

## Morphine and Naloxone Effects on Seizure in Brain Slice of Morphine-Dependent Infant Mice

Yousef Panahi<sup>1\*</sup>, Ehsan Sabori<sup>2</sup>, Ali Rasouli<sup>3</sup>, Goodarz Sadeghi Hashjin<sup>4</sup>, Shiva Roshan Milani<sup>5</sup>,  
Leila Derafshpour<sup>6</sup>

1. Pharmacology Student, Faculty of Veterinary, Tehran University, Tehran, Iran

2. Professor, PhD of Physiology, Department of Physiology, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

3. Associate Professor, PhD of Pharmacology, Department of Pharmacology, Tehran University, Tehran, Iran

4. Professor, PhD of Pharmacology, Department of Pharmacology, Tehran University, Tehran, Iran

5. Associate Professor, PhD of Physiology, Neurophysiology Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

6. Physiology Student, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

Received: 9 Jan 2017, Accepted: 5 Mar 2017

### Abstract

**Background:** The aim of this study was to evaluate the effects of different concentrations of morphine and naloxone on epileptic activity in live brain slices taken from morphine-dependent and control infant mice.

**Materials and Methods:** Forty neonatal mice were randomly selected. To establish dependency, 2, 4, 8, 16 and 32 mg / kg morphine was injected subcutaneously once daily (0.1 cc) for 5 consecutive days from day 14-18 after birth. On postnatal days 19 -20, brain slices were prepared and cerebrospinal fluid was perfused with low magnesium to induce pseudo- epileptic activity. The effects of 10, 100 and 1000  $\mu$ M concentrations of morphine and 10  $\mu$ M naloxone were investigated on epileptic activity. Changes in the number as well as onset and amplitude of activities were considered as an indicator to determine the quantity of their effect.

**Results:** The results showed that morphine 100  $\mu$ M increased the activity while 10 and 1000  $\mu$ M concentrations of morphine and 10  $\mu$ M naloxone attenuated epileptic activity in both groups. Naloxone reduced pro-seizure effect of morphine, but anti-seizure effect of morphine couldn't be restored by naloxone.

**Conclusion:** Morphine has a three-phase concentration-dependent effect on epileptic activity in the infant mice; so that low and high concentrations of morphine inhibit epileptic activity, but its moderate concentration potentiates the epileptic activity. Naloxone has an anti-seizure effect.

**Keywords:** Brain slices, Mice, Morphine, Naloxone, Seizure

\*Corresponding Author:

Address: Faculty of Veterinary, Tehran University, Tehran, Iran

Email: ypypanahi200@gmail.com

## اثر مورفین و نالوکسان بر تشنج در برش مغزی موش سوری شیر خوار وابسته به مورفین

یوسف پناهی<sup>۱\*</sup>، احسان صبوری<sup>۲</sup>، علی رسولی<sup>۳</sup>، گودرز صادقی هنجین<sup>۴</sup>، شیوا روشن میلانی<sup>۵</sup>، لیلا درفش پور<sup>۶</sup>

۱. دانشجوی فارماکولوژی، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲. استاد، دکترای فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
۳. دانشیار، دکترای فارماکولوژی، گروه فارماکولوژی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۴. استاد، دکترای فارماکولوژی، گروه فارماکولوژی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۵. دانشیار، دکترای فیزیولوژی، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
۶. دانشجوی فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۱۵

### چکیده

**زمینه و هدف:** هدف از این مطالعه، بررسی اثر غلظت‌های مختلف مورفین و نالوکسان بر فعالیت‌های صرعی ایجاد شده در برش‌های زنده مغزی تهیه شده از نوزاد موش‌های سوری وابسته به مورفین و کنترل بود.

**مواد و روش‌ها:** ۴۰ سر نوزاد موش سوری به طور تصادفی انتخاب شدند. برای ایجاد وابستگی، ۲، ۴، ۸، ۱۶ و ۳۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم مورفین یک بار در روز (۰/۱ سی‌سی) به مدت ۵ روز متوالی از روز چهاردهم تا هجدهم پس از تولد به صورت زیر جلدی تزریق شد. در روز نوزدهم و بیستم بعد از تولد، برش‌های مغزی از موش‌ها تهیه شد و فعالیت‌های شبه صرعی از طریق پرفیوژ مایع مغزی نخاعی با منیزیم کم ایجاد شد و اثر غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار مورفین و ۱۰ میکرومولار نالوکسان بر روی فعالیت‌ها بررسی شد. تغییر در تعداد، زمان شروع و دامنه فعالیت‌ها به عنوان شاخص تعیین کننده کمیت اثر در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که مورفین ۱۰۰ میکرومولار باعث افزایش و مورفین ۱۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار و نالوکسان ۱۰ میکرومولار باعث کاهش فعالیت‌ها در هر دو گروه شد و نالوکسان فعالیت تشنج‌زایی مورفین را کاهش داد، ولی اثر ضد تشنجی مورفین را نتوانست احیا کند.

**نتیجه‌گیری:** مورفین به صورت وابسته به غلظت دارای اثرات ۳ فازی در فعالیت شبه صرعی دوره شیرخواری است، به طوری که دوز کم و زیاد آن فعالیت‌های صرعی را مهار می‌کند، ولی دوز متوسط آن باعث تقویت فعالیت‌های صرعی می‌شود، نالوکسان دارای اثرات ضد تشنجی است.

**واژگان کلیدی:** برش مغزی، مورفین، نالوکسان، تشنج، موش سوری

\*نویسنده مسئول: ایران، تهران، دانشگاه تهران، دانشکده دام پزشکی

Email: ypypanahi200@gmail.com

## مقدمه

بیماری‌های تشنجی در انسان اختلالات عصبی- رفتاری پیچیده ناشی از تحریک پذیری غیر طبیعی سلول‌های عصبی در مناطق مختلف مغز هستند. سیستم لیمبیک محل معمول برای شروع فعالیت صرع کانونی است. هیپوکامپ به ویژه در شروع، انتشار و پایان تشنج نقش دارد. در هیپوکامپ، محل آغاز فعالیت شبه ایکتال به نظر می‌رسد در منطقه CA1 واقع شده است، در حالی که فعالیت ایترایکتال در منطقه CA2-CA3 یافت می‌شود (۱). صرع یک اختلال عصب شناختی مزمن است که مشخصه آن تشنج‌های صرعی مکرر است. آسیب‌های مغزی و اختلالات ژنتیکی زمینه ساز این اختلال می‌باشند (۲، ۳). عملکرد سلول‌های عصبی و مدارهای آن‌ها در منطقه ایجاد صرع به طور اساسی تغییر کرده و در برخی شرایط حتی نابود می‌شوند. در طول تشنج تبدیل شونده به صرع، سلول‌های عصبی در منطقه صرع، شروع به تخلیه سیگنال‌های الکتریکی شدیداً هم‌زمان به مقدار بیش از حد زیاد یا با یک الگوی غیر طبیعی می‌کنند (۲). تشنج تبدیل شونده به صرع می‌تواند فقط در ساختارهای خاصی از مغز (به عنوان مثال قشر مخ و آمیگدال) آغاز شود و پس از آن به ساختارهای دیگر گسترش یابد (۴). مکانیسم‌های متعددی برای وقوع انواع مختلفی از تشنج و صرع ارائه شده است (۲). فرضیه قدیمی اشاره می‌کند که حملات صرعی در نتیجه کاهش مهار سیناپسی ایجاد می‌شوند. فرضیه دیگر این است که تقویت سیستم گلوتامات منجر به صرع می‌شود (۵). محققان نشان داده‌اند که تشنج می‌تواند بدون فعال شدن سیناپس شیمیایی از طریق مطالعات آزمایشگاهی ایجاد شود (۲) لذا این فرضیه این احتمال را به وجود آورده است که تحقیقات آینده به ترسیم انواع مختلف تشنج و صرع متمرکز شوند. تلاش‌ها و بودجه فراوانی برای توضیح مکانیسم پاتوفیزیولوژی مولکولی و سلولی و فرآیندهای فارماکودینامیک اساسی سندرم‌های صرعی سرمایه گذاری شده است، اما ارتباط مورد نظر هنوز

سوال برانگیز است (۶). اگر چه مدل‌های حیوانی *in vivo* روش‌های آزمایش استاندارد برای چندین دهه بود (۷)، مدل صرع آزمایشگاهی برای غربال‌گری اثر داروهای بالقوه مورد استفاده قرار گرفت (۸، ۹). هیپوکامپ نه تنها به علت ساختار بسیار سازمان یافته خود بلکه به علت نقش‌های متعددی که در یادگیری و حافظه، بیماری آلزایمر و صرع دارد، یکی از نواحی مورد مطالعه مغز می‌باشد. مدار عصبی ذاتی آن اجازه تولید تخلیه‌های عصبی هماهنگ را می‌دهد و ساختار آن کم‌ترین آستانه تشنج را نسبت به مناطق دیگر مغز دارد. تهیه برش هیپوکامپ در صورتی که مدارهای سیناپسی و ساختار سلولی آن حفظ شده باشد، اجازه تحقیقات از ویژگی‌های ساختاری و عملکردی آن را می‌دهد، بنابراین این مدل در شرایط آزمایشگاهی برای مطالعات الکتروفیزیولوژیک ضروری است (۱۰). فعالیت صرعی شکل در شرایط آزمایشگاهی در برش انترورینال مغز با حذف منیزیم از محلول پرفیوژ کننده ایجاد می‌شود که باعث باز شدن کانال NMDA گیرنده گلوتامات می‌شود (۱۱). کانال یونی گیرنده NMDA برای یون‌های کلسیم بسیار نفوذپذیر است (تقریباً ۱۰ درصد کل جریان یونی از طریق این کانال صورت می‌گیرد). ورود کلسیم می‌تواند تعدادی از فرآیندهای داخل سلولی وابسته به کلسیم از جمله فعالیت صرعی را آغاز کند (۱۲). ثابت شده که مواد مخدر نقش مهمی در شروع و پایان تشنج دارند. استفاده سیستمی حاد آگونیست‌های گیرنده  $\mu$ ،  $\delta$  و  $\kappa$  مانند مورفین، فنتانیل، پنتازوسین و میریدین باعث حفاظت از تشنج می‌شوند. مورفین و فنتانیل اثرات دوگانه دارند به طوری که دوزهای پایین دارای اثر ضد تشنجی و دوز بالا باعث القاء اثرات تشنج می‌شوند. استفاده از آنتاگونیست اپیوئیدی نالوکسان، دپرسیون پس از دوره تشنج را کاهش می‌دهد، که یک دوره بلافاصله پس از تشنج است که حساسیت تشنج کاهش یافته و مانع از عود تشنج می‌شود. استفاده داخل مغزی اندروپین، مت-انکفالین و مورفین دارای

گروه) به ترتیب: مورفین با غلظت ۱۰ میکرومولار، مورفین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار، مورفین با غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار، نالوکسان با غلظت ۱۰ میکرومولار تقسیم شدند. تمام مراحل کار با حیوانات شامل نگهداری، مقید کردن، بی‌هوش کردن و کشتن آن‌ها مطابق دستورالعمل معاهده‌ی هلسینکی انجام شد. گروه کنترل در روز ۱۴ تا ۱۸ بعد از تولد روزانه یک بار نرمال سالین استریل به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر به صورت زیر جلدی دریافت کردند. گروه مورفین در همان روزها و به همان طریق دوزهای افزایش یابنده مورفین در یافت کردند (۲، ۴، ۸، ۱۶ و ۳۲ mg/kg). موش‌های هر دو گروه در روز ۱۹ یا ۲۰ بعد از تولد برای مطالعه الکتروفیزیولوژی مورد استفاده قرار گرفتند.

#### تهیه برش‌های زنده مغزی:

برش‌های زنده مغزی از هر دو نیمکره مغز و به تعداد ۱۲۰ عدد از موش‌های سوری مورد مطالعه تهیه شدند. برای تهیه برش زنده مغزی مورد نیاز برای انجام ثبت الکتروفیزیولوژیک در محیط آزمایشگاه، موش سوری در روز ۱۹ و ۲۰ پس از تولد، پس از قرار گرفتن در دسیکاتور، با استفاده از اتر به طریق استنشاقی بی‌هوش شده و بلافاصله سر حیوان با استفاده از تیغ مخصوص که پشت آن صاف بود جدا شد و به سرعت در زمان کم‌تر از یک دقیقه مغز حیوان خارج شده و به مدت دو دقیقه در مایع مغزی نخاعی مصنوعی نرمال برف-آبی (صفر تا چهار درجه سانتی‌گراد) که به طور مرتب با گاز کربوژن اکسیژنه می‌شد (۹۵ درصد اکسیژن و ۵ درصد دی‌اکسید کربن) قرار داده شد و بعد از جدا کردن مخچه و قسمت فرونتال مغز، بافت مغز با استفاده از چسب سیانو آکریلات یا چسب رازی روی پایه مورد نظر اتصال یافته و سپس برش‌های مغزی با ضخامت ۴۰۰ میکرومتر به صورت افقی با استفاده از دستگاه میکروتوم (Campden, UK) مخصوص تهیه شد. برش‌های مغزی تهیه شده باید از کیفیتی برخوردار باشند که نواحی شکنج دندان‌دار و ناحیه CA هیپوکامپ که ناحیه مورد مطالعه در این تحقیق است به خوبی زیر لوپ

اثرات تشنج در موش‌های صحرایی بالغ است (۱۱). این احتمال وجود دارد که یک کودک در مراحل ابتدایی زندگی خود در معرض مستقیم (تجویز مواد مخدر توسط پزشک) یا غیر مستقیم (زندگی با پدر و مادر معتاد) مواد مخدر قرار گیرد و بعد از آن به هر دلیلی در طول زندگی تشنج را تجربه کند. بنابراین، هدف این مطالعه مقایسه اثر حاد و مزمن مورفین بر فعالیت صرعی ناشی از مایع مغزی نخاعی با منیزیم کم در برش‌های زنده مغزی موش سوری شیرخوار می‌باشد که در اوایل دوره شیرخواری در معرض مورفین قرار گرفتند و همچنین بررسی اثرات غلظت‌های مختلف مورفین و نالوکسان در فعالیت صرعی ناشی از منیزیم کم در مایع پرفیوژ کننده برش‌های زنده مغزی تهیه شده از موش‌های وابسته به مورفین و نرمال می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

##### داروها و مواد شیمیایی:

مواد لازم برای تهیه مایع مغزی نخاعی مصنوعی شامل  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$  و  $\text{CaCl}_2$  و گلوکز از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. مورفین سولفات و نالوکسان از معاونت غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه خریداری شدند. مورفین سولفات و نالوکسان در مایع مغزی نخاعی با منیزیم کم حل شدند تا غلظت‌های مورد نظر تهیه شوند. در زمان ثبت الکتروفیزیولوژیک همه داروها از طریق پرفیوژ استفاده شدند.

##### حیوانات:

در این مطالعه از ۴۰ سر موش سوری نر و ماده استفاده شد که در حیوان خانه دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه در دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد تحت شرایط دسترسی آزاد به آب و غذا قرار داشتند که به طور تصادفی به دو گروه کنترل و وابسته به مورفین (۲۰ تایی) تقسیم شدند. هر گروه به چهار زیر گروه (در مجموع هشت زیر

مقاومت الکتریکی سه تا پنج مگا اهم تهیه شدند. میکروپیت‌ها با محلول مایع مغزی نخاعی مصنوعی نرمال پر شده و از ناحیه CA1 هیپوکامپ ثبت خارج سلولی به عمل آمد. نوک الکترود در ناحیه استراتوم پیرامیدال گذاشته شد و فعالیت‌های صرعی ایجاد شده ثبت شد. سرعت جریان مایع پرفیوژ کننده یک میلی‌لیتر در دقیقه بوده و میزان درجه حرارت آن ۳۲ درجه سانتی‌گراد بود که توسط دستگاه کنترل کننده دما (Campden, UK) حفظ شد. در این پژوهش، فعالیت‌های صرعی که قبلاً توسط محققین دیگر فعالیت‌های صرعی شکل پایدار نامیده شده است، به وسیله مایع مغزی نخاعی با منیزیم کم القاء و تا زمانی که مایع مورد نظر پرفیوژ می‌شد، به طور مستمر ثبت شد. برای ثبت و آنالیز داده‌ها از بساط تحقیقاتی شرکت پرتو دانش استفاده شد. به طوری که تعداد اسپایک‌های ایجاد شده در زمان پرفیوژ با مایع مغزی نخاعی با منیزیم کم و داروها و بعد از آن، ثبت شد. امواج ثبت شده به وسیله برنامه نرم افزاری ای-تریس، تجزیه و تحلیل شد. متغیرهایی نظیر دامنه، تعداد اسپایک‌های ثبت شده قبل و بعد از به کار بردن داروها مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه از غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار مورفین و غلظت ۱۰ میکرومولار نالوکسان در گروه‌های جداگانه استفاده شد. داروهای مورد استفاده مستقیماً در مایع مغزی نخاعی با منیزیم کم حل شدند (۳).

#### آنالیز داده‌ها:

داده‌ها در نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ وارد شده و بررسی شد. توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف (k-S) کنترل شد و چون داده‌های به دست آمده در این مطالعه توزیع نرمال نداشتند با استفاده از تست‌های غیر پارامتریک بررسی شدند. بنابراین تست ویلکوکسون برای مقایسه دو گروه از داده‌های وابسته به هم و تست فردمن برای مقایسه داده‌های غیر وابسته به هم استفاده شدند. نتایج به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  بیان شدند و تفاوت‌های بین گروه‌ها با  $p < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

آزمایشگاهی با قدرت بزرگنمایی 4x مشخص باشند. سپس برش‌های مغزی تهیه شده با استفاده از پیپت مخصوص به داخل مایع مغزی نخاعی مصنوعی نرمال انتقال داده شد و حداقل به مدت یک و نیم ساعت در دمای آزمایشگاه در داخل مایع مغزی نخاعی مصنوعی نرمال نگهداری شدند. بعد از انکوباسیون، برش‌های مورد نظر که از لحاظ کیفی مناسب بودند، برای ثبت الکتروفیزیولوژیک به داخل محفظه مخصوص ثبت از نوع تماس سطحی منتقل شدند و روی مش نایلونی موجود قرار گرفتند. برش‌های زنده مغزی در محفظه ثبت به طور مرتب تا ایجاد شرایط پایدار به مدت ۲۰ دقیقه به وسیله مایع مغزی نخاعی مصنوعی نرمال با سرعت یک میلی‌لیتر در دقیقه پرفیوژ شدند. برای پرفیوژ برش زنده مغزی در داخل محفظه ثبت از دو نوع محلول مایع مغزی نخاعی مصنوعی استفاده می‌شود. یکی از آن‌ها مایع مغزی نخاعی مصنوعی معمولی بود که به هنگام تهیه برش و انکوباسیون از آن استفاده می‌شود و دارای محتویات زیر می‌باشد (مقادیر بر حسب میلی‌مولار می‌باشد):

$\text{NaHCO}_3$  (26),  $\text{KCl}$ (2.5),  $\text{CaCl}_2$ (2),  $\text{MgSO}_4$ (2),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (1.25),  $\text{NaCl}$ (125) and  $\text{glucose}$ (10)

محلول دیگر مایع مغزی نخاعی با منیزیم کم است که مقدار منیزیم آن کم و مقدار پتاسیم آن زیاد بوده و برای ایجاد امواج صرعی مورد استفاده قرار می‌گیرد که دارای محتویات زیر می‌باشد (بر حسب میلی‌مولار می‌باشد):

$\text{NaHCO}_3$  (26),  $\text{KCl}$  (5),  $\text{CaCl}_2$  (2),  $\text{MgSO}_4$  (0.2),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1.25),  $\text{NaCl}$  (125) and  $\text{glucose}$  (10)

مصنوعی مورد استفاده در این مطالعه ۳۰۰ تا ۳۰۷ میلی‌اسمول است (۱۳).

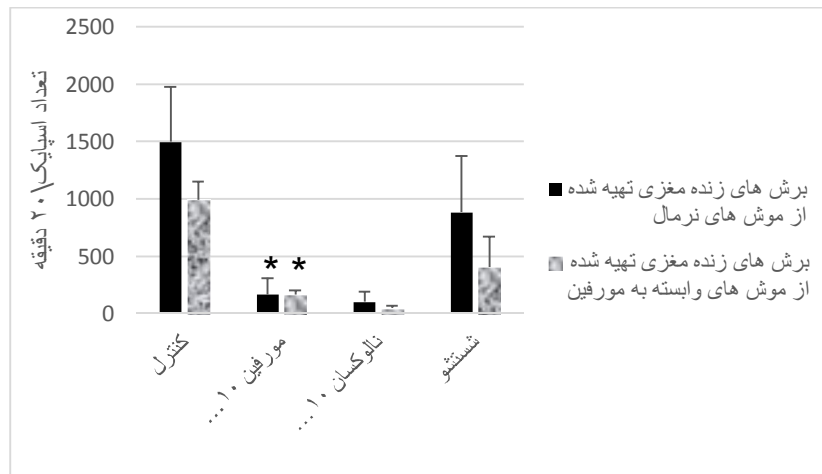
#### ثبت الکتروفیزیولوژی:

با استفاده از الکترودهای شیشه‌ای تهیه شده از شرکت (TW150F-4; World Precision Instruments (WPI), USA) میکروپیت‌های با

## یافته‌ها

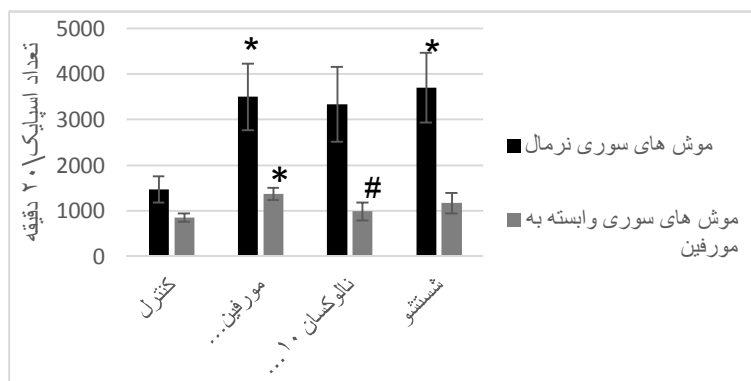
در اکثر برش‌های مغزی مورد استفاده در این مطالعه بعد از پرفیوژ با مایع مغزی نخاعی مصنوعی با منیزیم کم فعالیت‌های شبه صرعی تجربی ثبت شد که اصطلاحاً فعالیت‌های صرعی شکل پایدار نامیده می‌شوند که تخلیه‌های مکرر پایدار با طول دوره یک تا ۱۰ ثانیه یا کم‌تر از یک ثانیه بوده که هر دو تا پنج ثانیه یک‌بار تکرار شده و تا زمانی که مقدار منیزیم در محلول پرفیوژ کننده در حد صفر باشد و برش مغزی مورد نظر از کیفیت کافی برخوردار باشد این فعالیت‌ها ثبت خواهند شد (۱۱). در مطالعه حاضر طول دوره فعالیت‌های ثبت شده کم‌تر از یک ثانیه بود به این دلیل فقط تعداد اسپایک‌ها و دامنه آن‌ها بیش‌تر مورد توجه قرار گرفت. در این مطالعه اثر استفاده حاد و مزمن مورفین، اثر غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار مورفین و ۱۰ میکرومولار نالوکسان بر روی فعالیت‌های صرعی هیپوکامپ موش‌های سوری نرمال و وابسته به مورفین در روزهای ۱۹ و ۲۰ پس از تولد بررسی شد که نتایج آن در نمودارهای ۱ تا ۴ خلاصه شده است. همه فعالیت‌های شبه صرعی ایجاد شده در ۱۲۰ برش زنده مغزی مورد مطالعه از نوع فعالیت‌های شبه پایدار بوده ولی در جزئیات ثبت مثل شکل اسپایک‌ها، تعداد و دامنه با هم تفاوت داشتند. در برش‌های مغزی که از موش‌های سوری نرمال تهیه شده بودند، ۵ تا ۱۰ دقیقه بعد از پرفیوژ برش مورد نظر با مایع مغزی نخاعی با منیزیم کم فعالیت‌های صرعی شکل ایجاد شدند در حالی که در برش‌های مغزی به دست آمده از موش‌های که وابسته به مورفین بودند، فعالیت‌های مورد نظر بعد از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه پرفیوژ با مایع مغزی نخاعی با منیزیم کم

ایجاد شدند. در هر دو دسته برش زنده مغزی مورد نظر فعالیت‌های صرعی شکل تا زمانی که مایع مغزی نخاعی با منیزیم کم پرفیوژ می‌شد ادامه داشتند. در این مطالعه تعداد اسپایک‌های به دست آمده در واحد زمان در شرایط پایه و در شرایط پرفیوژ با غلظت‌های مختلف مورفین و نالوکسان مورد تجزیه تحلیل قرار گرفتند. نتایج به دست آمده نشان داد که مورفین با غلظت ۱۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار در برش‌های زنده مغزی تهیه شده از موش‌های سوری نرمال و وابسته به مورفین، تعداد اسپایک‌های ثبت شده در شرایط پایه را تضعیف می‌کند (نمودار ۱، ۳) به طوری که پرفیوژ برش‌های مورد نظر با نالوکسان ۱۰ میکرومولار فعالیت‌های تضعیف شده را القاء نکرد، در صورتی که پرفیوژ برش‌های زنده مغزی تهیه شده از موش‌های سوری نرمال و وابسته به مورفین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار مورفین باعث افزایش تعداد اسپایک‌ها در مقایسه با شرایط پایه شد به طوری که پرفیوژ همان برش‌ها با نالوکسان ۱۰ میکرومولار، تعداد اسپایک‌های ثبت شده در زمان پرفیوژ با مورفین ۱۰۰ میکرومولار را به طور معنی‌داری کاهش داد (نمودار ۲). زمانی که برش‌های زنده مغزی تهیه شده از موش‌های سوری نرمال و وابسته به مورفین با نالوکسان ۱۰ میکرومولار پرفیوژ شدند، این غلظت از نالوکسان باعث تضعیف فعالیت‌های صرعی شکل ثبت شده در زمان پایه در هر دو گروه از برش‌های زنده مغزی تهیه شده از موش‌های سوری نرمال و وابسته به مورفین شد در حالی که شدت کاهش فعالیت در گروه وابسته به مورفین در مقایسه با گروه کنترل بیش‌تر بود و از لحاظ آماری اختلاف معنی‌دار داشت (نمودار ۴).



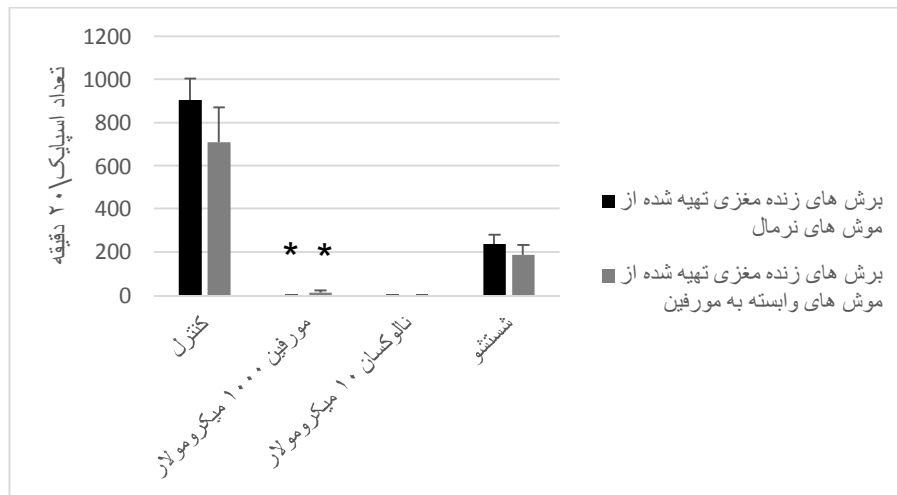
نمودار ۱. اثرات مورفین با غلظت ۱۰ میکرومولار بر فعالیت‌های صرعی شکل ایجاد شده در برش‌های زنده مغزی تهیه شده از موش‌های سوری نرمال و وابسته به مورفین که در هر دو گروه، این غلظت از مورفین فعالیت‌های صرعی ایجاد شده در زمان پایه را کاملاً مهار کرده و نالوکسان با غلظت ۱۰ میکرومولار هم قادر به احیاء فعالیت‌های زمان پایه نبوده و در ضمن اثر کاهشی داشته است در حالی که پرفیوژ برش‌های مورد نظر با مایع مغزی نخاعی با منیزیم کم باعث القاء دوباره فعالیت‌های صرعی شکل شده است. در هر گروه، اثر مورفین با غلظت ۱۰ میکرومولار حداقل بر روی شش برش زنده مغزی بررسی شده است. علامت \* نشان دهنده تفاوت معنی دار با مرحله کنترل است ( $p < 0.02$ ).

نمودار ۲. اثرات مورفین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار بر فعالیت‌های صرعی شکل ایجاد شده در برش‌های زنده مغزی تهیه شده از موش‌های سوری نرمال و وابسته به مورفین که در هر دو گروه این غلظت از مورفین فعالیت‌های صرعی ایجاد شده در زمان پایه را کاملاً تشدید کرده در حالی که تشدید فعالیت‌های صرعی زمان پایه در برش‌های گروه کنترل به طور معنی داری بیش‌تر از برش‌های گروه وابسته به مورفین می‌باشد ولی اثر نالوکسان با غلظت ۱۰ میکرومولار در هر دو گروه که



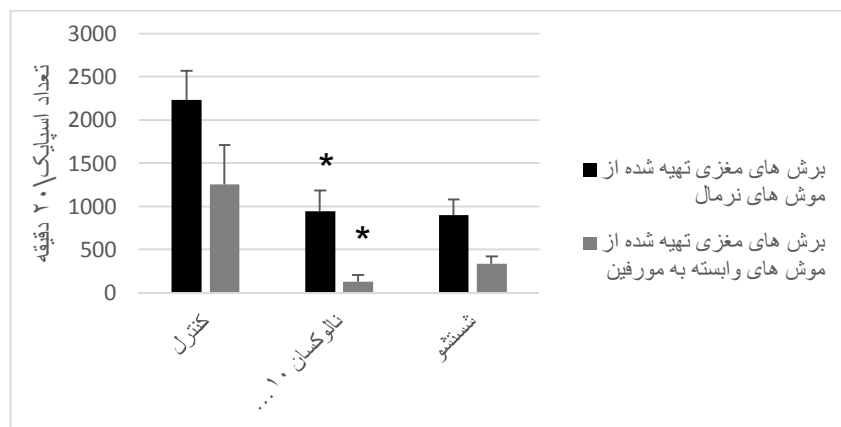
فعالیت‌های مرحله قبل را کاهش داده است تقریباً این کاهش فعالیت مشابه است. در هر گروه اثر غلظت ۱۰۰ میکرومولار مورفین بر روی حداقل شش برش زنده مغزی بررسی شد. علامت \* نشان دهنده تفاوت معنی دار با گروه کنترل است ( $p < 0.02$ ). علامت # نشان دهنده تفاوت معنی دار مرحله نالوکسان با مرحله مورفین ۱۰۰ میکرومولار در گروه وابسته به مورفین است ( $p < 0.02$ ).

ولی اثر نالوکسان با غلظت ۱۰ میکرومولار در هر دو گروه که



میکرومولار فعالیت‌های زمان پایه را دوباره احیاء نکرد در حالی که پرفیوژ برش‌های مورد نظر با مایع مغزی نخاعی با منیزیم کم باعث القاء دوباره فعالیت‌های صرعی شد. علامت \* نشان دهنده تفاوت معنی داری با مرحله کنترل است ( $p < 0.02$ ).

نمودار ۳. اثرات مورفین با غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار بر فعالیت‌های صرعی شکل ایجاد شده در برش‌های زنده مغزی تهیه شده از موش‌های سوری نرمال و وابسته به مورفین که در هر دو گروه این غلظت از مورفین فعالیت‌های صرعی ایجاد شده در زمان پایه را کاملاً مهار کرده و نالوکسان با غلظت ۱۰



کاهش نالوکسان ۱۰ میکرومولار در گروه برش‌های وابسته مورفین بیش‌تر از گروه کنترل بوده است و پرفیوژ برش‌های مورد نظر با مایع مغزی نخاعی با منیزیم کم باعث القاء دوباره فعالیت‌های صرعی شد. علامت \* نشان دهنده تفاوت معنی با مرحله کنترل در هر گروه است ( $p < 0.02$ ).

نمودار ۴. اثرات نالوکسان با غلظت ۱۰ میکرومولار بر فعالیت‌های صرعی شکل ایجاد شده در برش‌های زنده مغزی تهیه شده از موش‌های سوری نرمال و وابسته به مورفین که در هر دو گروه این غلظت از نالوکسان فعالیت‌های صرعی شکل ایجاد شده در زمان پایه را کاهش داده است در حالی که اثر



## بحث

در این مطالعه، اثرات استفاده حاد و مزمن مورفین و نالوکسان در فعالیت‌های صرعی ناشی از مایع مغزی نخاعی با منیزیم کم ثبت شده از لایه هرمی CA1 برش‌های مغز در موش شش‌رخوار نرمال و وابسته به مورفین مورد بررسی قرار گرفت. دلیل استفاده از موش شیرخوار آن است که تکامل عصب شناختی، تشکیل و گسترش سیناپس عصبی به طور عمده در این دوره صورت می‌گیرد و این دوره معادل سه ماهه سوم جنین انسان است و از سوی دیگر از لحاظ فیزیولوژیکی هم حالت نابالغ می‌باشد. بنابراین، قرار گرفتن در معرض مزمن مورفین انتظار می‌رود به علت تغییراتی که در سیستم عصبی رخ می‌دهد باعث تغییر در فعالیت صرعی شود (۱۴). اگر چه فعالیت صرعی شکل ایجاد شده توسط مدل مایع مغزی نخاعی با منیزیم کم به طور کامل نمی‌تواند منعکس کننده مکانیسم سندرم‌های صرعی باشد ولی جزء محبوب‌ترین روش‌ها برای القاء فعالیت‌های صرعی شکل می‌باشد. هدف نهایی از این مطالعه تجزیه و تحلیل فعالیت‌های صرعی شکل با بررسی تعداد اسپایک‌ها در واحد زمان بود. لازم به ذکر است که غلظت مورفین مورد استفاده در آزمایش می‌تواند نقش بسیار مهمی داشته باشد. در طول آزمایش غلظت‌های اکی مولار ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ مورفین و ۱۰ میکرومولار نالوکسان استفاده شدند. اثرات تشنج زایی و ضد تشنجی داروها با ارزیابی سرکوب کل فعالیت صرعی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به الگوی تعدیل فعالیت، اثرات فارماکولوژیک گاهی اوقات باعث تشنج و گاهی اثر ضد تشنجی بود. این مطالعه نشان می‌دهد که غلظت ۱۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار مورفین، فعالیت‌های صرعی شکل را کاهش می‌دهد و غلظت ۱۰۰ میکرومولار مورفین باعث افزایش فعالیت‌های صرعی در برش‌های مغز موش‌های نوزاد سالم و وابسته به مورفین می‌شود. چنین اثری در مدل‌های صرع حیوانی با دوزهای بالای داخل صفاقی، داخل وریدی و داخل بطن‌های مغزی مورفین نشان داده شده است (۳). گزارش شده است که مصرف مزمن

آگونیست گیرنده‌های مواد مخدر مانند مورفین منجر به تنظیم کاهشی قابل توجهی از گیرنده‌های مربوطه می‌شود که یکی از مکانیسم‌های تحمل به مواد مخدر است (۱۵). در ضمن، گزارش شده است که حیوانات پیش درمانی شده با مورفین القاء سریع فعالیت صرعی دارند. بررسی سرکوب تشنج پس از تشنج ایجاد شده توسط مدل کیندلینگ نشان می‌دهد که در موش پیش درمانی شده با مورفین حساسیت به تحریکات کیندلینگ کاهش داشته است (۱۶). هم‌چنین گزارش شده است که قرار گرفتن موش نوزاد در معرض مزمن مورفین ممکن است حساسیت به تشنج ناشی از پنتیلن تترازول را به صورت وابسته به سن تغییر دهد (۱۷). این مطالعه هم‌چنین تایید می‌کند که مورفین دارای اثر دوگانه در فعالیت‌های صرعی است همان‌طور که در پژوهش‌های قبلی (۱۸، ۱۹) گزارش شده است. به طوری که غلظت کم و غلظت بالای مورفین باعث اثرات ضد تشنجی و غلظت متوسط مورفین باعث افزایش فعالیت شبه تشنجی شده است. پژوهش حاضر با استفاده از مدل آزمایشگاهی تشنج ایجاد شده با مایع مغزی نخاعی با منیزیم کم در برش مغز موش سوری انجام شد. غلظت کم منیزیم منجر به قابلیت تحریک‌پذیری عصبی می‌شود که باعث ایجاد تشنج با کاهش غربال‌گری بار سطحی غشاء، کاهش مهار کانال‌های کلسیمی حساس به منیزیم و کاهش مهار گیرنده‌های NMDA از طریق منیزیم می‌شود (۳). این بدان معنی است که استراتژی‌های مختلف می‌تواند برای درمان افزایش فعالیت‌های تشنج ناشی از مواد مخدر استفاده شود. درست است که تمام غلظت‌های مورفین مورد استفاده در این مطالعه زمانی که غلظت منیزیم نرمال بود باعث فعالیت‌های تشنجی نشدند، با این حال، نتایج ما از مدل با غلظت کم منیزیم می‌تواند مربوط به آن مواردی باشد که مورفین باعث سرکوب و القاء فعالیت‌های تشنج در وضعیت بالینی می‌شود. مدل صرع با منیزیم کم باعث تخلیه تشنج شبیه به پیشرفت اختلالات الکتروانسفالوگرافی در بیماران مبتلا به تشنج پیچیده پارشیال و صرع پایدار پارشیال شده است (۲۰). به

مختلف خود را با فعال کردن G پروتئین و افکتورشان از قبیل آدنیلات سیکلاز و کانال‌های یونی اعمال می‌کنند. با این حال، برخی از گزارش‌ها نشان می‌دهد که اپیوئیدها نیز ممکن است اثرات تحریکی مستقیم بر مکانیسم‌های سیگنالی داخل سلولی از جمله تحریک آدنیلات سیکلاز داشته باشد که منجر به افزایش ورود کلسیم، طولانی شدن مدت زمان پتانسیل عمل و افزایش قابلیت تحریک‌پذیری عصبی می‌شود (۲۳، ۲۴). اثر مهار پیش سیناپسی مورفین به احتمال زیاد با کاهش ورود کلسیم به پایانه‌های عصبی و در نتیجه، مهار آزاد شدن گلوتامات در قشر مغز صورت می‌گیرد. اپیوئیدها باعث کاهش آزاد شدن واسطه عصبی تحریکی با کاهش در دسترس‌پذیری یون کلسیم برای مکانیسم جفت شدن تحریک-آزاد شدن در پایانه‌های عصبی سمپاتیک می‌شوند (۲۵). علاوه بر آن، ممکن است فعال شدن سیستم نیتریک اکساید با دوزهای مختلف مورفین باعث اثرات مخالف در استعداد ابتلا به تشنج شود و نیتریک اکساید ممکن است اثر ضد تشنج مورفین را با افزایش فعالیت سیستم گابا القاء کند (۲۶). ما به این نتیجه رسیدیم که پیش‌درمانی با مورفین سیستمیک باعث تاخیر در شروع فعالیت‌های صرعی ایجاد شده با مایع مغزی نخاعی با منیزیم کم می‌شود. تشنج‌های غیر صرعی و اسپایک‌های الکتروگرافیک متعاقب تزریق داخل بطن مغزی در موش صحرائی می‌تواند با استفاده از نالوکسان سیستمیک و نالورفین قبل از مورفین مهار شود (۱۵، ۲۷). هنگامی که تمام این نتایج با هم در نظر گرفته می‌شود مشخص می‌شود که استفاده سیستمیک مورفین در غیاب هر گونه دست‌کاری تشنجی اضافی، حداقل دو مکانیسم ایجاد کننده صرع را فعال می‌کند که یکی از این مکانیسم‌ها توسط گیرنده‌های اپیوئیدی خاص وساطت می‌شود و دیگری نه. اپیوئیدها درون‌زاد و تزریق داخل بطن مغزی مورفین، همان‌طور که توسط نالوکسان برگشت داده شده است، تنها یک سیستم خاص را فعال می‌کند. ظاهراً هیچ مدرکی وجود ندارد که نسبت به فعالیت تشنجی مورفین سیستمیک تحمل ایجاد شده باشد. در این

خوبی ثابت شده است که غلظت پایین منیزیم سرم می‌تواند باعث تشنج شود و استفاده از منیزیم می‌تواند در جلوگیری و کنترل از تشنج در ارتباط با پره اکلامپسی و تب موثر باشد (۲). مکانیسم این اثر در مدل ما احتمالاً به تحریک مستقیم گیرنده‌های مواد مخدر خاص مربوط نیست زیرا اضافه کردن نالوکسان ۱۰ میکرومولار به مایع پرفیوژ نتوانست اثر ضد تشنج مورفین ۱۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار را خنثی کند. این امکان وجود دارد که مکانیسم چنین عملی از طریق اثرات مهاری بر روی مسیر تحریکی گلوتامات و افزایش فعالیت گابا صورت گیرد (۱۹). اگرچه اثر ضد تشنجی مورفین ممکن است از نظر بالینی معنی‌دار نباشد ولی وقوع آن نشان می‌دهد که مدل صرعی برش‌های مغز به اندازه کافی برای شبیه‌سازی اقدامات تحریک‌پذیری دو فازی مورفین حساس است. پیامدهای بالینی این اثر را می‌توان در طول تاریخ مشاهده کرد به طوری که مواد مخدر در گذشته برای درمان سقط جنین ناشی از تشنج مقاوم به درمان در بیماران مبتلا به صرع استفاده شده است (۲۱). اثر تقویتی مورفین ۱۰۰ میکرومولار ممکن است با کاهش مهار اینترنورون‌های مهاری با واسطه گابا صورت گیرد (۱۹). اپیوئیدها به عنوان تعدیل‌کننده‌های عصبی در رابطه با ساختارهای مغزی کنترل‌کننده تشنج عمل می‌کنند به طوری که در تعادل تحریک و مهار عصبی تاثیر می‌گذارند. به نظر می‌رسد اپیوئیدها در تولید تشنج در هیپوکامپ نقش داشته باشند یا ممکن است توسط تشنج در سیستم لیمبیک آزاد شوند تا باعث طولانی شدن دوره‌های دپرسیون پس از تشنج شوند و در نتیجه در این دوره از عود مجدد تشنج جلوگیری کنند. گزارش شده است که دوزهای کم مورفین باعث اثر ضد تشنج در مقابل مدل‌های تشنجی ناشی از مسدود کننده‌های انتقال گابا مثل پیکروتوکسین، بیکوکولین، بنتیلین تترازول، ایزونیاژید شده است و دوزهای زیاد آن باعث افزایش حساسیت حیوانات به همان مدل از تشنج شده است (۲۲). پیشنهاد شده که اثر ضد تشنجی اپیوئیدها از طریق گیرنده‌های اپیوئیدی میانجی‌گری می‌شود (۲۳). این گیرنده‌ها اثرات

قوی تر نشان داد. احتمال دارد که غیر حساس شدن گیرنده‌های اپیوئیدی در مصرف مزمن مورفین مسئول این تفاوت‌ها باشد.

### تشکر و قدردانی

هزینه‌های این مطالعه توسط صندوق حمایت از پژوهشگران ریاست جمهوری تامین شده است که بدین وسیله نهایت سپاس خود را اعلام می‌داریم. این کار حاصل یک همکاری بین دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی و دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، دانشکده پزشکی می‌باشد. نتایج ارائه شده در اینجا قسمتی از پایان نامه دکتری آقای یوسف پناهی می‌باشد.

### منابع

1. Salmani, M., J. Mirnajafizadeh, and Y. Fathollahi, Offsetting of aberrations associated with seizure proneness in rat hippocampus area CA1 by theta pulse stimulation-induced activity pattern. *Neuroscience*, 2007. 149(3): p. 518-526.
2. Ghadimkhani, M., et al., Effect of magnesium sulfate on hyperthermia and pentylen-tetrazol-induced seizure in developing rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2016. 19(6): p. 608.
3. Saboory, E., et al., Mechanisms of morphine enhancement of spontaneous seizure activity. *Anesth Analg*, 2007. 105(6): p. 1729-35.
4. Castillo, P.E., C.Q. Chiu, and R.C. Carroll, Long-term plasticity at inhibitory synapses. *Current opinion in neurobiology*, 2011. 21(2): p. 328-338.
5. Homayoun, H., et al., The role of nitric oxide in anticonvulsant and proconvulsant effects of morphine in mice. *Epilepsy Research*, 2002. 48(1-2): p. 33-41.
6. Brodie, M.J., et al., Antiepileptic drug therapy: does mechanism of action matter? *Epilepsy & Behavior*, 2011. 21(4): p. 331-341.

مطالعه، تفاوت معنی‌داری بین اثر مورفین ۱۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار در فعالیت‌های صرعی ایجاد شده در گروه کنترل و وابسته به مورفین وجود نداشت. این نتیجه‌گیری با کار قبلی انجام گرفته در سگ، خرگوش و گربه پشتیبانی می‌شود (۲۸، ۲۹). در حالی که این مطالعات از فرضیه‌ای حمایت می‌کند که تشنج الکتروگرافیک به دست آمده از تزریق داخل بطن مغزی اندورفین و به میزان کمتر تزریق داخل بطن مغزی مورفین، توسط گیرنده‌های اپیوئیدی خاص وساطت می‌شود که به نظر می‌رسد این گیرنده‌ها متفاوت از گیرنده موپوئیدی باشند که باعث اثرات ضد دردی اپیوئیدها می‌شوند. این مشاهده به همراه مقادیر نسبتا بالای نالوکسان مورد نیاز برای معکوس کردن اثرات صرعی ناشی از انکفالین و مورفین پیشنهاد می‌کند که گیرنده دلتای اپیوئیدی واسطه این اثرات هستند (۱۸). در اکثر آزمایش‌های که در آن نالوکسان به آنتاگونیست اثرات ضد تشنج مورفین و مواد مخدر مرتبط این دارو استفاده شده است، نشان داده شده که موثر است. به این ترتیب، اثر ضد تشنج مورفین بر تشنج audiogenic در موش می‌تواند با ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم نالوکسان برگشت داده شود در حالی که در این مطالعه نالوکسان غلظت ۱۰ میکرومولار نتوانست اثر ضد تشنج مورفین ۱۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار را معکوس کند. به نظر می‌رسد که اثرات مهاری نالوکسان ۱۰ میکرومولار در فعالیت‌های صرعی در موش‌های وابسته به مورفین از موش‌های نرمال (شکل ۴) قوی‌تر است. مورفین باعث تاخیر در شروع میوکلونوس عمومی در بابون حساس به نور می‌شود و نالوکسان ۱-۲ میلی‌گرم/کیلوگرم این اثر را معکوس می‌کند (۱۶). نالوکسان اثرات تشنج‌زای مورفین بر تشنج ناشی از PTZ در موش و تشنج ناشی از کاینیک اسید در موش صحرائی را لغو می‌کند (۳۰). می‌توان نتیجه گرفت که مورفین اثری دوگانه بر فعالیت صرعی ایجاد شده توسط مایع مغزی نخاعی با منیزیم کم در هر دو گروه مورد مطالعه دارد. الگوی اثر قرار گرفتن در معرض حاد و مزمن مورفین مشابه بود اما شدت اثر در موش نرمال به طور قابل توجهی

Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 2006. 77(8): p. 994-995.

17.Gholami, M., et al., The effect of dorsal hippocampal administration of nicotinic and muscarinic cholinergic ligands on pentylenetetrazol-induced generalized seizures in rats. *Epilepsy & Behavior*, 2012. 25(2): p. 244-249.

18.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. 6(2): p. 197-210.

19.Zieglgansberger, W., et al., Opioid peptides may excite hippocampal pyramidal neurons by inhibiting adjacent inhibitory interneurons. *Science*, 1979. 205(4404): p. 415-417.

20.Cortez, M.A., V.J. Perez, and O. Snead 3rd, Animal models of epilepsy and progressive effects of seizures. *Advances in neurology*, 2006. 97: p. 293.

21.Krueger, H.M., N.B. Eddy, and M. Sumwalt, The pharmacology of the opium alkaloids. 1941: US Government Printing Office.

22.Binder, D.K. and C. Steinhäuser, Functional changes in astroglial cells in epilepsy. *Glia*, 2006. 54(5): p. 358-368.

23.Liu, B. and J.-S. Hong, Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2003. 304(1): p. 1-7.

24.Ravizza, T., et al., Inflammatory response and glia activation in developing rat hippocampus after status epilepticus. *Epilepsia*, 2005. 46(s5): p. 113-117.

25.Illes, P., W. Zieglga, and A. Herz, Calcium reverses the inhibitory action of morphine on neuroeffector transmission in the mouse vas deferens. *Brain research*, 1980. 191(2): p. 511-522.

26.Gholami, M., E. Saboory, and S. Roshan-Milani, Proconvulsant effects of tramadol

7.Brodie, M.J., Antiepileptic drug therapy the story so far. *Seizure*, 2010. 19(10): p. 650-655.

8.D'Antuono, M., et al., Antiepileptic drugs abolish ictal but not interictal epileptiform discharges in vitro. *Epilepsia*, 2010. 51(3): p. 423-431.

9.Arias, R.L. and M.R. Bowlby, Pharmacological characterization of antiepileptic drugs and experimental analgesics on low magnesium-induced hyperexcitability in rat hippocampal slices. *Brain research*, 2005. 1047(2): p. 233-244.

10.Gáll, Z., K. Orbán-Kis, and T. Szilágyi, Differential effects of sodium channel blockers on in vitro induced epileptiform activities. *Archives of pharmacal research*, 2015: p. 1-10.

11.Velišek, L., et al., Prenatal morphine exposure alters ovarian steroid hormonal regulation of seizure susceptibility. *Brain research*, 1998. 796(1): p. 247-256.

12.Motin, V. and V. Yasnetsov, Effect of NMDA, a Specific Agonist to NMDA Receptor Complex, on Rat Hippocampus. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 2015. 159(6): p. 704-707.

13.Saboory, E., et al., Mechanisms of morphine enhancement of spontaneous seizure activity. *Anesthesia & Analgesia*, 2007. 105(6): p. 1729-1735.

14.Frenk, H., G. Urca, and J.C. Liebeskind, Epileptic properties of leucine- and methionine-enkephalin: comparison with morphine and reversibility by naloxone. *Brain Research*, 1978. 147(2): p. 327-337.

15.Potschka, H., E. Friderichs, and W. Löscher, Anticonvulsant and proconvulsant effects of tramadol, its enantiomers and its M1 metabolite in the rat kindling model of epilepsy. *British journal of pharmacology*, 2000. 131(2): p. 203-212.

16.Hofmann, A., et al., Myoclonus as an acute complication of low-dose hydromorphone in multiple system atrophy.

interpretation based on experimental evidences. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1929. 36(3): p. 447-475.

29.Hotta, S., On the cause of morphine habituation. *Jap .J. Med. Sci. IV. Pharmacol*, 1932. 6: p. 115-132.

30.Fuller, T.A., J.W. Olney, and V. Conboy, Naloxone blocks morphine enhancement of kainic acid neurotoxicity. *Life sciences*, 1982. 31(3): p. 229-233.

and morphine on pentylenetetrazol-induced seizures in adult rats using different routes of administration. *Epilepsy & Behavior*, 2014. 36: p. 90-96.

27.Gholami, M. and E. Saboory, Comparison of the effects of Chronic Morphine and Tramadol Administration during neonatal period on pain threshold of immature rat. *Physiology and Pharmacology*, 2012. 16(2): p. 199-208.

28.Tatum, A ,.M. SeEVERS, and K. Collins, Morphine addiction and its physiological