

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

دکتر احسان صبوری^۱، دکتر مهزاد مهرزاد صدقیان^۲، دکتر مجتبی کریمی پور^۳، دکتر جواد میرزا آقازاده^۴

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 صوری 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 هرمی در ناحیه CA1 به عمل آمد. فعالیت‌های صرعی از نظر فرکانس اجزای مختلف حمله مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: همه‌ی 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 نتوانست 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 برحسب 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

^۱ استادیار گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

^۲ استادیار گروه زنان و مامائی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

^۳ استادیار گروه تشریح دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

^۴ استادیار گروه جراحی اعصاب دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

دکتر احسان صبوری، دکتر مهزاد مهرزاد صدقیان، دکتر مجتبی کریمی پور، دکتر جواد میرزا آقازاده

26 NaHCO₃, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgSO₄, 1.25 NaH₂PO₄,
125 NaCl and 14 glucose

محلول دیگر Low Mg²⁺ ACSF بود که برای ایجاد امواج صرعی
مورد استفاده قرار گرفت که دارای محتویات زیر بود (بر حسب
میلی مول):

26 NaHCO₃, 5 KCl, 2 CaCl₂, 0.2 MgSO₄, 1.25 NaH₂PO₄,
125 NaCl and 14 glucose

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

ثبت الکتروفیزیولوژی: به کمک میکروپیت شیشه‌ای 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 سانتی‌گراد حفظ شد. فعالیت‌های
صرعی که پیش از این توسط محققین دیگر (۱۲، ۱۷، ۱۸) وقایع شبه
حمله یا (SLE)^۱ نامیده شده به وسیله Low Mg²⁺ ACSF القاء و
به طور مستمر ثبت شد. امواج ثبت شده به کمک آمپلی فایر Axo-
clamp 2A تقویت و فیلتر (1kHz) شد. پتانسیل‌های 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 نرم‌افزاری 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، میکرو مول) بر روی فعالیت هیپوکامپ کامل جدا
شده به صورت in vitro بررسی شد.

تجزیه و تحلیل آماری: فرکانس انواع فعالیت‌های ثبت شده به
وسیله 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. نتایج به صورت Mean ± SEM نشان
داده شده‌اند.

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

سیستم مهاری، گابا می‌باشد. در هنگام کاهش فعالیت سیستم
گابارژیک و یا افزایش فعالیت سیستم گلوتاماترژیک حمله صرعی
می‌تواند بروز کند (۷، ۱۰، ۱۱). گزارش‌های متعددی اشاره می‌کنند
که هردو سیستم فوق‌الذکر می‌توانند 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 تناقض‌های موجود پاسخ داده شود. برای ایجاد صرع از
مدل Low Mg²⁺ ACSF استفاده شد، زیرا در این مدل احتمالاً
سیستم‌های نوروترانسمیتری مغز کمتر تحت تاثیر قرار می‌گیرد. کم
بودن غلظت یون Mg²⁺ در محلول ACSF موجب حذف انسداد
موجود در کانال‌های کلسیمی گیرنده NMDA گلوتامات شده، در
نتیجه باعث ورود کلسیم به داخل سلول و دپولاریزاسیون آن
می‌گردد که در جای مناسب می‌تواند 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 Low Mg²⁺ ACSF در موش‌های نوزاد بود.

مواد و روش‌ها

حیوانات و روش آزمایش: در این مطالعه از موش‌های 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 بی‌هوش 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 سانتی‌گراد
که به طور مرتب اکسیژنه می‌شد (۹۵٪ اکسیژن و ۵٪ دی‌اکسید
کربن) قرار گرفت. هیپوکامپ‌ها با دقت و سرعت هر چه تمام‌تر
خارج شده و به داخل ACSF طبیعی که به طور مرتب اکسیژنه
می‌شد انتقال داده شده و حداقل به مدت یک ساعت (۱۵، ۱۴، ۱۱)
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 می‌شد و دارای
محتویات زیر بود (بر حسب میلی مول):

¹ Seizure Like Events

² Axon Instruments

³ Axon Instruments

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

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 Morphine Mor + nal washout	2.5 ± 0.4 0.5 ± 0.17 0.89 ± 0.2 * 1.16 ± 0.23	1.53 ± 0.14 0.65 ± 0.13 0.00 * 1.2 ± 0.15	0.72 ± 0.23 0.27 ± 0.09 * 0.25 ± 0.08 0.71 ± 0.24
کلونیک	Control Morphine Mor + nal washout	1.17 ± 0.06 0.93 ± 0.05 * 0.85 ± 0.08 0.92 ± 0.04	1.09 ± 0.03 0.84 ± 0.05 * 0.21 ± 0.04 1.19 ± 0.05	1.21 ± 0.07 1.26 ± 0.15 * 0.8 ± 0.077 1.04 ± 0.09
<i>intraburst</i>	Control Morphine Mor + nal washout	30.3 ± 2.19 23.2 ± 2.18 19.9 ± 1.8 * 29 ± 1.7	19.3 ± 1.1 10 ± 1.8 * 9.5 ± 0.5 19.3 ± 3.1	15.5 ± 5.03 5.2 ± 2.05 4.1 ± 1.35 * 16 ± 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.

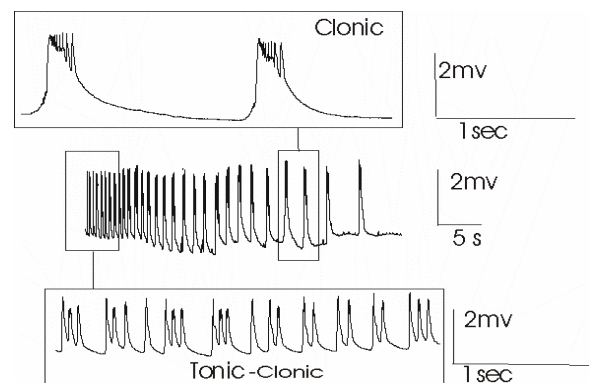
نتایج

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.

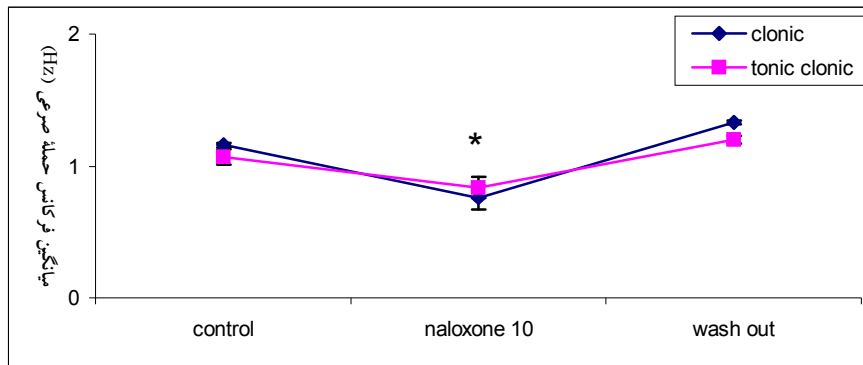
(۳) فاز کلونیک (۲-۰/۳ Hz) که ۳۰ تا ۱۲۰ ثانیه طول می‌کشید.



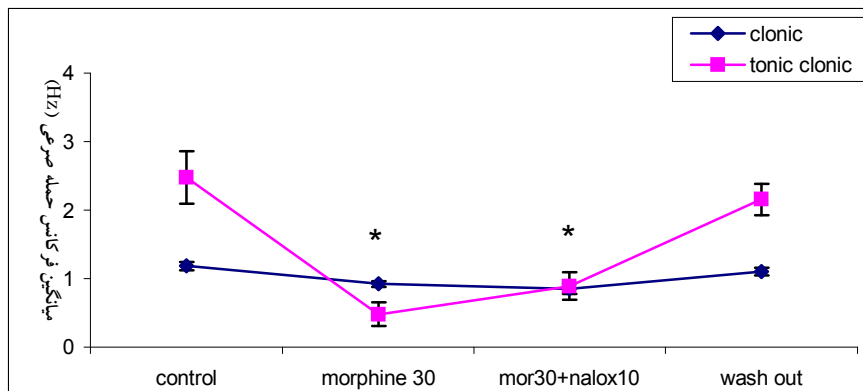
شکل شماره ۱: یک نمونه از حمله صرعی به مدت ۴۰ ثانیه از هیپوکامپ یک موش ۱۲ روزه، *in vitro*. در پانل وسط کل یک حمله نشان داده شده است. مستطیل‌هایی که روی دو قسمت این حمله رسم شده، آن ناحیه را به صورت باز شده نمایش داده است.

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
intraburst	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

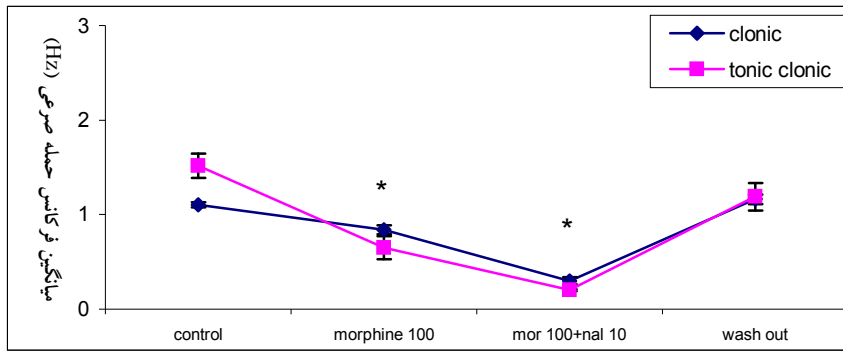


شکل شماره ۲: اثر نالوکسان ۱۰ μM بر فرکانس حمله صرعی در هیپوکامپ موش (n=10) به صورت *in vitro*. نالوکسان فرکانس قسمت‌های تونیک-کلونیک و کلونیک را به طور معنی داری کم کرد ($p < 0.01$).

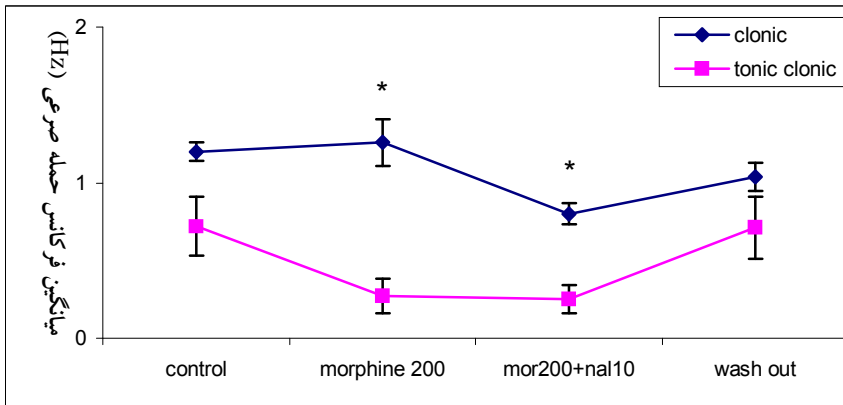


شکل شماره ۳: اثر مورفین بر فرکانس حمله صرعی در هیپوکامپ موش (n=10). *in vitro*. مورفین ۳۰ μM فرکانس قسمت تونیک-کلونیک حمله صرعی را به طور معنی داری کاهش داد که با شستشو برگشت پذیر بود ($p < 0.01$).

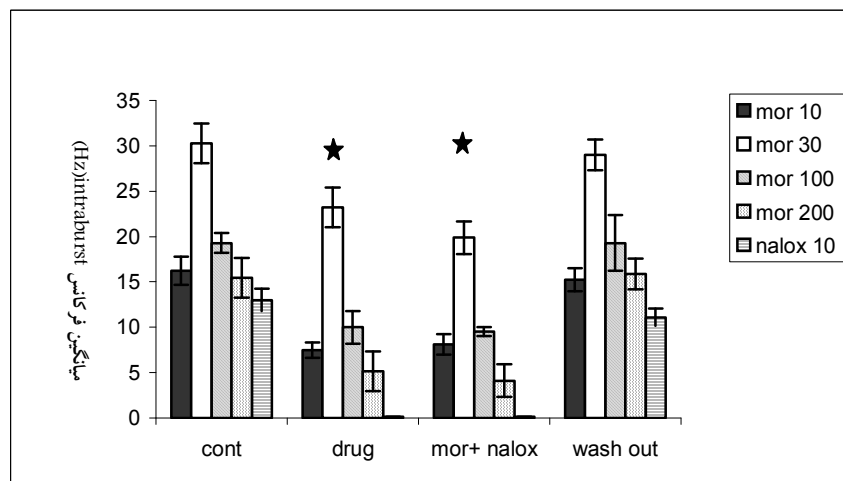
اثر مرفین بر فرکانس تشنج هیپوکامپی در نوزاد موش به صورت *in vitro*



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 $10 \mu\text{M}$ 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 ($p < 0.01$).

بحث

در این مطالعه، ما هیپوکامپ کامل موش سوری را با تمام مدارهای نورونی داخلی آن مورد استفاده قرار دادیم (۱۴). هدف این بود که نقش غلظت‌های مختلف مرفین را بر روی فرکانس فعالیت صرعی القاء شده به وسیله $Low\ Mg^{2+}\ ACSF$ بررسی کنیم.

نتایج مطالعه ما نشان داد که مرفین با غلظت‌های به کار رفته فرکانس تمام قسمت‌های حمله صرعی را کم کرد و نالوکسان $10\ \mu m$ نیز همین اثر را اعمال نمود. هنگامی که مرفین و نالوکسان به طور همزمان استفاده شد، سبب کاهش بیشتری در فرکانس قسمت‌های مختلف شد. یعنی نالوکسان نه تنها از بروز اثرات مرفین جلوگیری نکرد، بلکه این اثرات را تشدید نمود. احتمال دارد که مرفین و نالوکسان از راه دیگری به غیر از گیرنده‌های شناخته شده اپیوئیدی باعث بروز این اثرات شده باشند. احتمال تداخل در سیستم‌های زیر می‌تواند مطرح باشد:

۱) مرفین و نالوکسان با تداخل در سیستم گلوتاماتی و جلوگیری از اثرات تحریکی این سیستم باعث مهار و کاهش فرکانس فعالیت صرعی شده اند. گزارش شده که گیرنده‌های $NMDA$ در ایجاد فعالیت‌های صرعی به وسیله مرفین نقش مهمی بر عهده دارند (۲۱). در این رابطه نشان داده شده که فیبرهای خزه‌ای ناحیه $CA3$ هیپوکامپ نسبت به مرفین بسیار حساس می‌باشند. علاوه بر این نشان داده شده که دینورفین به عنوان یک اپیوئید اندورژن به همراه گلوتامات از فیبرهای خزه‌ای آزاد می‌شود تا باعث تعدیل میزان آزاد شدن گلوتامات شود. بنابراین ممکن است مرفین از آزاد شدن گلوتامات از فیبرهای خزه‌ای جلوگیری کرده باشد (۲۱، ۲).

۲) ممکن است از تداخل عمل بین سیستم اپیوئیدی با دیگر سیستم‌های نوروترانسمیتری نظیر ادنوزین، اپی نفرین و دوپامین باعث کاهش فرکانس امواج صرعی شده باشد. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد، وابستگی به مرفین می‌تواند باعث تشدید

حساسیت گیرنده‌های آدنوزینی شود و همین‌طور می‌تواند باعث افزایش آزاد سازی نوراپی نفرین و افزایش تولید $cAMP$ القاء شده به وسیله گیرنده DI دوپامینی شود (۲۳، ۲۲). از آنجا که ادنوزین به عنوان یک ماده ضد صرع درونی مطرح می‌باشد (۲۴) و از سوی دیگر مرفین حساسیت گیرنده‌های آدنوزینی را افزایش می‌دهد، احتمال دارد که حداقل قسمتی از اثرات مهار مرفین در کاهش فرکانس امواج صرعی به سیستم آدنوزینی مربوط باشد. بنابراین شاید مرفین از طریق اعمال اثر بر سیستم آدنوزینی باعث کاهش فرکانس امواج صرعی شده باشد.

اثر مهار مرفین نالوکسان بر فرکانس امواج صرعی: چندین مطالعه بیان کننده اثر مهار مرفین نالوکسان بر فعالیت صرعی می‌باشد. اما در تمام این مطالعات این اثر مهار از طریق گیرنده‌های اپیوئیدی توجیه شده است. در یک مطالعه بر روی موش‌های صحرای زنده نالوکسان حملات صرعی را از نظر بروز، مدت و شدت کاهش داد (۲۶، ۲۵). به نظر می‌رسد که در مطالعه ما نیز نالوکسان به همین ترتیب موجب کاهش فرکانس امواج صرعی شده است. یعنی اگر مکانیسم‌های ارائه شده در بالا رادر مورد اثر مرفین بر فرکانس امواج صرعی محتمل بدانیم، پس از اضافه کردن نالوکسان به محیط آزمایش، اثرات مهار مرفین نالوکسان بروز کرده و موجب تضعیف بیشتر فرکانس امواج حمله صرعی شده است. به طور کلی نتیجه‌گیری می‌شود که اپیوئیدها بخصوص مرفین از راهی غیر از گیرنده‌های شناخته شده اپیوئیدی نیز می‌تواند حملات صرعی را تحت تاثیر قرار دهد. همچنین با تکیه بر نتایج این مطالعه، اثر مهار مرفین نالوکسان بر صرع بار دیگر مورد تایید قرار گرفت.

پیشنهاد می‌شود این مطالعه در حضور کنترل سیستم‌های گلوتاماتی، آدنوزینی، دوپامینی و آدرنژیکی تکرار گردد. در آن صورت بهتر و دقیقتر می‌توان اثرات مهار مرفین و نالوکسان بر فرکانس حملات صرعی را توجیه کرد.

References:

01. Brockhaus A, Elger CE. Complex seizures of temporal lobe epilepsy origin in children of different age groups. *Epilepsia* 1995; 36: 1173-1181.
02. Solbrig, MV Koob GF. Epilepsy, CNS viral injury and Dynorphin. *Trends in Pharmacological Sciences* 2004; 25(2): 98-104.
03. AkiL, H. Endogenous opioid: biology and function. *Annu Rev Neurosci* 1984; 7: 223-255.
04. Cain D P, Corcoran, M.E. Intracerebral beta-endorphin, met-enkephalin and morphine: Kindling of seizures and handling-induced potentiation of epileptiform effects. *Life Sci* 1984; 34(25): 2535-2542.

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 Mg²⁺ 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*. 5th 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, Samoiloa 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.