل ایجاد می کند (۲۸،۲۹). تعدادی از مطالعات بوضوح مطرح می کنند که اپیوئیدها می توانند مستقیماً وقایع الکتروفیزیولوژیکی ایجاد شده بوسیله گیرنده NMDA در CNS را تنظیم و تعدیل کنند. در یک آزمایش به منظور ثبت خارج سلولی از نرونهای Trigeminal موش صحرایی، ابتدا تحریکات ایجاد شده بوسیله گیرنده NMDA در نرونهای on-nociceptive و nociceptive برقرار شد. استفاده DAMGO (آگونیست گیرنده μ) با روش Microiontophoretic باعث مهار تحریکات ایجاد شده بوسیله NMDA در هر دو نوع نرون شد که بوسیله نالوکسان برگشت پذیر بود (۳۱،۳۲،۳۰،۱۶). بطور مشابهی اثر مرفین و DAMGO روی دو پدیده الکتروفیزیولوژیکی امتحان شد که قبلاً به عنوان اعمال میانجی گری شده بوسیله NMDA شناخته شده بودند. کشیدن پا به طرف بالا و تخلیه ایмпالسها در فاز دوم درد ایجاد شده بوسیله فرمالین (هنگام تزریق فرمالین به پنجه حیوان) هر دو بوسیله NMDA میانجیگری می شوند. مرفین یا DAMGO هر دو پدیده فوق را مهار کردند. نتایج ما در مطالعه حاضر با این اثرات مهاری گیرنده اپیوئیدی μ سازگار می باشد. از آنجاکه گیرنده NMDA یکی از عوامل مهم ایجاد حمله در هیپوکامپ می باشد، این احتمال وجود دارد که فعال شدن گیرنده μ به طریقی با مهار کردن اعمال گیرنده NMDA اثر مهاری خود را بر فعالیت صرعی ایجاد شده بوسیله $Low Mg^{2+}$ ACSF اعمال کرده باشد. یکی از راههای شناخته شده اثر مرفین از طریق گیرندههای اپیوئیدی موجود در بدن می باشد. تمایل این گیرندهها به مرفین وسایر مواد مؤثر بر آنها یکسان نیست. تمایل گیرنده μ به مرفین ۱۰ بار بیشتر از گیرنده کاپا بوده و تمایل گیرنده کاپا، ۵ بار از گیرنده دلتا بیشتر است (۳۴،۳۳،۱۷). از این رو، منطقی به نظر می رسد که هنگام استفاده از داروهای مؤثر بر این گیرندهها، در غلظت های پائین ابتدا گیرنده μ تحریک شود. بنابراین احتمالاً مرفین با غلظت $100 \mu M$ از طریق گیرنده μ اثرات مهاری خود را اعمال کرده است.

اثر تحریکی مرفین با غلظت متوسط بر فعالیت صرعی هیپوکامپ: هنگام استفاده از غلظتهای بیشتر مرفین ($30 \mu M$ ، $100 \mu M$) نوبت به گیرنده های کاپا می رسد که تمایل آنها کمتر از گیرنده μ بوده و احتمالاً با غلظت

صرعی ایجاد شده بوسیله $Low Mg^{2+}$ ACSF را حفظ کند و در نتیجه پرفیوژن هیپوکامپ با ACSF نرمال به همراه غلظتهای مختلف مرفین باعث حذف فعالیت صرعی شد (نتایج نشان داده نشده است).

بحث:

در این مطالعه، هیپوکامپ کامل موش سوری با تمام مدارهای نورونی داخلی آن مورد استفاده قرار گرفت (۲۱،۲۰،۱۳) و یافته های اصلی آن عبارتند از:

- غلظت کم وزیاد مرفین ($10 \mu M$ و $200 \mu M$) حمله صرعی را تضعیف کرد.
- غلظتهای متوسط مرفین ($30 \mu M$ و $100 \mu M$) باعث تشدید حمله صرعی شد.
- نالوکسان با غلظت $10 \mu M$ باعث تضعیف حمله صرعی شد.
- استفاده توأم مرفین و نالوکسان فعالیت صرعی هیپوکامپ را تضعیف کرد.

الف: اثر مهاری مرفین $10 \mu M$ بر فعالیت صرعی هیپوکامپ کامل ایزوله: چندین عمل شناخته شده برای گیرنده اپیوئیدی μ وجود دارد که تقریباً همه آنها، اثرات مهاری هستند مثل: ضددردی، دپرسیون تنفسی، میوزیس، افوریا و کاهش حرکات معده و روده (۲۳،۲۲،۱۴). گیرنده های اپیوئیدی μ به کانالهای پتاسیمی وصل بوده و از طریق باز کردن این کانالها باعث هیپرپولاریزاسیون سلولهای می شود (۲۵،۲۴،۵). شواهد رو به تزاید بیان کننده آن هستند که گیرنده NMDA می تواند تحت تاثیر اپیوئیدها قرار گیرد. نشان داده شده که تنظیم کاهشی محللای اتصال DAMGO بدنبال انفوزیون مداوم مرفین در موش صحرایی با مصرف MK-801 (آگونیست غیررقابتی گیرنده NMDA) بلوکه می شود، اما D-Ap5 آنتاگونیست رقابتی گیرنده NMDA این اثر را ندارد (۲۷،۲۶،۱۶،۱۵). با توجه به نتایج حاصل از مطالعات اتصال گیرندهها به صورت *in vitro* مشخص شده است که بعضی از آگونیستهای گیرنده های اپیوئیدی و آنتاگونیستهای گیرنده NMDA محللای اتصال مشترکی دارند (۱۶). مطالعه دیگری نشان داده که استفاده از آنتاگونیست گیرنده تاکی کینین رها شدن استیل کولین با میانجیگری گیرنده NMDA را کاهش می دهد و این اثر

غلظتهای متوسط درمانی ممکن است باعث تشدید فعالیت صرعی شود و بنابراین در بیماران صرعی باید با احتیاط بیشتری مصرف گردد. بر عکس، نالوکسان اثرات ضد صرعی نشان داده و احتمالا می تواند در این مورد مفید واقع شود. پیشنهاد می شود برای روشن شدن موضوع مطالعات بیشتری در این زمینه انجام گیرد.

سپاسگزاری:

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی تحت حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه می باشد که بدین وسیله تقدیر و تشکر بعمل می آید.

منابع:

- Solbrig MV, Koob GF. Epilepsy, CNS viral injury and Dynorphin. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 98-104.
- Morgan RJ, Soltesz I. Nonrandom connectivity of the epileptic dentate gyrus predicts a major role for neuronal hubs in seizures. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105: 6179-84.
- Hashizume T, Haglof SA, Malven PV. Intracerebral methionine-enkephalin, serum cortisol, and serum beta-endorphin during acute exposure of sheep to physical or isolation stress. *J Anim Sci* 1994;72(3):700-8.
- Ahmad I, Pleuvry, BJ. Interaction between opioid drugs and propofol in laboratory models of seizures. *Br J Anesth* 1995;74: 311-314.
- Yajima Y, Narita M, Takahashi-Nakano Y, Misawa M, Nagase H, Mizoguchi H. Effects of differential modulation of mu, delta- and kappa-opioid systems on bicuculline-induced convulsions in the mouse. *Brain Res* 2000;862: 120-6.
- Engel JJR, Excitation and inhibition in epilepsy. *Can J Neurol Sci* 1996;23:167-174.
- Holmes GL, Epilepsy in the developing brain: lessons from the laboratory and clinic. *Epilepsia* 1997;38:12-30.
- Collingridge GL, Singer W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci* 1990;11:290-296.
- Jahromi SS, Wentlandt K, Piran S, Carlen PL. Anticonvulsant actions of gap junctional blockers in an in vitro seizure model. *J Neurophysiol* 2002;88:1893-902.
- Quilichini PP, Diabira D, Chiron C, Ben-Ari Y. Persistent epileptiform activity induced by low Mg^{2+} in intact immature brain structures. *Eur J Neurosci* 2002;16:850-860.
- Avolli MD, 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.
- Wu C, Shen H., Zhang L. A fundamental oscillatory state of isolated rodent hippocampus. *J*

پائین مرفین به اندازه کافی تحریک نشده است. بنا براین با افزایش غلظت مرفین گیرنده کاپا نیز تحت تاثیر قرار می گیرد. گزارش شده که آگونیست اختصاصی گیرنده کاپا (دینورفین A) بر روی SLEs اثر تحریکی دارد(۳۵). بنابراین این احتمال وجود دارد که مرفین با غلظت ($30\mu M$ و $100\mu M$) از طریق گیرنده کاپا اثرات تحریکی خود را اعمال کند. به علاوه مشخص شده که مرفین می تواند اثرات خود را بصورت غیر مستقیم از طریق تعدیل گیرنده های GABA و NMDA اعمال کند(۵،۱۸،۳۶). براساس نتایج به دست آمده از این مطالعه و مطالعات سایر محققین(۳۹-۳۷)، به نظر می رسد که فعال کردن گیرنده های اپیوئیدی با مرفین ($30\mu M$ و $100\mu M$) منجر به کاهش آزاد شدن گابا از اینترنرونهای مهار کننده گاباژژیک هیپوکامپ می شود. بنابراین از طریق مهار- مهار نرونهای پیرامیدال هیپوکامپ باعث تشدید اپی لپسی ایجاد شده در مدل Low Mg^{2+} ACSF می گردد.

بالاخره مرفین با غلظت $200\mu M$ شاید از طریق اثر بر گیرنده های دلتا اثرات مهارتی خود را ایجاد کرده است. نتایج پژوهش سایر محققین نشان می دهد که اعمال گیرنده دلتا بسیار شبیه به گیرنده μ بوده و از طریق اتصال به کانالهای پتاسیمی و ایجاد هیپریپولاریزاسیون عمل می کند(۵،۱۷،۳۷). بنابراین طبق یافته های سایر محققین اثر گیرنده دلتا مهارتی بوده و آگونیستهای آن می توانند اثرات مهارتی بروز دهند. مرفین با غلظت $200\mu M$ احتمالاً با اثر بر گیرنده دلتا فعالیت صرعی هیپوکامپ را تضعیف کرده است. به هر حال نتایج ما نشان داد که اثرات مرفین بر فعالیت صرعی وابسته به دوز می باشد که با نتایج بعضی از مطالعات سازگار و با دسته دیگر مغایر می باشد. در این مطالعه اثر مرفین بر اپی لپسی سه فازی بود (مهارتی- تحریکی - مهارتی) در حالیکه بعضی از مطالعات یک اثر دو فازی را گزارش کرده اند(۵،۳۸).

مکانیسمهای مولکولی بیانگر نحوه بروز پدیده های بیولوژیک هستند. با توجه به اثرات گسترده مرفین در انسان و جانوران، آشکار شدن بیشتر جزئیات اثر مرفین و ترکیبات وابسته می تواند در کشف راههای مؤثرتر درمانی و جلوگیری از بروز برخی عوارض دارو درمانی مفید واقع شود.

نتیجه نهایی:

با توجه به یافته ها می توان گفت که مرفین در

- Physiology 2002;540:509-527.
13. Luhman HJ, Dzhalal VI, Quilichini Y. Generation and propagation of 4-AP-induced epileptiform activity in neonatal intact limbic structures in vitro. *Eur J Neuroscience* 2000; 12: 2757-2768.
 14. Katzung BG, Trevor AJ. *Pharmacology: examination & board review*. 5th ed. : Prentice-Hall International Inc. 2001: 174.
 15. Wagner JJ. Endogenous dynorphins inhibit excitatory neurotransmission and block LTP induction in the hippocampus. *Nature* 1993;363: 451-454.
 16. Mao J, Price DD, Lu J, Mayer DJ. Antinociceptive tolerance to the mu-opioid agonist DAMGO is dose-dependently reduced by MK-801 in rats. *Neurosci Lett* 1998; 250: 193-196.
 17. Gilman AG. *The pharmacological basis of therapeutics*. 11th ed. New York: Macmillan , 2001: 245.
 18. Huchzermeyer C, Albus K, Gabriel HJ, Otáhal J, Taubenberger N, Heinemann U, et al. Gamma oscillations and spontaneous network activity in the hippocampus are highly sensitive to decreases in pO₂ and concomitant changes in mitochondrial redox state. *J Neurosci* 2008; 28(5): 1153-62.
 19. Atapour N, Niazi M. Chemical kindling and seizure susceptibility in morphine dependent rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 2000;10:483-7.
 20. Lufty K, Woodward RM, Keana J F, Weber E. Inhibition of clonic seizure-like excitatory effects induced by intrathecal morphine using two NMDA receptor antagonists: MK-801 and ACEA-1011. *Eur J Pharmacol* 1994;252: 261-6.
 21. Aghajanian MK, Takemori AE. Changes in adenosine receptor sensitivity in morphine-tolerant and dependent mice. *J Pharmacol Exper Ther* 1986;236:625-620.
 22. Devries TJ, Tjon Tien Ril, Van Der Laan, J W. chronic exposure to morphine and naloxone induces changes in catecholaminergic neurotransmission in rat brain without altering mu opioid receptor sensitivity. *Life Science* 1993;52:1685-1693.
 23. Madamba SG. Dynorphin selectively augments the M-current in hippocampal CA1 neurons by an opiate receptor mechanism. *J Neurophysiol* 1999; 82: 1768-1775.
 24. Agustina CM, Rafael VM. Effects of chronic morphine and N-cyclopentyl-adenosine administration on kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Res* 2001; 44: 89-96.
 25. Caudle RM, Chavkin C, Dubner R. Kappa 2 opioid receptors inhibit NMDA receptor-mediated synaptic currents in guinea pig CA3 pyramidal cells. *J Neurosci* 1994;14:5580-5589.
 26. Chen L, Gu Y, Huang LY. The mechanism of action for the block of NMDA receptor channels by the opioid peptide, dynorphin. *J Neurosci* 1995;15:4602-4611.
 27. Chen L, Gu Y, Huang LY. The opioid peptide dynorphin directly blocks NMDA receptor channels in the rat. *J Physiol* 1995; 482: 575-581.
 28. Pérez S, Tierney A, Deniau JM, Kemel ML. Tachykinin regulation of cholinergic transmission in the limbic/prefrontal territory of the rat dorsal striatum: implication of new neurokinine 1-sensitive receptor binding site and interaction with enkephalin/mu opioid receptor transmission. 2007; 103(6): 2153-63.
 29. Voorn P, van de Witte SV, Li K, Jonker AJ. Dynorphin displaces binding at the glycine site of the NMDA receptor in the rat striatum. *Neurosci Lett* 2007;415(1):55-8.
 30. Gannon RL, Terrian DM. U-50,488H inhibits dynorphin and glutamate release from guinea pig hippocampal mossy fiber terminal. *Brain Res* 1991;548: 242-247.
 31. Harrison JM, Allen RG, Pellegrino MJ, Williams JT, Manzoni OJ. Chronic morphine treatment alters endogenous opioid control of hippocampal mossy fiber synaptic transmission. *J Neurophysiol* 2002;87:2464-70.
 32. Linseman MA, Corrigan WA. Effects of morphine on CA1 versus dentate hippocampal field potentials following systemic administration in freely-moving rats. *Neuropharmacology* 1982; 21: 361-6.
 33. Madison DV, Nicoll RA. Enkephalin hyperpolarizes interneurons in the rat hippocampus *J Physiol* 1988;398:123-30.
 34. Massotti M, Gale K. Electroencephalographic evidence for a dose-related biphasic effect of morphine on bicuculline-induced seizures in the rat. *Epilepsy Res*. 1989;4:81-9.
 35. Saboory E, Derchansky M, Ismaili M, Jahromi SS, Brull R, Carlen PL, et al. Mechanisms of morphine enhancement of spontaneous seizure activity. *Anesth Analg* 2007;105:1729-35
 36. Perry DC, Grimes LM. Administration of kainic acid and colchicine alters mu and lambda opiate binding in rat hippocampus. *Brain Res* 1989;477: 100-8.
 37. Rocha L, Ackermann R F, Engel J Jr. Effects of chronic morphine pretreatment on amygdaloid kindling development, postictal seizure and suppression and benzodiazepine receptor binding in rats. *Epilepsy Res* 1996;23:225-33.
 38. Simonato M and Romualdi P. Dynorphin and epilepsy. *Prog Neurobiol* 1996;50: 557-583.
 39. Simmons ML, Terman GW, Drake CT, Chavkin C. Inhibition of glutamate release by presynaptic kappa 1 opioid receptors in the guinea pig dentate gyrus. *J Neurophysiol* 1994; 72: 1697-1705.