

اثر مرفین بر فرکانس تشنج هیپوکامپی در نوزاد موش به صورت *in vitro*دکتر احسان صبوری<sup>۱</sup>، دکتر مهزاد مهرزاد صدقیان<sup>۲</sup>، دکتر مجتبی کریمی پور<sup>۳</sup>، دکتر جواد میرزا آقازاده<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت ۸۴/۱۱/۲۹، تاریخ پذیرش ۸۵/۰۵/۱۱

## چکیده

پیش‌زمینه و هدف: هدف از انجام این مطالعه تعیین اثر مرفین بر فرکانس حملات صرعی ایجاد شده به وسیله مایع مغزی نخاعی با منیزیم پائین در هیپوکامپ کامل نوزاد موش سوری در خارج بدن بوده است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق موش‌های نوع C57/BL6 ۱۱ تا ۱۹ روزه مورد استفاده قرار گرفت (n=۲۵). هیپوکامپ زنده به صورت سالم و دست نخورده با دقت از بقیه مغز جدا شد و در ACSF1 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 دریافت شد. ثبت الکتروفیزیولوژیک به طور عمده از لایه هومی در ناحیه CA1 به عمل آمد. فعالیت‌های صرعی از نظر فرکانس اجزای مختلف حمله مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: همگی غلظت‌های استفاده شده مرفین در این مطالعه و نالوکسان با غلظت ۱۰ μM فرکانس تمام اجزای حمله، بخصوص قسمت تونیک را کم کرد. نالوکسان نه تنها اثرات مرفین بر فرکانس امواج صرعی را مسدود نکرد، بلکه فرکانس فعالیت‌های صرعی را بیشتر کاهش داد. همچنین استفاده توام مرفین و نالوکسان باعث حذف کامل قسمت تونیک-کلونیک فعالیت صرعی شد.

بحث و نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد که مرفین شاید از راهی به جز گیرنده‌های شناخته شده اپیوئیدی باعث کاهش فرکانس حملات صرعی شده، زیرا نالوکسان به عنوان آنتاگونیست عمومی این گیرنده‌ها توانست جلو اثر مهار مرفین را بگیرد.

کل واژگان: هیپوکامپ کامل، مرفین، نالوکسان، صرع، فرکانس، ACSF با منیزیم کم

مجله پزشکی ارومیه، سال هفدهم، شماره سوم، ص ۲۰۲-۱۹۶، پاییز ۱۳۸۵

آدرس مکاتبه: ارومیه- دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی دکتر احسان صبوری تلفن: ۲۷۷۰۶۹۸- فاکس ۲۷۸۰۸۰۱

E-mail: saboory@umsu.ac.ir

## مقدمه

صرع به مقدار ناچیزی روشن شده و اتفاق نظر در مورد مکانیسم بیماری وجود ندارد (۲،۳،۴).

اثرات پیچیده ای از مرفین روی حمله صرعی گزارش شده است. اثرات تشدید کننده و تضعیف کننده حمله صرعی بر حسب نوع و شرایط آزمایش از مرفین دیده شده است (۵،۶،۷). شاخص‌های EEG حمله ایجاد شده به وسیله بیکوکولین در موش‌های صحرایی اثر دوفازی وابسته به دوز مرفین را نشان داده است (۶،۸،۹). صرع در اثر به هم خوردن تعادل بین سیستم‌های تحریکی و مهارتی به وجود می‌آید. مهمترین سیستم تحریکی مغز،

صرع لوب گیجگاهی شایع‌ترین صرع کانونی در کودکان و بزرگسالان می باشد. حملات ممکن است از نواحی جانبی، تحتانی و یا داخلی لوب گیجگاهی شروع شود. این عارضه از نظر علت، سن شروع، نوع تشنج، شدت و مدت حمله بسیار متنوع است. از علت‌های اصلی این عارضه می توان به اسکروزیس مدیال، نئوپلاسم‌ها، بیماری عروقی و اختلالات تکاملی مغز اشاره کرد (۱،۲). داروهای جدید و پیشرفت‌های جراحی اعصاب در درمان قطعی این بیماری ناتوان هستند. مدار نرونی و پایه سلولی

<sup>۱</sup> استادیار گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

<sup>۲</sup> استادیار گروه زنان و مامائی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

<sup>۳</sup> استادیار گروه تشریح دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

<sup>۴</sup> استادیار گروه جراحی اعصاب دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

26 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgSO<sub>4</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 125 NaCl and 14 glucose

محلول دیگر Low Mg<sup>2+</sup> ACSF بود که برای ایجاد امواج صرعی مورد استفاده قرار گرفت که دارای محتویات زیر بود (بر حسب میلی مول):

26 NaHCO<sub>3</sub>, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 0.2 MgSO<sub>4</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 125 NaCl and 14 glucose

اسمولالیت محلول های به کار رفته در این مطالعه ۳۰۰ تا ۳۰۷ میلی اسمول بود (۱۰،۱۱،۱۶،۱۷).

ثبت الکتروفیزیولوژی: به کمک میکروپیت شیشه ای پر شده از محلول NaCl (۱۵۰ میلی مول) و با مقاومت الکتریکی ۳ تا ۵ مگا اهم (MΩ) از نواحی مختلف هیپوکامپ به ویژه ناحیه CA1 ثبت خارج سلولی به عمل آمد. نوک میکروپیت در ناحیه stratum pyramidale گذاشته شد. میزان جریان مایع ACSF ۵ ml/min و درجه حرارت مایع ۳۴ درجه سانتی گراد حفظ شد. فعالیت های صرعی که پیش از این توسط محققین دیگر (۱۲،۱۷،۱۸) وقایع شبه حمله یا (SLE)<sup>۱</sup> نامیده شده به وسیله Low Mg<sup>2+</sup> ACSF القاء و به طور مستمر ثبت شد. امواج ثبت شده به کمک آمپلی فایر Axo-clamp 2A تقویت و فیلتر (1kHz) شد. پتانسیل های میدانی قبل و بعد از ایجاد امواج صرعی و همینطور قبل و بعد از به کار بردن داروها ثبت شد. امواج ثبت شده به وسیله برنامه نرم افزاری P Clamp version 8.2 تجزیه و تحلیل شد. فرکانس اجزاء مختلف حمله (تونیک-کلونیک، کلونیک و bursting activity) قبل و بعد از به کار بردن داروها مورد بررسی قرار گرفت.

در این مطالعه اثر دوزهای مختلف مرفین سولفات (۱۰، ۳۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ میکرو مول) بر روی فعالیت هیپوکامپ کامل جدا شده به صورت *in vitro* بررسی شد.

**تجزیه و تحلیل آماری:** فرکانس انواع فعالیت های ثبت شده به وسیله آزمون ANOVA یک طرفه و در صورت وجود تفاوت معنی دار از طریق تست تعقیبی Tukey مطالعه شد. در هر مورد  $p < 0.05$  معنی دار تلقی شد. نتایج به صورت Mean ± SEM نشان داده شده اند.

کنترل سلامت هیپوکامپ هنگام آزمایش: پتانسیل های القاء شده سیناپسی (Synaptic evoked potentials=SEP) به جز هنگام هیپوکسی معمولاً همیشه در هیپوکامپ کامل می تواند ایجاد

سیستم مهاری، گابا می باشد. در هنگام کاهش فعالیت سیستم گابارژیک و یا افزایش فعالیت سیستم گلوتاماترژیک حمله صرعی می تواند بروز کند (۷،۱۰،۱۱). گزارش های متعددی اشاره می کنند که هردو سیستم فوق الذکر می توانند تحت تاثیر مرفین و سیستم اپیوئیدی مغز قرار بگیرند (۹،۱۰،۱۱). از آنجا که گزارش روشنی از اثر مرفین بر حمله صرعی ارائه نشده است، در این مطالعه سعی شد به تناقض های موجود پاسخ داده شود. برای ایجاد صرع از مدل ACSF Low Mg<sup>2+</sup> استفاده شد، زیرا در این مدل احتمالاً سیستم های نوروترانسمیتری مغز کمتر تحت تاثیر قرار می گیرد. کم بودن غلظت یون Mg<sup>2+</sup> در محلول ACSF موجب حذف انسداد موجود در کانال های کلسیمی گیرنده NMDA گلوتامات شده، در نتیجه باعث ورود کلسیم به داخل سلول و دپولاریزاسیون آن می گردد که در جای مناسب می تواند به شکل حمله صرعی آشکار گردد (۱۲،۱۳). بنابراین هدف از انجام این مطالعه تعیین اثر دوزهای مختلف مرفین بر فرکانس حمله صرعی ایجاد شده به وسیله مدل ACSF Low Mg<sup>2+</sup> در موش های نوزاد بود.

## مواد و روش ها

حیوانات و روش آزمایش: در این مطالعه از موش های نژاد C57/ black 6 استفاده شد (n=۲۵). تمام مراحل کار با حیوانات مطابق دستورالعمل استاندارد نگهداری و حمایت از حیوانات انجام شد. حیوانات با استفاده از گازها لوتان به طریق استنشاقی بی هوش شده و بلافاصله سر حیوان جدا شده و مغز خارج گردید و به مدت ۲ دقیقه در ACSF طبیعی سرد بادرجه حرارت ۴-۰ درجه سانتی گراد که به طور مرتب اکسیژنه می شد (۹۵٪ اکسیژن و ۵٪ دی اکسید کربن) قرار گرفت. هیپوکامپ ها با دقت و سرعت هر چه تمام تر خارج شده و به داخل ACSF طبیعی که به طور مرتب اکسیژنه می شد انتقال داده شده و حداقل به مدت یک ساعت (۱۱،۱۴،۱۵) 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 محفظه ثبت به طور مرتب به وسیله ACSF پر فیوژن شد (۱۱). در این مطالعه از دو نوع محلول ACSF استفاده کردیم. یکی از آنها ACSF معمولی بود که به هنگام خارج کردن هیپوکامپ، انکوباسیون و پرفیوژن استفاده می شد و دارای محتویات زیر بود (بر حسب میلی مول):

<sup>1</sup> Seizure Like Events

<sup>2</sup> Axon Instruments

<sup>3</sup> Axon Instruments

از آنجا که بیشتر نمونه‌ها، فاز تونیک را نداشتند و فقط شامل فاز تونیک-کلونیک و کلونیک بودند (شکل ۱)، تنها اطلاعات مربوط به دو قسمت آخر در آنالیز وارد شد. علاوه بر فرکانس دو قسمت ذکر شده، فرکانس *intraburst* نیز مورد آنالیز و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. فرکانس *intraburst* بیان کننده فرکانس فعالیت *bursting* می‌باشد.

یافته‌های ما نشان داد که همه غلظت‌های استفاده شده مرفین در این مطالعه و نالوکسان ( $10\mu\text{M}$ ) فرکانس حملات صرعی را کاهش داد. استفاده توأم غلظت  $100\mu\text{M}$  مرفین به همراه نالوکسان  $10\mu\text{M}$  فرکانس *intraburst* را بیشتر کاهش داده و جالب اینکه قسمت تونیک-کلونیک حمله را به طور کامل حذف نمود. مرفین با غلظت‌های ۳۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول به طور محسوسی ( $p < 0.03$ ) فرکانس فعالیت‌های تونیک-کلونیک را کاهش داد. جزئیات دقیق اثر مرفین بر فرکانس اجزای مختلف حمله در جدول ۱ نشان داده شده است.

**جدول شماره ۱:** اثر غلظت‌های مختلف مرفین به تنهایی و همراه با

نالوکسان  $10\mu\text{M}$  بر فرکانس اجزای مختلف حمله صرعی

در هیپوکامپ کامل موش، *in vitro* ( $p < 0.03$ ).

اجزای حمله	گروه‌ها	فرکانس (Hz)		
		مرفین $30\mu\text{M}$	مرفین $100\mu\text{M}$	مرفین $200\mu\text{M}$
تونیک-کلونیک	Control	$2.5 \pm 0.4$	$1.53 \pm 0.14$	$0.72 \pm 0.23$
	Morphine	$0.5 \pm 0.17$	$0.65 \pm 0.13$	$0.27 \pm 0.09^*$
کلونیک	Mor + nal	$0.89 \pm 0.2^*$	$0.00^*$	$0.25 \pm 0.08$
	washout	$1.16 \pm 0.23$	$1.2 \pm 0.15$	$0.71 \pm 0.24$
کلونیک	Control	$1.17 \pm 0.06$	$1.09 \pm 0.03$	$1.21 \pm 0.07$
	Morphine	$0.93 \pm 0.05^*$	$0.84 \pm 0.05^*$	$1.26 \pm 0.15^*$
کلونیک	Mor + nal	$0.85 \pm 0.08$	$0.21 \pm 0.04$	$0.8 \pm 0.077$
	washout	$0.92 \pm 0.04$	$1.19 \pm 0.05$	$1.04 \pm 0.09$
<i>intraburst</i>	Control	$30.3 \pm 2.19$	$19.3 \pm 1.1$	$15.5 \pm 5.03$
	Morphine	$23.2 \pm 2.18$	$10 \pm 1.8^*$	$5.2 \pm 2.05$
<i>intraburst</i>	Mor + nal	$19.9 \pm 1.8^*$	$9.5 \pm 0.5$	$4.1 \pm 1.35^*$
	washout	$29 \pm 1.7$	$19.3 \pm 3.1$	$16 \pm 5.44$

شود (۱۳، ۱۹، ۲۰). منظور از SEP فعالیت‌های الکتریکی است که پس از تحریک مسیر کولترال‌های ارسالی از ناحیه CA3، به وسیله الکتروود شیشه‌ای در ناحیه CA1 قابل ثبت می‌باشد. وقتی بافت هیپوکسیک بود فعالیت‌های ictal و interictal ایجاد می‌شد ولی SEP به وجود نمی‌آمد. در تمام آزمایشات این مطالعه سلامت بافت از نظر هیپوکسی به وسیله SEP کنترل شد و اگر در یک نمونه این آزمایش منفی بود، اطلاعات مربوط به آن نمونه در آنالیز وارد نشد.

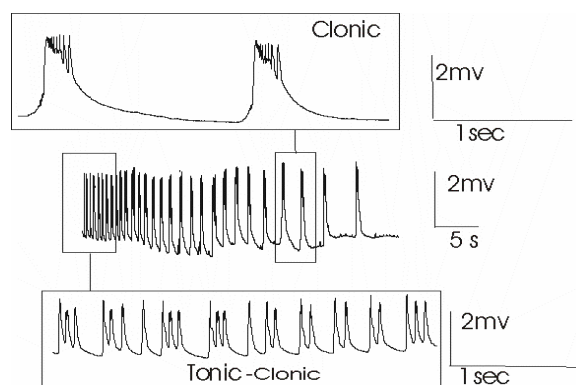
## نتایج

نتایج ذکر شده در این مطالعه حداقل حاصل از ۱۰ آزمایش مستقل می‌باشد. بنابراین هر جا که تعداد نمونه ذکر نشده،  $n=10$  می‌باشد. در این مطالعه ما اشکال متنوعی از SLE را ثبت کردیم. بعضی از این حمله‌ها به ترتیب زیر شامل سه بخش مجزا بود:

۱) بخش پر فرکانس (۱۴-۱۸ Hz) بنام فاز تونیک که ۴ تا ۱۱ ثانیه طول می‌کشید و زودتر از بقیه قسمت‌ها ظاهر می‌شد.

۲) فاز تونیک-کلونیک (۱۸-۰۵ Hz) که ۱۰ تا ۱۸ ثانیه طول می‌کشید.

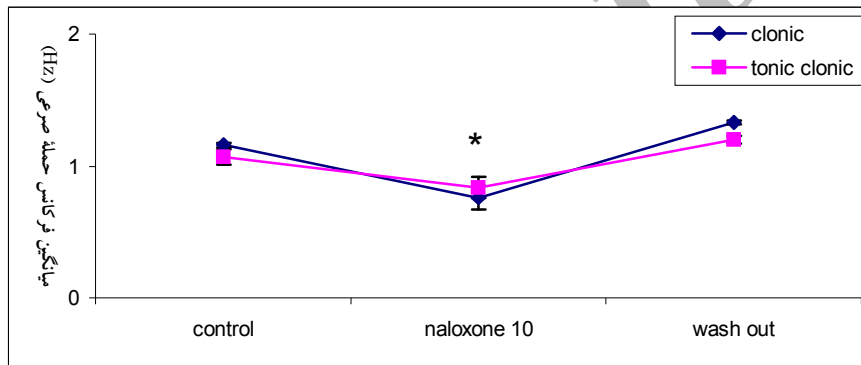
۳) فاز کلونیک (۲-۰/۳ Hz) که ۳۰ تا ۱۲۰ ثانیه طول می‌کشید.



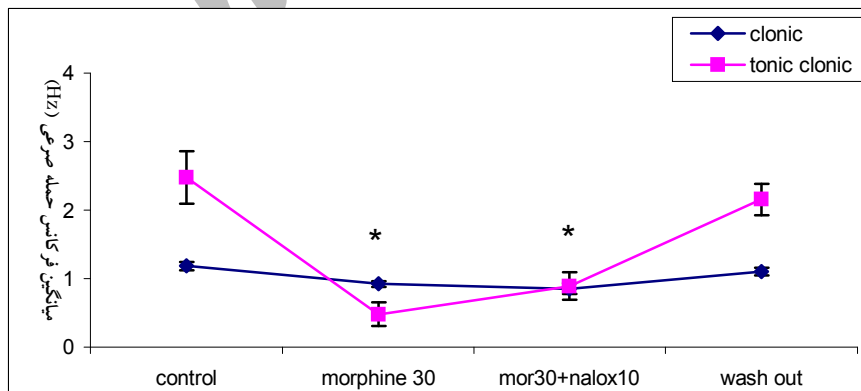
**شکل شماره ۱:** یک نمونه از حمله صرعی به مدت ۴۰ ثانیه از هیپوکامپ یک موش ۱۲ روزه، *in vitro*. در پانل وسط کل یک حمله نشان داده شده است. مستطیل‌هایی که روی دو قسمت این حمله رسم شده، آن ناحیه را به صورت باز شده نمایش داده است.

جدول شماره ۲: اثر نالوکسان بر فرکانس اجزای حمله صرعی در هیپوکامپ کامل موش. *in vitro* ( $P < 0.01$ ).

اجزای حمله	گروه‌ها	فرکانس (Hz)	
		۱۰ μM نالوکسان	۵ μM نالوکسان
تونیک-کلونیک	Control	1.08 ± 0.06	1.71 ± 0.11
	naloxone	0.84 ± 0.08*	1.66 ± 0.15
	washout	1.21 ± 0.03	1.61 ± 0.13
کلونیک	Control	1.16 ± 0.018	1.1 ± 0.15
	naloxone	0.76 ± 0.07*	1.2 ± 0.17
	washout	1.33 ± 0.015	1.03 ± 0.09
intradburst	Control	13.1 ± 1.24	23.1 ± 2.14
	naloxone	0.00 *	24.0 ± 3.2
	washout	11.1 ± 0.95	22.2 ± 2.45

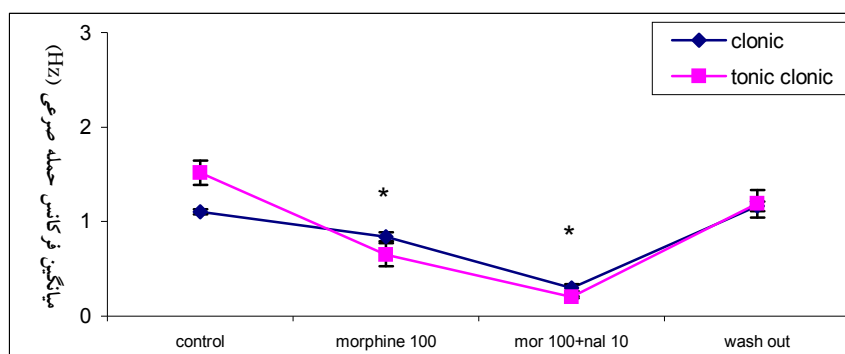


شکل شماره ۲: اثر نالوکسان ۱۰ μM بر فرکانس حمله صرعی در هیپوکامپ موش (n=10) به صورت *in vitro*. نالوکسان فرکانس قسمت‌های تونیک-کلونیک و کلونیک را به طور معنی داری کم کرد ( $p < 0.01$ ).

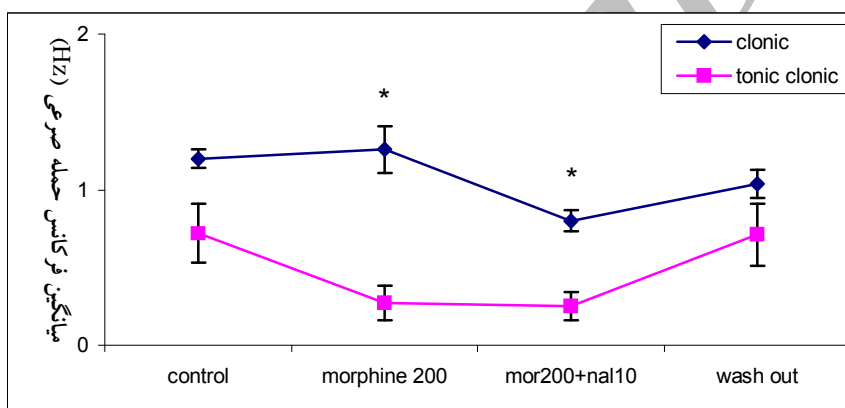


شکل شماره ۳: اثر مورفین بر فرکانس حمله صرعی در هیپوکامپ موش (n=10). *in vitro*. مورفین ۳۰ μM فرکانس قسمت تونیک-کلونیک حمله صرعی را به طور معنی داری کاهش داد که با شستشو بر گشت پذیر بود ( $p < 0.01$ ).

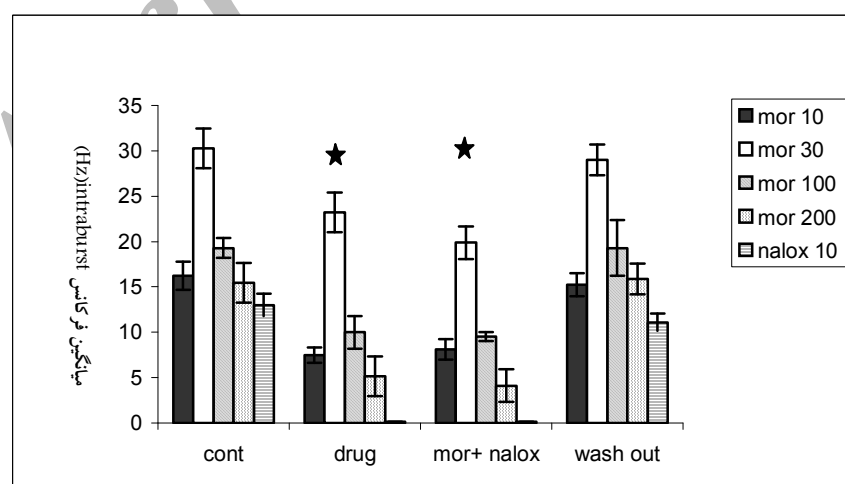
اثر مرفین بر فرکانس تشنج هیپوکامپی در نوزاد موش به صورت *in vitro*



شکل شماره ۴: اثر مرفین بر فرکانس حمله صرعی در هیپوکامپ موش ( $n=10$ )، *in vitro*، مرفین  $100 \mu\text{M}$  فرکانس قسمت تونیک-کلونیک و کلونیک حمله صرعی را به طور معنی داری کاهش داد. اضافه کردن نالوکسان  $10 \mu\text{M}$  فرکانس این اجزا را باز هم بیشتر کاهش داد که با شستشو بر گشت پذیر بود ( $p < 0.01$ ).



شکل شماره ۵: اثر مرفین بر فرکانس حمله صرعی در هیپوکامپ موش ( $n=10$ )، *in vitro*، مرفین  $200 \mu\text{M}$  فرکانس قسمت تونیک-کلونیک حمله صرعی را به طور معنی داری کم کرد. اضافه کردن نالوکسان  $10 \mu\text{M}$  در این قسمت تغییری ایجاد نکرد ولی فرکانس قسمت کلونیک را به طور معنی داری کاهش داد. هر دو اثر با شستشو به حالت کنترل برگشت ( $p < 0.01$ ).



شکل شماره ۶: اثر غلظت‌های مختلف مرفین و نالوکسان بر فرکانس intraburst در هیپوکامپ کامل موش به صورت *in vitro*. مرفین با تمام غلظت‌های به کار رفته فرکانس intraburst را به طور معنی داری کم کرد که به وسیله نالوکسان بلوکه نشد ولی با شستشو به حالت کنترل برگشت ( $p < 0.01$ ).



05. Ahmad I, Pleuvry BJ. Interaction between opioid drugs and propofol in laboratory models of seizures. *Br. J. Anesth* 1995; 74: 311-314.
06. 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(1-2): 120-126 .
07. Engel JJR. Excitation and inhibition in epilepsy. *Can J Neurol Sci* 1996; 23: 167-174.
08. Holmes G L. Epilepsy in the developing brain: Lessons from the laboratory and clinic. *Epilepsia* 1997; 38: 12-30.
09. Collingridge G L, Singer W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 290-296.
10. Jahromi SS, Wentlandt K, Piran S, Carlen PL. Anticonvulsant actions of gap junctional blockers in an *in vitro* seizure model. *J Neurophysiol* 2002; 88(4): 1893-1902.
11. Quilichini PP, Diabira D, Chiron C, Ben-Ari Y. Persistent epileptiform activity induced by low  $Mg^{2+}$  in intact immature brain structures. *Euro J Neurosci* 2002; 16: 850-860.
12. 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(3): 167-207.
13. Wu C, Shen H, Zhang L. A fundamental oscillatory state of isolated rodent hippocampus. *J Physiology* 2002; 540(2): 509-527 .
14. Luhman HJ, Dzhala 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 .
15. Katzung B G, Trevor A J. *Pharmacology: Examination & Board Review*. 5<sup>th</sup> ed. Prentice-Hall International Inc 2001; 174.
16. Wagner JJ, Terman GW, Chavkin C. Endogenous dynorphins inhibit excitatory neurotransmission and block LTP induction in the hippocampus. *Nature* 1993; 363: 451-454.
17. 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.
18. Derchansky M, Shahar E, Wennberg RA, Samoilova M, Jahromi SS, Abdelmalik PA, et al. A model of frequent, recurrent and spontaneous seizures in the intact mouse hippocampus. *Hippocampus* 2004; 14(8): 935- 947.
19. Atapour N, Niazi M. Chemical kindling and seizure susceptibility in morphine dependent rats. *Eur Neuropsych - Pharmacol* 2000; 10: 483-487 .
20. Matsumoto RR. GABA receptors: Are cellular differences reflected in function? *Brain Res Rev* 1989; 14: 203-225.
21. Lufty K, Woodward R M, Keana JF, 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(3): 261-266.
22. Aghajanian MK, Takemori AE. Changes in adenosine receptor sensitivity in morphine-tolerant and dependent mice. *J Pharmacol Exper Ther*, 1986; 236: 625-620.
23. Devries TJ, Tjon Tien Ril GHK, Van Der Laan JW; 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 .
24. Madamba SG, Schweitzer P, Siggins GR. Dynorphin selectively augments the M-current in hippocampal CA1 neurons by an opiate receptor mechanism. *J Neurophysiol* 1999; 82: 1768-1775.
25. Agustina CM, Rafael VM. Effects of chronic morphine and N-cyclopentyl-adenosine administration on kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Research* 2001; 44: 89-96.
26. Shan, Y. Qin J, Chang XZ, Yang ZX. Effect of naloxone on remote seizure susceptibility. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2004; 36(1): 57-60.