● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ پنجم، شمارهٔ ۴، ص ۱۵۸-۱۵۳، ۱۳۷۷

مقالهٔ پژوهشی

ارزیابی اثرات وابستگی به مرفین بر ایجاد و تعدیل تشنجات صرعی در موش‌های صحرایی

دکتر نفیسه عطابور[1] و دکتر مانی نیازی[2]

خلاصه

کیندلینگ (kindling) یک مدل حیوانی بسیار مناسب جهت بررسی مکانیسم‌های پایه ایجاد صرع است. در این مدل تحریکات ضعیف و مکرر الکتریکی یا شیمیایی سبب افزایش تحریک پذیری نورون‌ها و کاهش آستانه ایجاد تشنجات صرعی می‌گردد. با توجه به توزیع فراوان پپتیدهای اوپیوئیدی و گیرنده‌های آنها در نواحی مختلف مغز و همچنین نقش این گیرنده‌ها در افزایش تحریک پذیری نورون‌ها، در مطالعه حاضر اثرات تجویز مکرر مرفین بر ایجاد و تعدیل حملات صرعی در موش‌های صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. جهت انجام این مطالعه ابتدا وابستگی به مرفین از طریق افزایش تدریجی غلظت مرفین سولفات در آب آشامیدنی ایجاد گردید. سپس به منظور ایجاد کیندلینگ، پنتیلن تترازول (PTZ) با دوز ۳۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن با فواصل ۴۸ ساعته به صورت داخل صفاقی تزریق شد و تشنجات صرعی در ۲۲ تزریق متوالی بین دو گروه شاهد و وابسته به مرفین مورد مقایسه آماری قرار گرفت. در بخش دیگری از آزمایشات، پس از ایجاد کیندلینگ، وابستگی به مرفین ایجاد شد و بیست روز پس از ایجاد کیندلینگ، پاسخ تشنجی حیوانات (دو گروه شاهد و وابسته به مرفین) به یک دوز زیر آستانه از PTZ با یکدیگر مقایسه گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که وابستگی به مرفین سبب تسهیل وقوع پدیده کیندلینگ شیمیایی می‌گردد اما پس از ایجاد کیندلینگ ، تأثیری بر پایداری پاسخ‌های تشنجی ندارد. از این یافته‌ها استنباط میشود که وابستگی به مرفین اثرات پایداری را بر افزایش فعالیت نورون‌ها برجای می‌گذارد که در مطالعهٔ مذکور به شکل تسهیل وقوع پدیدهٔ کیندلینگ است.

واژه‌های کلیدی: صرع، کیندلینگ، مرفین، پنتیلن تترازول

۱ـ استادیار گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی کرمان، ۲ـ پزشک عمومی

مقدمه

کیندلینگ یک مدل بسیار مناسب برای مطالعهٔ صرع و شکل پذیری سیناپسی است (۱۰،۱۱). در این مدل، با استفاده از تحریکات الکتریکی (۷) و یا تجویز داروهای تشنج‌زا (۱۰) افزایش حساسیت به محرک مورد نظر ایجاد گردیده و در نهایت تشنج عمومی بروز می‌کند. گرچه اثر کیندلینگ طولانی مدت است، اما هنوز زیربنای فیزیولوژیک آن به خوبی روشن نیست. برخی از محققین مشابهت‌های بسیاری را بین دو پدیده کنیدلینگ و تقویت طولانی مدت برشمرده‌اند و معتقدند که زیربنای این دو پدیده یکسان می‌باشد (۱۰).

از سال‌ها پیش حضور پپتیدهای اپیوئیدی و گیرنده‌های آنها در نواحی مختلف مغز نشان داده شده است. مرفین به عنوان نماینده این گروه از پپتیدها، اثرات خود را از طریق تحریک گیرنده های μ اعمال می‌کند (۱۳). نشان داده شده که اپیوئیدها می‌توانند سبب ایجاد تشنج در موش صحرایی گردند (۵). ایجاد کیندلینگ با اپیوئیدها توسط کاین (Cain) و همکارانش نشان داده شده است (۴) که این عمل می‌تواند کیندلینگ الکتریکی را نیز در آمیگدال تسهیل کند (۵). همچنین نشان داده شده است که برخی از داروهای اپیوئیدی در مقادیر اندک دارای اثرات ضد تشنجی و در مقادیر بیشتر دارای اثرات تقویتی در ایجاد تشنج هستند (۸) و میزان پپتیدهای اپیوئیدی به صورت انتخابی در حین تشنج و پس از آن کاهش می‌یابد (۱).

این دانستنی‌ها، محققین را بر آن داشته است که پیشنهاد کنند که آسیب مکانیسم‌های تنظیم کننده اپیوئیدها در بدن ممکن است در بروز صرع نقش داشته باشد. نکته قابل توجه این است که نتایج مطالعات مذکور بر پایه بررسی‌های انجام شده در خصوص اثرات مصرف حاد پپتیدهای اپیوئیدی است، امانقش تجویز مزمن این پپتیدها بر روی روند ایجاد صرع به خوبی مشخص نیست و بررسی آن می‌تواند در روشن ساختن نقاط مبهم نقش اپیوئیدها در ایجاد تشنج کمک کند. لذا در مطالعه حاضر نقش تجویز مزمن مرفین در دو مرحله ایجاد و تعدیل تشنجات صرعی با استفاده از روش کیندلینگ شیمیایی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

آزمایش‌ها بر روی ۲۷ عدد از موش‌های صحرایی نر با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم از نژاد wistar انجام شد. حیوانات به تعداد سه عدد در هر قفس و در شرایط طبیعی در آزمایشگاه نگهداری می‌شدند و بدون هیچ‌گونه محدودیتی، از آب و غذا استفاده می‌کردند.

روش ایجاد کیندلینگ شیمیایی:

جهت ایجاد کیندلینگ شیمیایی PTZ(۳۰mg/kg, i.p.) با فواصل زمانی ۴۸ ساعته تزریق گردید. پس از هر تزریق پاسخ‌های تشنجی حیوانات به مدت ۲۰ دقیقه مورد مشاهده قرار گرفت (۲). این پاسخ‌های تشنجی به صورت زیر طبقه‌بندی شدند:

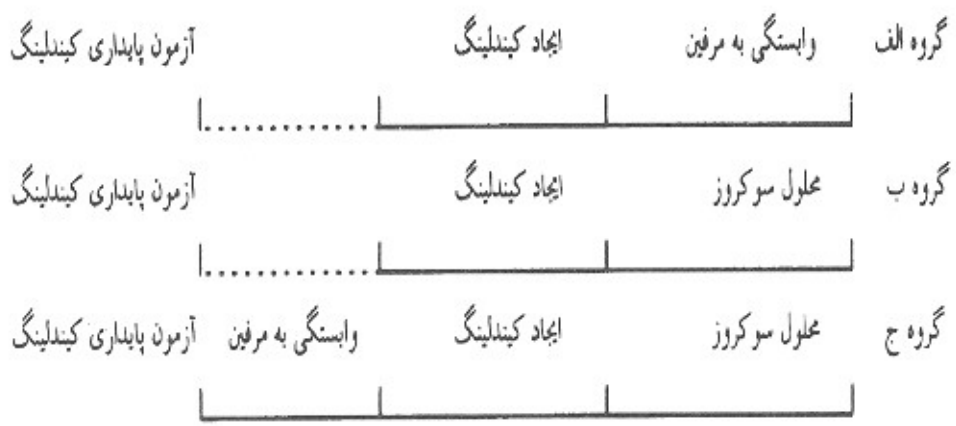
مرحله صفر، عدم پاسخ؛ مرحله یک، انقباض در ماهیچه‌های گوش و صورت؛ مرحله دو، ایجاد موج تشنجی در تمام بدن؛ مرحله سه، انقباض میوکلونیک؛ مرحله چهار، خم شدن یا برگشتن بر روی یک طرف بدن یا بروز تشنجات عمومی تونیک - کلونیک (۲). پس از هر تزریق، بالاترین مرحله مشاهده شده برای حیوان به عنوان شدت تشنج حیوان ثبت می‌گردید. در مورد هر حیوان، شاخص ایجاد کیندلینگ، مشاهده مرحله چهار در سه تزریق متوالی و یاحداکثر ۲۲ تزریق از PTZ در نظر گرفته شد.

روش ایجاد وابستگی به مرفین:

مرفین سولفات همراه با سوکروز (به میزان ۳ درصد نسبت وزن به حجم) به آب آشامیدنی اضافه گردید. غلظت مرفین سولفات در آب آشامیدنی در ۴۸ ساعت اول، دوم و سوم به ترتیب برابر با ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر بود. پس از آن تا پایان آزمایش، غلظت مرفین، ۰/۴ میلی‌گرم در هر میلی لیتر بود. پس از گذشت ۲۰ روز از دریافت محلول مرفین سولفات، بااستفاده از نالوکسان هیدروکلراید (۲mg/kg,i.p.)، علایم سندرم ترک تا ۲۰ دقیقه پس از تزریق مورد مشاهده قرار گرفت (۹). علایم مذکور عبارتند از: بی‌قراری (Irritability)، تکان دادن سر (Head shake)، اسهال (Diarrhea)، پایین افتادن پلک (Ptosis)، به هم فشردن دندان‌ها (Teeth chattering)، راست کردن بدن (Writhing)، انزال (Ejaculation)، جویدن (Chewing)، لرزش در اندام‌های جلویی (Paw tremor) و تکان دادن تمام بدن مشابه با رفتاری که یک سگ خیس از خود نشان می‌دهد (Wet dog shake).

با در نظرگرفتن دو روش مذکور حیوانات به ۳ گروه ۹ تایی (الف، ب و ج) تقسیم شده و آزمایش‌ها در سه مرحله متوالی زمانی به صورت زیر بر طبق شکل ۱ انجام گردید.

گروه الف: در این گروه پس از ایجاد وابستگی به مرفین و بررسی علایم سندرم ترک، کیندلینگ شیمیایی ایجاد می‌شد. در مدت ایجادکیندلینگ و پس از آن حیوانات مذکور همچنان از محلول مرفین سولفات استفاده می‌کردند. بیست روز پس از ایجاد کیندلینگ، پاسخ تشنجی حیوانات به یک دوز زیر آستانه از PTZ



شکل ۱ : *سه مرحله متوالی آزمایش‌ها در گروه‌های الف، ب و ج. مرحله اول (۲۰ روز)، مرحله دوم (۴۴ روز) و مرحله سوم (۲۰ روز). تعداد حیوانات در هر یک از گروه‌ها برابر با ۹ است.*

(۳۰mg/kg) مورد ارزیابی قرار گرفت. شدت پاسخ مذکور نشان‌دهنده میزان پایداری کیندلینگ است.

گروه ب: تمام مراحل ذکر شده در گروه الف، دقیقاً در مورد این گروه رعایت می‌شد، فقط حیوانات این گروه به جای محلول مرفین سولفات از آب آشامیدنی حاوی سوکروز ۳ درصد استفاده می‌کردند.

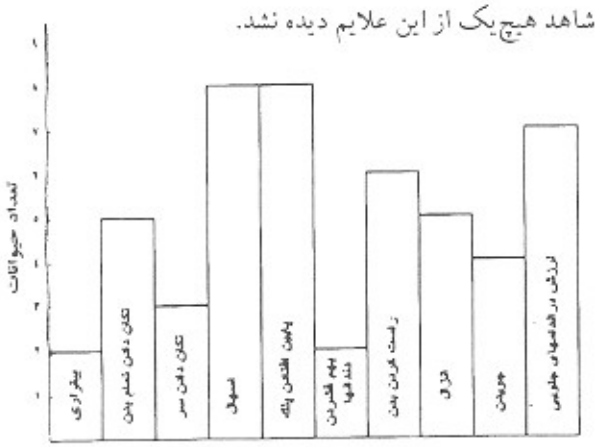
گروه ج: مراحل آزمایش در این گروه تا پایان ایجاد کیندلینگ با گروه ب یکسان بود. پس از ایجاد کیندلینگ در حیوانات این گروه، وابستگی به مرفین ایجاد شد و پس از بررسی علایم سندرم ترک، پاسخ تشنجی حیوانات به یک دوز زیر آستانه PTZ مورد ارزیابی قرار گرفت.

گروه الف به منظور بررسی اثرات وابستگی به مرفین بر ایجاد تشنجات صرعی و گروه ج به منظور بررسی اثرات وابستگی به مرفین بر پایداری تشنجات صرعی ناشی از کیندلینگ می‌باشد. گروه شاهد برای هر یک از این دو گروه، گروه ب است. جهت مقایسه مراحل مختلف تشنجات صرعی از Mann-whitney U-test استفاده گردید و موارد با $P<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

اثرات وابستگی به مرفین بر ایجاد کنیدلینگ:

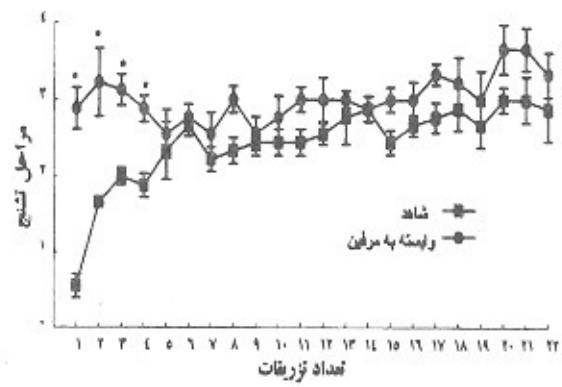
تزریق نالوکسان، بیست روز پس از استفاده از محلول مرفین سولفات سبب بروز علایم سندرم ترک گردید که فراوانی بروز هر یک از این علایم در حیوانات وابسته به مرفین در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌گونه که در این شکل مشخص است، اسهال و پتوز در مقایسه با سایر علایم فراوانی بیشتری داشتند. در گروه شاهد هیچ‌یک از این علایم دیده نشد.



شکل ۲ : *فراوانی بروز علایم سندرم ترک در گروه وابسته به مرفین (گروه الف، n=۹) پس از تزریق نالوکسان (۳mg/kg).*

در حیوانات گروه شاهد، به تدریج کیندلینگ ایجاد شد. در هیچ‌یک از حیوانات این گروه در پاسخ به اولین تزریق PTZ تشنج دیده نشد. در حالی‌که تزریقات بعدی سبب بروز پاسخ‌های تشنجی فزاینده گردیدند. پس از بیست و دومین تزریق، در یک عدد از حیوانات، تشنجات تونیک ـ کلونیک دیده شد و در ۵ عدد مرحله ۳ تشنج دیده شد. روند پاسخگویی حیوانات وابسته به مرفین (گروه الف) به تزریقات مکرر PTZ، تفاوت آشکاری را

نشان داد. در این گروه روند تدریجی در افزایش پاسخ‌های صرعی دیده نشد و برخلاف گروه شاهد، میانگین شدت پاسخ‌های تشنجی در اولین و آخرین تزریق، تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (شکل ۳). در واقع، اولین تزریق PTZ به حیوانات وابسته به مرفین سبب بروز مرحله ۴ تشنج در ۲ عدد از حیوانات شد. مقایسه میانگین شدت تشنجات صرعی در هر تزریق نشان داد که این متغیر در گروه وابسته به مرفین بیشتر از گروه شاهد است و این تفاوت در چهار تزریق اول معنی‌دار بود ($P<0/05$). به شکل ۳ توجه شود.



شکل ۳: *روند ایجاد کیندلینگ در دو گروه وابسته به مرفین (الف) و شاهد (ب). میانگین شدت تشنجات صرعی در گروه وابسته به مرفین (n=۹)، در چهارتزریق اول PTZ، به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد (n=۹) است.($^*P<0/05$)*

اثرات وابستگی به مرفین بر تعدیل تشنجات صرعی:

همان‌گونه که در قسمت قبل اشاره شد، تزریقات مکرر PTZ سبب افزایش تدریجی شدت تشنجات صرعی در گروه شاهد گردید. این پاسخ‌ها حتی پس از گذشت بیست روز از آخرین تزریق PTZ، در پاسخ به یک دوز زیر آستانه از آن، حفظ گردید. ایجاد وابستگی به مرفین در حیوانات کیندل شده (گروه ج) تأثیری بر این پاسخ‌های تشنجی پایدار نداشت زیرا در گروه وابسته به مرفین نیز دقیقاً همین روند مشاهده شد و بیست روز پس از ایجاد کیندلینگ، مقایسه میانگین شدت پاسخ‌های تشنجی در دو گروه شاهد و وابسته به مرفین تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P>0/05$).

قابل ذکر است که ایجاد کیندلینگ تأثیری بر روند وابستگی به مرفین نداشت. بیست روز مصرف مرفین سولفات سبب ایجاد وابستگی در حیوانات کیندل شده گردید و پس از تزریق نالوکسان علایم سندرم ترک مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که روند ایجاد کیندلینگ شیمیایی با PTZ تحت تأثیر وابستگی به مرفین قرار می‌گیرد. وابستگی به مرفین سبب تسهیل وقوع پدیدهٔ کیندلینگ می‌گردد اما پس از ایجاد آن بی‌تأثیر است.

تزریقات مکرر PTZ سبب بروز تغییرات مهمی در ساختمان‌های لیمبیک و به خصوص نئوکورتکس می‌گردد که نتیجه آن افزایش تدریجی تحریک پذیری است. این تغییرات می‌تواند تغییر در کانال‌های کلری وابسته به گیرنده‌های گابا (۳)، تغییر در گیرنده‌های NMDA (۳) و یا حتی تغییر در بیان ژن (gene expression) باشد (۱۲). از آنجا که این تغییرات در سطح سلولی و ملکولی صورت می‌گیرد، تشنجات ایجاد شده در اثر کیندلینگ به صورت پایدار باقی می‌ماند. در مطالعه حاضر، پایداری تشنج‌ها تا روز بیستم پس از آخرین تزریق نشان داده شده است.

با توجه به توزیع فراوان گیرنده‌ها و پپتیدهای اپیوئیدی در نئوکورتکس، مصرف مزمن مرفین سبب بروز تغییراتی در مدارهای نورونی می‌گردد که شکل پذیری سیناپسی را تعدیل کرده و سبب افزایش پدیده تقویت طولانی مدت می‌گردد (۹). به علاوه ترشح اپیوئیدهای داخلی در هنگام تحریکات کنزازی افزایش یافته و این مسأله سبب افزایش تقویت طولانی مدت در هیپوکامپ می‌گردد (۱۴). گیرنده‌های اپیوئیدی در این حالت سبب مهار پتانسیل‌های پس سیناپسی مهاری می‌گردند (۱۴). این عمل که از طریق مهار ترشح گابا صورت می‌گیرد، اولین عمل الکتروفیزیولوژیک اپیوئیدها در هیپوکامپ است (۶).

احتمال دارد که نقش وابستگی به مرفین بر تسهیل وقوع پدیدهٔ کیندلینگ در مطالعهٔ حاضر ناشی از کاهش ترشح گابا باشد، هر چند پاسخ نئوکورتکس به تجویز مزمن مرفین از دید نوروشیمی بسیار پیچیده است. مطالعات نشان داده است که مصرف مزمن مرفین تأثیری بر ترشح گابا ندارد، در حالی‌که تجویز حاد آن سبب کاهش گابا میشود (۱۳).

از طرف دیگر احتمال دارد که مصرف مزمن مرفین از طریق تقویت پاسخ‌های تحریکی سیناپسی سبب تسهیل در ایجاد تشنجات صرعی شده باشد که بر اساس گزارش‌های موجود، نقش تجویز مزمن مرفین بر ترشح گلوتامات نامشخص است (۱۳). همچنین تغییرات گیرنده‌های اپیوئیدی در هنگام مصرف مزمن مرفین نیز می‌تواند در تشدید حملات صرعی نقش داشته باشد (۱۳).

بدیهی است برای دستیابی به درک علت و زیر بنای سلولی

اثرات تشدیدکنندهٔ وابستگی به مرفین بر پدیدهٔ کیندلینگ نیاز به مطالعات متعدد در سطح سلولی و ملکولی است، اما آنچه از نتایج این مطالعه به دست می‌آید این است که تغییرات مذکور در صورتی در تشدید تشنجات صرعی مؤثر خواهند بود که قبل از وقوع پدیدهٔ کیندلینگ اتفاق افتاده باشند.

بر اساس نتایج این مطالعه، اثرات وابستگی به مرفین بر روند ایجاد کیندلینگ هم راستا با اثرات آن بر پدیدهٔ تقویت طولانی مدت است. این یافته در جهت مدل پیوستار شکل‌پذیری - آسیب‌شناسی است (۱۰) که در آن صرع، نمودی تشدید یافته از تقویت طولانی مدت ذکر شده است.

سپاسگزاری:

بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان به واسطه تصویب و تقبل هزینه‌های طرح مذکور و از مرکز تحقیقات علوم اعصاب به دلیل فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی و فضای مناسب سپاسگزاری می‌گردد. همچنین از جناب آقای دکتر علیرضا فرومدی برای تهیه مرفین سولفات و از زحمات سرکار خانم تاج‌پوری کلانتری‌پور که در جمع‌آوری داده‌های مطالعه مذکور ما را یاری نموده‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

Summary

Effects of Morphine-Dependence on the Induction and Modulation of Epileptic Seizures in Rats

N. Atapour; PhD[1]; and M. Niazi; MD[2]

1. Assistant Professor of Physiology 2. General Practitioner, Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran

Kindling is a very suitable animal model for studying basic mechanisms of epilepsy. In this model, repeated exposure to weak electrical or chemical stimuli, increases neuronal excitability and therefore decreases the threshold for induction of epileptic seizures. According to abundant distribution of opioid peptides and their receptors in different brain structures and also the role of these receptors on the excitability of neurons, we studied the effects of repeated morphine administration on the induction and modulation of epileptic seizures. Male rats were made dependent by gradual increase in concentrations of morphine sulphate in drinking water. Then, pentylenetetrazole (PTZ, 30 mg/kg) was injected intraperitoneally at 48 hours interval and epileptic seizures of control and dependent rats were compared in 22 serial injections. In another series of experiments, morphine-dependence was induced after kindling and 20 days later, seizure responses to a single subtreshold dose of PTZ were compared. The results showed that morphine dependence, facilitates the induction of chemical kindling, but when kindling is induced, morphine-dependence has no effect on it. It seems that morphine-dependence has important effects on the neuronal excitability that is presented as facilitation of kindling induction in this study.

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 1998; 5(4): 153-158

Key Words: *Epilepsy, Kindling, Morphine, Pentylenetetrazole*

References

1. Asai M, Matamoros Trejo G, Talavera E, Cano Martinez A and Avila ME. Opioid peptides content in the rat brain during the ictal phase and after pentylene-tetrazol- kindled rats. *Comp Biochem Physiol* 1995; 112(1): 241-245.
2. Barkai E, Grossman Y and Gutnick MJ. Long term changes in neocortical activity after chemical kindling with systemic pentylenetetrazole: an *in vitro* study. *J Neurophysiol* 1994; 72(1): 72-83.
3. Bradford HF. Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog Neurobiol* 1995; 47(6): 477-511.

4. Cain DP, Boon F and Corcoran ME. Involvement of multiple opiate receptors in opioid kindling. *Brain Res* 1990; 517(1-2): 236-244.
5. Cain DP and Corcorn ME. Epileptiform effects of Met-enkephalin, β-endorphin and morphine: kindling of generalized seizures and potentiation of epileptiform effects by handling. *Brain Res* 1985; 338(2): 327-336.
6. Caudle RM, Wagner JJ and Chavkin C. Endogenous opioids released from perforant path modulate norepinephrine actions and inhibitory postsynaptic potentials in guinea pig CA3 pyramidal cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 258(1): 18-26.
7. Goddard GV, Mc Intyre DC and Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol* 1969; 25(3): 295-330.
8. Lauretti GR, Ahmad I and Pleuvry BJ. The activity of opioid analgesics in seizure models utilizing N-methyl-DL-aspartic acid, kainic acid, bicuculline and pentylenetetrazole. *Neuropharmacology* 1994; 33(2): 155-160.
9. Mansouri FA, Motamedi F, Fathollahi Y, Atapour N and Semnanian S. Augmentation of LTP induced by Primed-Bursts tetanic stimulation in hippocampal CA1 area of morphine dependent rats. *Brain Res* 1997; 769: 119-124.
10. McEachern JC and Shaw CA. An alternative to the LTP orthodoxy: a plasticity-pathology continuum model. *Brain Res Rev* 1996; 22(1): 51-92.
11. McNamara JO, Byrne MC, Dasheiff RM and Fitz JG. The kindling model of epilepsy: a review. *Prog Neurobiol* 1980; 15(2): 139-159.
12. Qian Z, Gilbert ME, Colicos MA, Kandel ER and Kuhl D. Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation. *Nature* 1993; 361(6411): 453-457.
13. Simonato M. The neurochemistry of morphine addiction in the neocortex. *Trends Pharmacol Sci* 1996; 17(11): 410-415.
14. Xie CW and Lewis DV. Opioid-Mediated facilitation of long-term potentiation at the lateral perforant path-dentate granule cell synapse. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 256(1): 289-296.