

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

*Μελέτη της επίδρασης του οπιοειδούς φεντανύλη  
στην έκφραση του ενζύμου NADPH-διαφοράση  
στον ιππόκαμπο επίμυος*

Τσινόγκος Βασίλειος

Υπεύθυνες Καθηγήτριες: Ά. Βασιλάκη και Ε. Ασπροδίνη, Εργαστήριο  
Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2006





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 4999/1  
Ημερ. Εισ.: 13-11-2006  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2006  
ΤΣΙ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087757

## *Ευχαριστίες*

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους :

*Βασιλάκη Άννα*, Λέκτορα Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τις πολύ σημαντικές της υποδείξεις σε θέματα φαρμακολογίας και την πολύτιμη Βοήθεια της σε θέματα εργαστηρίου καθ' όλη την διάρκεια της πτυχιακής εργασίας.

*Ασπροδίνη Ευτυχία*, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στα εργαστήρια του τμήματος της Ιατρικής και για τις σημαντικές και πολύ χρήσιμες συμβουλές της σε θέματα φαρμακολογίας και όχι μόνο.

*Ζίφα Αιμιλία*, Λέκτορα Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογία του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ως μέλος της τριμελούς επιτροπής και για την συμβολή της στην πραγματοποίηση της πτυχιακής εργασίας.

*Κουκουτιανού Ιωάννα*, Ιατρό, Ειδικευόμενη Αναισθησιολόγο, για την πολύτιμη Βοήθεια της σε θέματα εργαστηρίου καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον προϊστάμενο μου, *κο Αραμπατζή Αχιλλέα* καθώς και όλους του *συναδέλφους* μου, στο τμήμα Οπλισμού της 348 Μοίρας Τακτικής Αναγνώρισης της Πολεμικής Αεροπορίας, για την κατανόηση τους και τη διάθεση του απαραίτητου χρόνου για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης εργασίας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
SUMMARY .....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
ΠΟΝΟΣ.....	6
<i>Κατηγορίες πόνου.....</i>	6
<i>Διαβίβαση του πόνου.....</i>	7
ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΣ .....	10
<i>Ανατομία - Ιστολογία.....</i>	10
<i>Διασυνδέσεις του ιπποκάμπου.....</i>	14
<i>Ρόλος του ιπποκάμπου.....</i>	17
ΟΠΙΟΕΙΔΗ.....	18
<i>Οπιοειδείς υποδοχείς.....</i>	18
<i>Οπιοειδικά φάρμακα.....</i>	19
<i>Φεντανύλη.....</i>	20
NMDA ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ.....	21
<i>Λειτουργία των NMDA υποδοχέων.....</i>	22
ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΡΙΖΑ ΤΟΥ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ (NO <sup>•</sup> ).....	23
<i>Σύνθεση της NO<sup>•</sup>.....</i>	24
<i>Ρόλος της NO<sup>•</sup>.....</i>	25
<i>NO<sup>•</sup> και εγκέφαλος.....</i>	26
<i>Μηχανισμοί δράσης της ελεύθερης ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου στο Κ.Ν.Σ.....</i>	26
<i>NADPH-διαφοράση.....</i>	28
ΥΠΕΡΑΛΓΗΣΙΑ ΚΑΙ ΟΠΙΟΕΙΔΗ.....	29
ΣΚΟΠΟΣ.....	30
<b>ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ .....</b>	<b>31</b>
ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣΩΑ .....	31
ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΦΕΝΤΑΝΥΛΗΣ - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ .....	31
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΙΣΤΟΥ.....	31
ΖΕΛΑΤΙΝΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΦΟΡΩΝ ΠΛΑΚΩΝ.....	32
ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΧΡΩΣΗ NADPH-ΔΙΑΦΟΡΑΣΗΣ.....	32
ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ.....	33
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>35</b>
ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΟΣ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΗΣ NADPH-ΔΙΑΦΟΡΑΣΗΣ .....	35
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΦΕΝΤΑΝΥΛΗΣ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ NADPH-ΔΙΑΦΟΡΑΣΗΣ ΣΤΟΝ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟ ΕΠΙΜΥΟΣ .....	36

<i>Επίδρασης της φεντανύλης στον αριθμό των κυττάρων που εκφράζουν NADPH-διαφοράση</i>	<i>36</i>
<i>Επίδρασης της φεντανύλης στα επίπεδα έκφρασης της NADPH-διαφοράσης</i>	<i>41</i>
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>42</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>44</b>
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	44
ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΟΙ ΤΟΠΟΙ	49
ΒΙΒΛΙΑ	50

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αναλγητικά οπιοειδή είναι πολύ αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση πολλών καταστάσεων πόνου. Η ανοχή όμως στα οπιοειδή αποτελεί ένα φαρμακολογικό φαινόμενο που μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την κλινική χρήση αυτών.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως η νευρωνική πλαστικότητα που σχετίζεται με την ανάπτυξη ανοχής στα οπιοειδή ενεργοποιεί έναν νευρωνικό μηχανισμό ο οποίος επενεργεί αρνητικά στα αναλγητικά αποτελέσματα των οπιοειδών. Έτσι, η χορήγηση οπιοειδών μπορεί να οδηγήσει σε δύο φαινομενικά άσχετες κυτταρικές διαδικασίες: την ανάπτυξη ανοχής και την επαγόμενη από τα οπιοειδή αλγαισθησία. Χρησιμοποιώντας την ιστοχημική ανάλυση της NADPH διαφοράσης, εξετάσαμε την επίδραση του οπιοειδικού αγωνιστή φεντανύλη στον ιππόκαμπο επίμυων Wistar.

Η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου ( $\text{NO}^-$ ) είναι ένας ενδοκυττάριος διαβιβαστής με ευρύ φάσμα στις νευρωνικές λειτουργίες. Η  $\text{NO}^-$  συντίθεται από την δράση των διαφόρων ισομορφών των συνθασών του μονοξειδίου του αζώτου (NOS). Η νευρωνική NADPH-διαφοράση είναι μια συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου. (Hope και συν, 1991), επομένως η ιστοχημεία της NADPH-διαφοράσης αποτελεί έναν πολύ καλό δείκτη των νευρώνων που παράγουν  $\text{NO}^-$ .

Για την μελέτη της επίδρασης φεντανύλης χορηγήθηκαν τέσσερις δόσεις του οπιοειδούς ανά χρονικά διαστήματα των 15-20 λεπτών. Τέσσερις ,6,12 και 24 ώρες μετά την χορήγηση της τελευταίας δόσης φεντανύλης συλλέχθηκαν οι εγκεφαλοι των ζώων, τα οποία είχαν μονιμοποιηθεί με 4% διαλύματος παραφορμαλδεΐδης αφού προηγουμένως αναισθητοποιήθηκαν με χρήση θειοπεντάλης. Στη συνέχεια, πάρθηκαν τομές των εγκεφάλων με την χρήση κρουτόμου στις οποίες και έγιναν ιστοχημικές μελέτες στην περιοχή του ιπποκάμπου για την ύπαρξη νευρώνων θετικών στην NADPH-διαφοράση. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τόσο ο αριθμός όσο και η ένταση του σήματος των θετικών κύτταρων στην NADPH-διαφοράση στα δείγματα ελέγχου ήταν πολύ λίγα. Το μεσοδιάστημα των δόσεων επέδειξε μια πιο διακριτή αύξηση στα θετικά κύτταρα με τα υψηλότερα επίπεδα θετικών κυττάρων στην NADPH -διαφοράση να παρουσιάζονται 24 ώρες μετά την χορήγηση της τελευταίας δόσης φεντανύλης. Αν και περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για την διευκρίνιση του ακριβή μηχανισμού αλληλεπίδρασης οπιοειδών- $\text{NO}$  στον ιππόκαμπο, τα αποτελέσματα μας υποδεικνύουν ότι ακόμα και μία οξεία χορήγηση μ-οπιοειδούς είναι αρκετή για να επάγει μακροχρόνια αύξηση της δραστηριότητας της NOS στον ιστό.



## SUMMARY

Although it is known that pain perception can be altered by mood, attention and cognition, or by direct stimulation of the cerebral cortex, little is known of the neural mechanisms underlying the brain modulation of pain (Calejman et al., 2000, Jasmin et al., 2003). Hippocampus has been proposed to be involved in pain processing and serve as an amplifier of aversive pain events (Archer et al., 1997 Kakigi et al., 2004). As far as opioids are concerned, there is a growing number of studies implicating  $\mu$ -opioid receptor activation with a sustained increase in glutamate synaptic effectiveness at the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor level, a system that is associated with central hypersensitivity to pain (for review see: Mao et al., 1995). Among the cellular events associated with NMDA receptor activation is influx of calcium, which triggers a cascade of intracellular events, including activation of nitric oxide synthase (NOS) (for review see: Meller et al., 1993).

In order to study the effect of acute in vivo administration the  $\mu$ -opioid selective analogue fentanyl, on NOS activity in hippocampus, adult Wistar male rats were treated with saline or fentanyl in a dosage (4 s.c. injections of 80 $\mu$ g/0.4ml/kg every 15 min; total dose: 320  $\mu$ g/kg) that mimics the use of fentanyl during surgery and that has been reported to cause hyperalgesia secondary to its analgesic effect (Hope et al., 1991). NADPH-diaphorase activity (NOS marker: Celerier et al., 2000) was subsequently studied in different hippocampal areas 4, 6, 12 and 24 hours after fentanyl treatment.

In saline treated animals, NADPH-diaphorase activity was localized in the cell bodies and processes of sparsely occurring interneurons present in all hippocampal areas studied. Acute in vivo administration of fentanyl resulted in a gradual increase of the number of neurons expressing the enzyme as well as the intensity of NADPH-diaphorase staining in the CA1-3 hippocampal fields, molecular and granular layers of dentate gyrus (DGm/g), polymorph layer of dentate gyrus (DGp) and the molecular and granular layers of CA2/3 fields and dentate gyrus (DG-CA2,3m/l). This increase on the number of cells expressing NADPH-diaphorase as well as the intensity of enzyme activity was most profound 24 hours after drug exposure.

Although further studies are necessary for the elucidation of the mechanism underlying opioid-nitric oxide interactions in hippocampus, our data suggest that a single acute opioid administration is sufficient to induce a long-lasting increase of NOS activity in the tissue.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## ΠΟΝΟΣ



Πόση ελκυστικότητα θα διέθετε ο Παράδεισος, αν δεν υποσχόταν απαλλαγή από τον πόνο, σωματικό ή ψυχικό, σε αντίθεση με τη ζοφερή απειλή του κολαστηρίου, που απειλεί με αιώνιους πόνους; Ο πόνος είναι το δυσάρεστο αίσθημα, το οποίο προκύπτει σε περίπτωση βλαπτικών ερεθισμάτων από το περιβάλλον ή από το ίδιο το σώμα μας και είναι φανερό ότι κατ' αρχήν αποτελεί πολύτιμο «σήμα» που καθοδηγεί τη συμπεριφορά μας, έτσι ώστε

αποφεύγοντας τη δυσάρεστη δοκιμασία, να αποφεύγουμε τη βλάβη. (Μόντη, 2001)

Η λέξη «πόνος» προέρχεται από το αρχαίο ελληνικό ρήμα «πένομαι» δηλαδή εργάζομαι σκληρά που ήταν συνώνυμο της έννοιας «καταβάλλω μεγάλη σωματική δύναμη». Αρχικά οι Ρωμαίοι πήραν το παράγωγο της λέξης «πόνος», «ποινή», και το μετέτρεψαν σε «roena» (ποένα) που σήμαινε «τιμωρία» και αργότερα «εκδίκηση» (για έγκλημα).

Από εκεί το «roena» ταξίδεψε στη Γαλλία όπου έγινε «raïne» (πέιν) που αρχικά σήμαινε «βασανιστήρια των ιερομαρτύρων» κι από κει αργότερα προήλθε και το αγγλικό pain που του δόθηκε η σημασία «πόνος» σαν αποτέλεσμα των πόνων από τα βασανιστήρια, αλλά και τις τιμωρίες γενικότερα.

Σύμφωνα με τον ορισμό που καθιέρωσε η Παγκόσμια Οργάνωση για τη Μελέτη του Πόνου (International Association for the Study of Pain), ο πόνος είναι μία δυσάρεστη αισθητική ή συναισθηματική εμπειρία, η οποία συνδέεται με πραγματική ή δυνητική ιστική καταστροφή (Γκιάλα Μ, 1998).

Όπως λοιπόν και να μεταφράσουμε την λέξη πόνος δεν αλλάζει το γεγονός πως αποτελεί αναμφίβολα μέρος της ζωής μας και πως η μελέτη του για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, χρήζει μεγάλης προσοχής.

**Κατηγορίες πόνου**

Το άλγος διακρίνεται σε δύο τύπους : το οξύ άλγος και το χρόνια άλγος.

- Το οξύ άλγος είναι βραχυχρόνιο παραμένει γενικά, μόνο για το διάστημα κατά το οποίο υφίσταται ιστική βλάβη και αντιπροσωπεύει μία φυσική, φυσιολογική αμυντική αντίδραση του οργανισμού.
- Το χρόνια άλγος είναι έκδηλο ακόμη και όταν οι φυσιολογικοί μηχανισμοί ίασης έχουν ολοκληρώσει το έργο τους, ενώ σε νόσους, όπως η ρευματοειδής



αρθρίτιδα, ενδέχεται να παραμένει για εβδομάδες, μήνες ή και ολόκληρα χρόνια

### **Διαβίβαση του πόνου**

Από τους ειδικούς αλγοποδοχείς, υπεύθυνους για την εκτίμηση του πόνου στους περιφερικούς ιστούς, έως την αναμετάδοση του στα ανώτερα εγκεφαλικά κέντρα, η διαδρομή περιλαμβάνει πληθώρα μορίων και δομών. Δομές όπως οι αλγοϋποδοχείς, τα οπίσθια κέρατα του νωτιαίου μυελού, ανιούσες οδοί του άλγους, ανώτερες περιοχές του εγκεφάλου όπως θάλαμος, ιππόκαμπος κ.α, επεξεργάζονται τα “πακέτα πληροφοριών” μέσω μορίων όπως τοπικών ορμονών στην περιφέρεια και νευροδιαβιβαστών στο κέντρο. Το ευρύ φάσμα ερευνών των τελευταίων χρόνων έχει αναδείξει επίσης κάποια ιδιαίτερα κλινικά χαρακτηριστικά που συνοδεύουν τις καταστάσεις εκδήλωσης πόνου, μετά από χορήγηση οπιοειδών για την καταπολέμηση του. Τα σημαντικότερα από αυτά είναι τα φαινόμενα της **υπεραλγησίας** ή ευαισθησίας (υπερβολική απάντηση σε βλαπτικά ερεθίσματα) και της **αλλοδυνίας** (πόνος σε μη βλαπτικά ερεθίσματα, Laulin και συν., 1998, 1999, Larcher και συν., 1998). Στην δημιουργία των φαινομένων αυτών φαίνεται να κατέχουν εξέχοντα ρόλο μόρια όπως οι NMDA υποδοχείς, το ασβέστιο και τα μονοπάτια διαχείρισης του, όπως επίσης και η ελεύθερη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου, η οποία και θα μας απασχολήσει ιδιαίτερα στην εργασία αυτή.

Η πλήρης κατανόηση των διαδικασιών που ελέγχουν την αντίληψη του άλγους τόσο στους κατεστραμμένους ιστούς και το νωτιαίο μυελό, όσο και στα ανώτερα εγκεφαλικά κέντρα, είναι απαραίτητη προκειμένου να προσφέρεται και η αποτελεσματική κάθε φορά θεραπεία. Αν και πιθανά αποτελεί υπεραπλούστευση, τα τρία στάδια αντίληψης του άλγους είναι (Εικόνα 1):

- Η “εκτίμηση” του πόνου στους περιφερικούς ιστούς, αποτέλεσμα της ενεργοποίησης εξειδικευμένων αισθητήριων οργάνων (*αλγοϋποδοχέων*, nociceptors)
- Η διαβίβαση του αλγογόνου μηνύματος από την περιφέρεια προς το οπίσθιο κέρατο του νωτιαίου μυελού, όπου και αναστέλλεται ή ενισχύεται με συνδυασμένη δράση μεταξύ τοπικών (του νωτιαίου μυελού) νευρωνικών κυκλωμάτων και κατερχόμενων από τα ανώτερα εγκεφαλικά κέντρα δεματίων.
- Η αναμετάδοση του αλγογόνου μηνύματος στα ανώτερα εγκεφαλικά κέντρα, από τα οποία και δίδεται η εκκίνηση για την εκτέλεση οποιασδήποτε απαιτούμενης ενέργειας.

Το άλγος αποτελεί φυσιολογική εκδήλωση της καθημερινής ζωής και λειτουργεί ως ένας αμυντικός μηχανισμός. Ωστόσο, όταν το άλγος υπερβαίνει ορισμένα όρια και καταστεί ανεξέλεγκτο, είναι δυνατόν να επηρεάσει δραματικά την ποιότητα ζωής. Το άλγος σχετίζεται συχνά με μία σειρά από άλλες ψυχολογικές και κεντρικής προέλευσης διαταραχές (π.χ άγχος, κατάθλιψη, αϋπνία, ανορεξία) καθώς και με έντονες μεταβολές στη λειτουργία του αυτόνομου συστήματος (π.χ. καρδιακό ρυθμό, πίεση αίματος ούρηση).

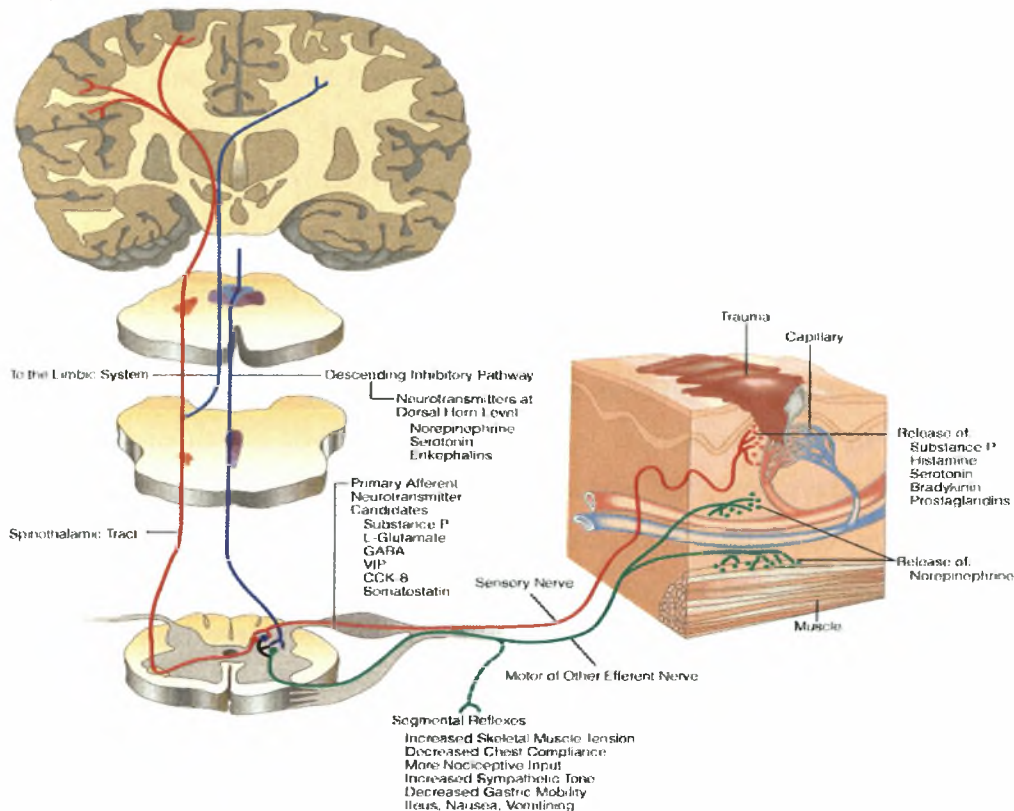
***Πρώτο βήμα για την αντίληψη του πόνου φαίνεται να αποτελεί η ενεργοποίηση ειδικών υποδοχέων, των αλγοϋποδοχέων, στους περιφερικούς ιστούς.***

Σε αντίθεση με άλλους αισθητικούς υποδοχείς, οι οποίοι ανιχνεύουν για παράδειγμα μεταβολές στην μηχανική πίεση ή τη θερμοκρασία, οι αλγοϋποδοχείς δεν έχουν επακριβώς προσδιορισθεί. Βρίσκονται πιθανόν σε απλές ελεύθερες νευρικές απολήξεις εντός του δέρματος, των μυών και εν τω βάθει σπλάχνων. Ο ακριβής τρόπος με τον οποίο ενεργοποιούνται οι αλγοϋποδοχείς, μετά από μια για παράδειγμα ιστική βλάβη, παραμένει άγνωστος, αν και είναι εξακριβωμένο ότι ένας αριθμός από χημικούς μεσολαβητές που απαντούν σε θέσεις πάσχοντος ιστού ή η ίδια αποσύνθεση του ιστού, μπορούν να διεγείρουν αλγοϋποδοχείς και επομένως να προάγουν την αίσθηση του πόνου. Σε αυτή την ομάδα ανήκουν και μεσολαβητές της φλεγμονής, όπως ισταμίνη, και η βραδυκινίνη. Μικρές δόσεις ισταμίνης ή βραδυκινίνης είναι ικανές να πυροδοτήσουν αλγογόνο απόκριση σε δερματικές φλύκταινες. Η βραδυκινίνη δρά μέσω υποδοχέων συνδεδεμένων με G πρωτεΐνη και παράγει μία σειρά από προφλεγμονώδεις ενέργειες συμπεριλαμβανομένων της αγγειοδιαστολής και του οιδήματος. Η διέγερση του υποδοχέα βραδυκινίνης, ενεργοποιεί, την ενζυμική δραστηριότητα της φωσφολιπάσης A<sub>2</sub> στην κυτταρική μεμβράνη, η οποία με την σειρά της επιφέρει από-εστεροποίηση της μεμβράνης, συντελώντας στην απόδοση ελεύθερου αραχιδονικού οξέος και την βιοσύνθεση προσταγλανδινών (π.χ. PGE<sub>2</sub> και προστακυκλίνη PGI<sub>2</sub>) από την κυκλοοξυγενάση (COX). Δεν αποτελεί συνεπώς έκπληξη το γεγονός ότι οι PGs απαντούν σε θέσεις όπου εκδηλώνεται φλεγμονώδεις αντίδραση.

Η σεροτονίνη (5-HT) αποτελεί μία άλλη τοπική ορμόνη, η οποία πυροδοτεί αποκρίσεις άλγους μέσω περιφερικών αλγοϋποδοχέων. Η 5HT απελευθερώνεται με αποκοκκιοποίηση των ιστιοκυττάρων (mast cells) στις θέσεις ιστικής βλάβης και δίδει το έναυσμα για μία ισχυρή αλγογόνο αντίδραση, πιθανώς ισχυρότερη συγκριτικά με την εκλυόμενη από την βραδυκινίνη ή από την ισταμίνη. Διάφορες μεταβολικές ουσίες

(π.χ ATP, γαλακτικό οξύ,  $K^+$ ) που απελευθερώνονται από κατεστραμμένα κύτταρα ιστών, εμφανίζουν επίσης αλγογόνο δράση.

Perception of Pain



Εικόνα 1. Νευροδιαβίβαση του πόνου.

**Το δεύτερο βήμα για την αντίληψη του πόνου συνίσταται στη μετάδοση της πληροφορίας από τους διεγερμένους περιφερικούς αλγοϋποδοχείς προς τον νωτιαίο μυελό.**

Η πληροφορία διαβιβάζεται από διεγερμένους αλγοϋποδοχείς της περιφέρειας και απολήγει στο νωτιαίο μυελό μέσω :

- Εμμέλων  $A_\delta$  νευρικών ινών, οι οποίες άγουν τις ώσεις γρήγορα, με ταχύτητα 15m/s περίπου, και φαίνεται να ευθύνονται για την εκδήλωση της οξείας και έντονης αίσθησης του πόνου.
- Αμμέλων C νευρικών ινών, οι οποίες άγουν τις ώσεις βραδύτερα, με ταχύτητα 1m/s περίπου και φαίνεται να ευθύνονται για την μειωμένη ακρίβεια σχετικά με τη θέση εντόπισης του άλγους που περιγράφεται ως ένας αμβλός και σφύζων πόνος.

Τα κυτταρικά σώματα τόσο των  $A_\delta$  όσο και των C ινών, απαντούν μέσα στα νωτιαία γάγγλια, απ' όπου εκφύονται. Οι νευρικές ίνες εισέρχονται με την οπίσθια

αισθητική ρίζα στο οπίσθιο κέρασ του νωτιαίου μυελού για να συναφθούν τελικά με τους επονομαζόμενους “αλγοανταποκρινόμενους” (nociceptive) νευρώνες, οι οποίοι εντοπίζονται στα επιφανειακά πέταλα I και II και σε μικρότερη έκταση στο πέταλο V (για τις A<sub>δ</sub> ίνες μόνο). Διεγερτικά αμινοξέα όπως είναι το γλουταμικό οξύ και νευροκινίνες όπως η ουσία P και η νευροκινίνη A, δρούν ως νευροδιαβιβαστές στις συνάψεις μεταξύ των κεντρομόλων νευρικών απολήξεων και των νωτιαίων αλγοανταποκρινόμενων νευρώνων.

*Το τρίτο βήμα για την αντίληψη του πόνου αποτελεί η μεταβίβαση του αλγογόνου σήματος στα ανώτερα εγκεφαλικά κέντρα.*

Η πληθώρα διεγερτικών και ανασταλτικών νευρικών σημάτων, τα οποία προσάγονται σε αλγοανταποκρινόμενους (στο οπίσθιο κέρασ του νωτιαίου μυελού) νευρώνες, αποδुकνύει τον σπουδαίο ρόλο των νευρώνων αυτών στην αναμετάδοση πληροφοριών από τους αλγουποδοχείς των ιστών προς τον εγκέφαλο. Οι ανιούσες οδοί του άλγους οι οποίες εμπλέκονται στο τελευταίο αυτό στάδιο της όλης διαδικασίας, πορεύονται μέσω των προσθιοπλάγιων και οπισθιοπλάγιων δεσμών του νωτιαίου μυελού, για να καταλήξουν κυρίως, στο θάλαμο και το δικτυωτό σχηματισμό. Η πορεία κάποιων ανιόντων δεματίων συνεχίζεται περαιτέρω για να τερματισθεί στον εγκεφαλικό φλοιό και το μεταιχμιακό σύστημα, όπου συντονίζονται οι γνωσιακές και συναισθηματικές παράμετροι του άλγους.

## ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΣ

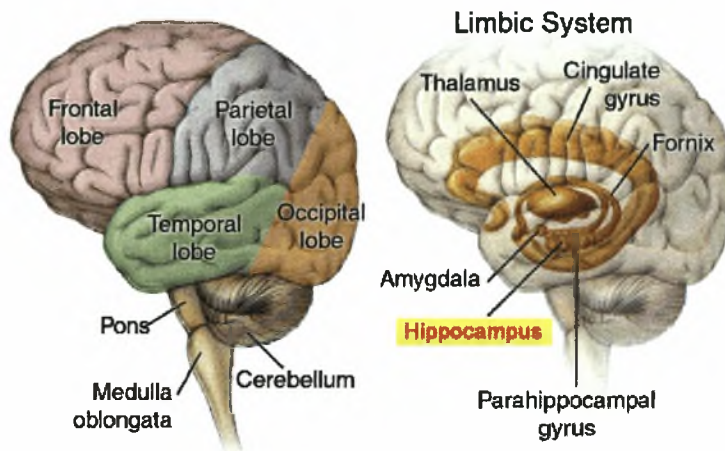
### *Ανατομία - Ιστολογία*

Ο ιππόκαμπος (Εικόνα 2) αποτελεί μέρος του μεταιχμιακού συστήματος (limbic system). Αποτελεί πιθανότατα την πιο μελετημένη δομή του εγκεφάλου και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης. Ο ιππόκαμπος μπορεί να είναι είτε σταθμός για την μακροχρόνια μνήμη είτε σύστημα διευκόλυνσης, το οποίο είναι σημαντικό για την αποθήκευση της μνήμης κάπου αλλού στον εγκέφαλο (Kandel και συν., 1999).

Το μεταιχμιακό σύστημα αναφέρεται και ως «συναισθηματικός εγκέφαλος». Περιλαμβάνει μία σειρά δομών του εγκεφάλου που εμπλέκονται στη δημιουργία του συναισθήματος. Το μεταιχμιακό αυτό επηρεάζει τη δημιουργία της μνήμης και της μάθησης συνδυάζοντας συναισθηματικές καταστάσεις με προϋπάρχουσες ή νεοσχηματιζόμενες μνημονικές παραστάσεις. Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει πολλές διαφορετικές φλοιώδεις και υποφλοιώδεις εγκεφαλικές δομές. Στις δομές αυτές

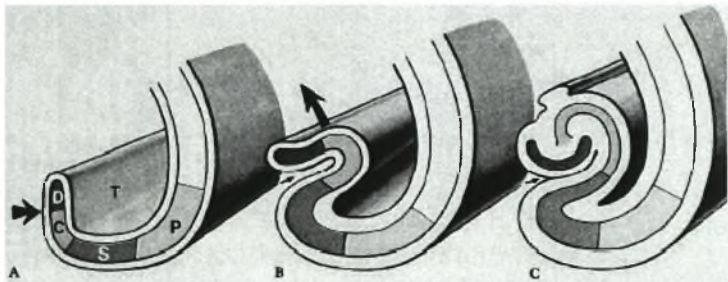


συγκαταλέγονται η αμυγδαλή, η έλικα του προσαγωγίου, ο ιππόκαμπος, ο υποθάλαμος, η ψαλίδα, η παραίπποκάμπεια έλικα, τα μαστία, ο επικληνής πυρήνας του διαφράγματος, και ο ενδορρινικός φλοιός ([http://en.wikipedia.org/wiki/Limbic\\_system](http://en.wikipedia.org/wiki/Limbic_system)).



Εικόνα 2. Ανατομία εγκεφάλου. Διακρίνεται αριστερά η δομή του ιπποκάμπου καθώς και τα άλλα μέρη του μεταιχμιακού συστήματος.

Ο ιπποκάμπος σχηματίζεται από τον ιππόκαμπο ή αμμώνιο κέρασ και την οδοντωτή έλικα. Βρίσκεται στο κάτω τοίχωμα του κροταφικού κέρατος της πλάγιας κοιλίας και προβάλλει εντός της κοιλότητας αυτής. Παράγεται από την προώθηση του τοιχώματος εμβρυϊκού εγκεφάλου από την ιπποκάμπεια σχισμή (Εικόνα 3).

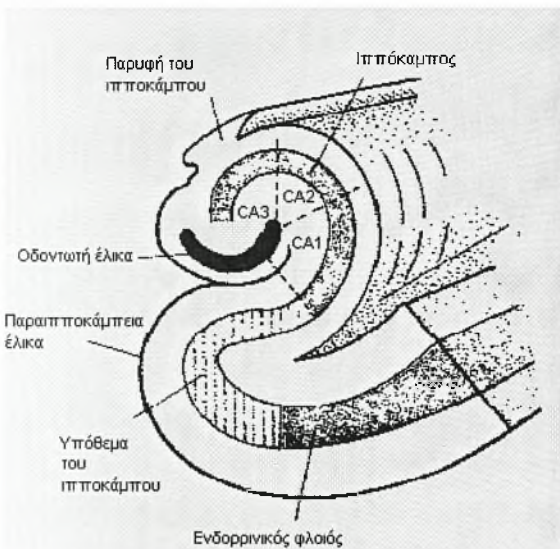


Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας του ιπποκάμπου. D: οδοντωτή έλικα, C: αμμώνιο κέρασ, S: υπόθεμα του ιπποκάμπου, P: παραιπποκάμπεια έλικα, T: κροταφικό κέρασ πλάγιας κοιλίας (Gray's Anatomy, 1989).

Η ελεύθερη υπόκυρτη επιφάνειά του ιπποκάμπου καλύπτεται από λεπτή στιβάδα λευκής ουσίας, τη σκάφη, η δε προσφυτική του επιφάνεια ακουμπά στην ιπποκάμπεια έλικα ή υπόθεμα του ιπποκάμπου (subiculum), (Εικόνες 4 & 5). Το πρόσθιο άκρο του ιπποκάμπου είναι ογκώδες και υποστρόγγυλο, εμφανίζει δε 3-4 υποστρόγγυλα ογκώματα, τα δακτυλιοειδή επάρματα. Το οπίσθιο άκρο του βαθμιαία λεπτύνεται και μεταπίπτει στο φαιό ταινίδιο, ενώ στο έσω χείλος αυτού προσφύεται το σύστοιχο οπίσθιο σκέλος της ψαλίδας (παρυφή του ιπποκάμπου, fimbria). Χωρίζεται σε 4 πεδία,

τα CA1-4, από τα οποία πιο σημαντικά είναι το CA1 και CA3 (Εικόνα 4). Η οδοντωτή έλικα (*gyrus dentatus*) βρίσκεται μεταξύ της παρυφής του ιπποκάμπου και της ιπποκάμπειας έλικας. Εμφανίζει 12-20 εγκάρσιως φερόμενες εντομές μεταξύ των οποίων δημιουργούνται ταπεινά επάρματα (Κανδρεβιώτης, 1997, Σάββας, 1987).

Το αμμώνιο κέρας ξεκινώντας από την πλάγια κοιλία αποτελείται από τις ακόλουθες στιβάδες (Εικόνα 4): 1) επένδυμα, 2) σκάφη ή λευκή ουσία (*alveus*), 3) στιβάδα πολύμορφων κυττάρων (*stratum oriens*), όπου βρίσκονται τα ανασταλτικά πολύμορφα καλαθιοφόρα κύτταρα και οι βασικοί δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων, 4) πυραμιδική στιβάδα (*stratum pyramidalis*), που περιλαμβάνει τα κυτταρικά σώματα των πυραμιδικών νευρώνων, των κυρίως νευρώνων του αμμωνίου κέρατος, 5) ακτινωτή στιβάδα (*stratum radiatum*), 6) βοθριώδη στιβάδα (*stratum lacunosum*), 7) μοριώδη στιβάδα (*stratum moleculare*). Πολλοί θεωρούν τις δύο τελευταίες στιβάδες ως μία. Οι τρεις τελευταίες στιβάδες περικλείουν τμήματα κορυφαίων δενδριτών των πυραμιδικών κυττάρων (Εικόνα 5).



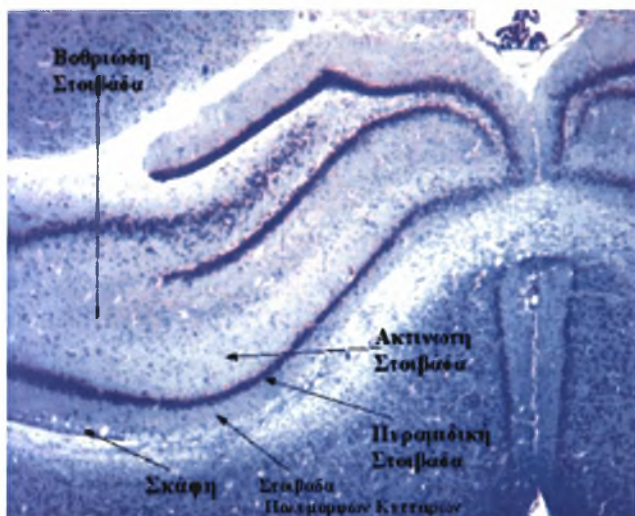
Εικόνα 4. Οι περιοχές του ιπποκάμπου

<http://www.benbest.com/science/anatmind/anatmd3.html#hippo>

Η οδοντωτή έλικα περιλαμβάνει τρεις στιβάδες (Εικόνα 5): μία επιφανειακή μοριώδη στιβάδα (*molecular layer*), όπου εκτείνονται οι δενδρίτες των κοκκωδών κυττάρων, μία ενδιάμεση κοκκώδη (*granular layer*), που περιέχει τα σφαιρικού σώματος κοκκώδη κύτταρα, και μία βαθιά κείμενη στιβάδα πολύμορφων κυττάρων (*polymorphic layer*).

Η πυραμιδική στιβάδα του ιπποκάμπου περιέχει τους πυραμιδικούς νευρώνες, οι οποίοι είναι διεγερτικοί νευρώνες, περιέχουν ως κύριο νευροδιαβιβαστή το γλουταμικό και αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων του ιπποκάμπου. Σε όλες τις στιβάδες του ιπποκάμπου υπάρχουν ανασταλτικοί νευρώνες, οι ενδονευρώνες, που

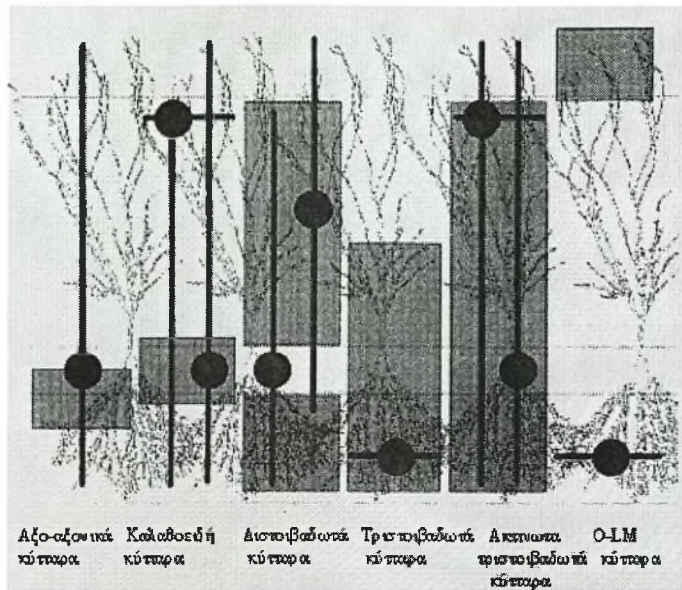
εκλύουν γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA). Αυτοί αποτελούν το 10-20% των νευρώνων του ιπποκάμπου (Svoboda και συν., 1999). Αναστέλλουν τα πυραμιδικά κύτταρα του ιπποκάμπου σχηματίζοντας ανασταλτικές GABAεργικές συνάψεις σε διαφορετικά τμήματα της μετασυναπτικής μεμβράνης. Οι ενδονευρώνες είναι μία ετερογενής ομάδα κυττάρων. Κάποιοι από αυτούς σχηματίζουν ανασταλτικές συνάψεις στα σώματα των πυραμιδικών νευρώνων ή στο αρχικό τμήμα του νευράξονα, ενώ άλλοι συνάπτονται στους δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων (Svoboda και συν., 1999).



Εικόνα 5. Στιβάδες του ιπποκάμπου.

Οι ενδονευρώνες του ιπποκάμπου διακρίνονται σε υποομάδες ανάλογα με την εντόπισή τους και τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά (Εικόνα 6). Στο αμμόνιο κέρασ απαντώνται έξι διαφορετικές υποκατηγορίες ενδονευρώνων, με σημαντικότερα: α) τα *καλαθοειδή κύτταρα*, των οποίων τα κυτταρικά σώματα εντοπίζονται στην στριβάδα των πυραμιδικών κυττάρων, στο σώμα των οποίων σχηματίζουν πολλαπλές συνάψεις, β) τα *αξο-αξονικά κύτταρα*, τα οποία βρίσκονται στα όρια της πυραμιδικής στριβάδας και συνάπτονται στο αρχικό τμήμα του νευράξονα των πυραμιδικών κυττάρων και γ) τα *διστοιβαδωτά*, των οποίων τα σώματα βρίσκονται τόσο μέσα στην στριβάδα πυραμιδικών κυττάρων όσο και έξω από αυτή και νευρώνουν κορυφαίους και βασικούς δενδρίτες των κυττάρων αυτών. Σε ότι αφορά την οδοντωτή έλικα, στην περιοχή αυτή υπάρχουν α) *καλαθοφόρα κύτταρα*, των οποίων τα κυτταρικά σώματα εντοπίζονται στο όριο μεταξύ της κοκκώδους και της στριβάδας των πολύμορφων κυττάρων και σχηματίζουν συνάψεις με τα κοκκώδη κύτταρα και β) *αξο-αξονικά κύτταρα*, τα οποία εντοπίζονται στη στριβάδα των πολύμορφων κυττάρων και συνάπτονται στη ζώνη έκφυσης των αξόνων των κοκκωδών κυττάρων (Freund & Buzsaki, 1996).





Εικόνα 6. Οι ενδονευρώνες του ιπποκάμπου. Οι κύκλοι αντιπροσωπεύουν τα σώματα, οι γραμμές τους δένδριτες και τα τετράγωνα τους νευράξονες των ενδονευρώνων (Freund & Buzsaki, 1996).

Οι ενδονευρώνες που έχουν τα σώματά τους στη στιβάδα πολύμορφων κυττάρων στη CA1 περιοχή του ιπποκάμπου διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με την έκφραση  $\mu$  ή  $\delta$  οπιοειδικών υποδοχέων και το τμήμα του πυραμιδικού κυττάρου όπου συνάπτεται ο άξονάς τους. Έχει διαπιστωθεί ότι οι ενδονευρώνες που εκφράζουν  $\mu$  οπιοειδικούς υποδοχείς συνάπτονται στο σώμα των πυραμιδικών κυττάρων, ενώ αντίθετα οι ενδονευρώνες που εκφράζουν  $\delta$  υποδοχείς συνάπτονται σε απομακρυσμένους δένδριτες των πυραμιδικών νευρώνων (Drake & Milner 1999, Commons και συν., 1998). Η διαπίστωση αυτή έχει σημασία καθώς η αναστολή σε διαφορετικά τμήματα του πυραμιδικού νευρώνα μπορεί να επιφέρει διαφορετικό λειτουργικό αποτέλεσμα. Δηλαδή, η αναστολή στην περισωματική περιοχή μπορεί να αναστείλει την εξαρτώμενη από τα ιόντα νατρίου παραγωγή δυναμικών ενέργειας, με αποτέλεσμα τη μειωμένη πιθανότητα εκφόρτισης των πυραμιδικών νευρώνων. Αντίθετα, αναστολή σε δένδριτες των πυραμιδικών νευρώνων έχει ως συνέπεια τη μείωση του εύρους των εισερχόμενων διεγερτικών μετασυναπτικών δυναμικών (EPSPs) και τη μείωση της πρόκλησης ασβέστιο-εξαρτώμενων δυναμικών ενέργειας, με αποτέλεσμα τη ρύθμιση των εισερχόμενων πληροφοριών από άλλες περιοχές του εγκεφάλου (Svoboda και συν., 1999).

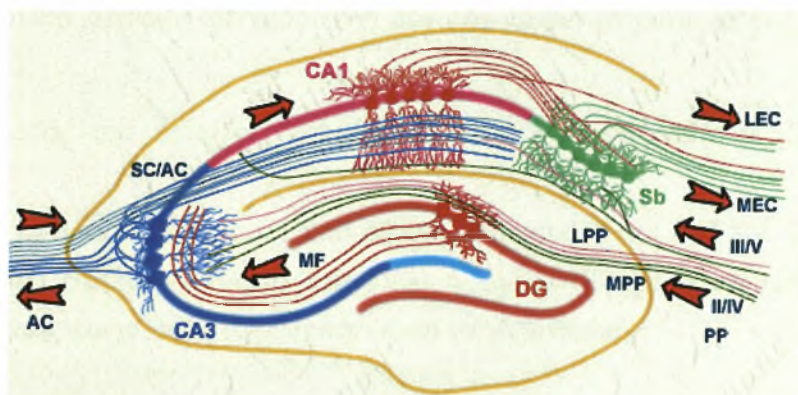
### Διασυνδέσεις του ιπποκάμπου

#### Οδός διατιτραινουσών ινών (Perforant Path)

Η κύρια είσοδος πληροφοριών στον ιπποκάμπο γίνεται με την οδό των διατιτραινουσών ινών (Εικόνα 7). Προέρχεται από τον ενδορρινικό φλοιό, κυρίως από



τις στιβάδες II και III με μικρή συνεισφορά των στιβάδων IV και V. Νευράξονες κυττάρων που τα σώματά τους βρίσκονται στις στιβάδες II και IV προβάλλουν στα κοκκώδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας και στα πυραμιδικά κύτταρα της CA3 περιοχής. Νευράξονες κυττάρων που τα σώματά τους βρίσκονται στις στιβάδες III και V προβάλλουν στα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 περιοχής και στο υπόθεμα του ιπποκάμπου. Οι ίνες της οδού των διατιτρινουσών ινών περιέχουν ως νευροδιαβιβαστή γλουταμικό και μπορεί να διαχωριστούν σε πλάγιες και μέσες σύμφωνα με την προέλευσή τους από πλάγιες και μέσες περιοχές του ενδορρινικού φλοιού.



Εικόνα 7. Διασυνδέσεις του ιπποκάμπου. Συντμήσεις: DG: οδοντωτή έλικα, CA1, CA3: CA1 & 3 πεδία του ιπποκάμπου, Sb: υπόθεμα, EC: ενδορρινικός φλοιός, LEC & MEC: πλάγιος (L) και μέσος (M) ενδορρινικός φλοιός, SC/AC: Παράπλευρη οδός του Schaffer, PP: οδός διατιτρινουσών ινών, LPP, MPP: πλάγια (L) και μέση (M) οδός διατιτρινουσών ινών MF: Βρυώδεις ίνες (<http://www.bris.ac.uk/Depts/Synaptic/info/pathway/himprocampal.htm>).

#### Ψαλίδα

Εκτός από την οδό διατιτρινουσών ινών, πηγή εισόδου πληροφοριών στον ιππόκαμπο αποτελεί και η ψαλίδα. Η ψαλίδα είναι μία συμπαγής δεσμίδα που συνδέει τον ιππόκαμπο με τον υποθάλαμο και άλλα μορφώματα. Οι ίνες της σχηματίζουν αρχικά τη σκάφη του ιπποκάμπου, δηλαδή τη λεπτή λευκή στιβάδα της κοιλιακής επιφάνειας του αμυγνίου κέρατος και στη συνέχεια συγκλίνουν κατά μήκος της έσω επιφάνειας του ιπποκάμπου για να σχηματίσουν την παρυφή του ιπποκάμπου (εικόνα 5). Στην πορεία τους προς τα πίσω και άνω οι ίνες της παρυφής του ιπποκάμπου ενώνονται με το οπίσθιο σκέλος της ψαλίδας (Kandel και συν., 1999).

Τα δεμάτια των νευρικών ινών της ψαλίδας αποτελούν προβολές μιας σειράς εγκεφαλικών περιοχών τόσο προς, όσο και από, τον ιππόκαμπο. Η ψαλίδα αποτελεί την κύρια υποφλοιώδη είσοδο πληροφοριών του ιπποκάμπου και περιλαμβάνει νευρικές ίνες του διαφραγματο-ιπποκάμπειου μονοπατιού, το οποίο ξεκινά από τους χολινεργικούς νευρώνες του μέσου διαφράγματος, νοραδρενεργικές ίνες προορχόμενες από τον υπομέλανα τόπο και σεροτονεργικές ίνες από τους πυρήνες της

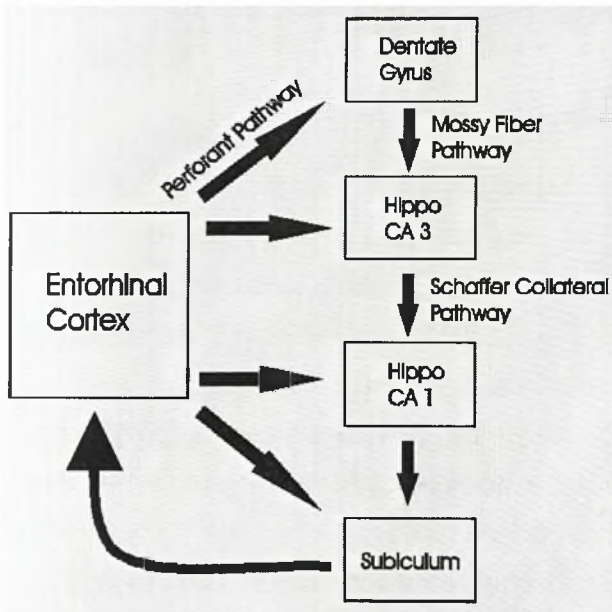
ραφής. Επίσης, η ψαλίδα περιέχει και ίνες οι οποίες συνδέουν την ιπποκάμπεια έλικα με τον επικληνή πυρήνα του διαφράγματος. Βλάβη της ψαλίδας οδηγεί σε εξασθένηση των διαδικασιών της μάθησης και της μνήμης, η οποία προσομοιάζει με αυτή που προκύπτει μετά από βλάβη του ίδιου του ιπποκάμπου (Kandel και συν., 1999).

#### Οδός Βρυωδών ινών (Mossy Fibre Pathway)

Οι νευράξονες των κοκκωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας περιέχουν ως κύριο νευροδιαβιβαστή το γλουταμικό και σχηματίζουν τις βρυώδεις ίνες (mossy fibres). Οι ίνες αυτές εκτείνονται από την οδοντωτή έλικα προς τα πυραμιδικά κύτταρα της CA3 περιοχής αποτελώντας την κύρια είσοδο πληροφοριών σ' αυτά. Δια μέσου των ινών αυτών πολλά κοκκώδη κύτταρα είναι δυνατόν να συνάπτονται σε ένα πυραμιδικό κύτταρο.

#### Παράπλευρη οδός του Schaffer (Schaffer Collateral / Associational Commissural Pathway)

Αυτό το μονοπάτι αποτελείται από άξονες που εκτείνονται από την CA3 περιοχή του ιπποκάμπου στη CA1 περιοχή του ίδιου ή του αντίθετου ημισφαιρίου. Κύριος νευροδιαβιβαστής και σ' αυτό το μονοπάτι είναι το γλουταμικό.



Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση των διασυνδέσεων του ιπποκάμπου.  
(<http://www.angelfire.com/yt/yas709neuroscience/hippocampus.htm>)

CA1 περιοχή - Υπόθεμα του ιπποκάμπου - ενδορρινικός φλοιός (CA1 - Subiculum - EC)

Η οδός από τη CA1 περιοχή του ιπποκάμπου στο υπόθεμα του ιπποκάμπου και από εκεί στον ενδορρινικό φλοιό αποτελεί την κύρια έξοδο πληροφοριών από τον ιππόκαμπο.

Ένα τμήμα των απαγωγών ινών του ιπποκάμπου ξεκινά από το υπόθεμα αυτού και οδεύει, όπως ήδη αναφέρθηκε, προς την ψαλίδα. Αυτές, σε σχέση με τον πρόσθιο σύνδεσμο, διακρίνονται σε ίνες της προσυνδεσμικής και σε ίνες της μετασυνδεσμικής ψαλίδας. Οι πρώτες καταλήγουν στο διάφραγμα, τον έσω μετωπιαίο φλοιό, την ευθεία έλικα (*gyrus rectus*), και τον πρόσθιο οσφρητικό πυρήνα, ενώ οι δεύτερες στον θάλαμο, υποθάλαμο και τα μαστία. Τέλος, κάποιες ίνες του αμμωνίου κέρατος προβάλλουν απευθείας στον έξω πυρήνα του διαφράγματος (Nieuwenhuys και συν., 1983, Kahle, 1985).

Συνοπτικά, μία αδρή περιγραφή του μονοπατιού που ακολουθεί η πληροφορία μέσα στον ιππόκαμπο είναι: από τον ενδορρινικό φλοιό στην οδοντωτή έλικα, από την οδοντωτή έλικα στην CA3 περιοχή, από τη CA3 περιοχή στη CA1, και από εκεί μέσω του υποθέματος του ιπποκάμπου πίσω στον ενδορρινικό φλοιό. Επιπρόσθετα, είσοδος πληροφοριών μπορεί να γίνει απευθείας σε κάθε περιοχή, ενώ έξοδος πληροφοριών γίνεται από την CA1 περιοχή και το υπόθεμα (Εικόνα 9, <http://en.wikipedia.org/wiki/Hippocampus>).

### ***Ρόλος του ιπποκάμπου***

Ο ιππόκαμπος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης. Μπορεί να είναι είτε σταθμός για την μακροχρόνια μνήμη είτε σύστημα διευκόλυνσης, το οποίο είναι σημαντικό για την αποθήκευση της μνήμης κάπου αλλού στον εγκέφαλο (Kandel και συν., 1999).

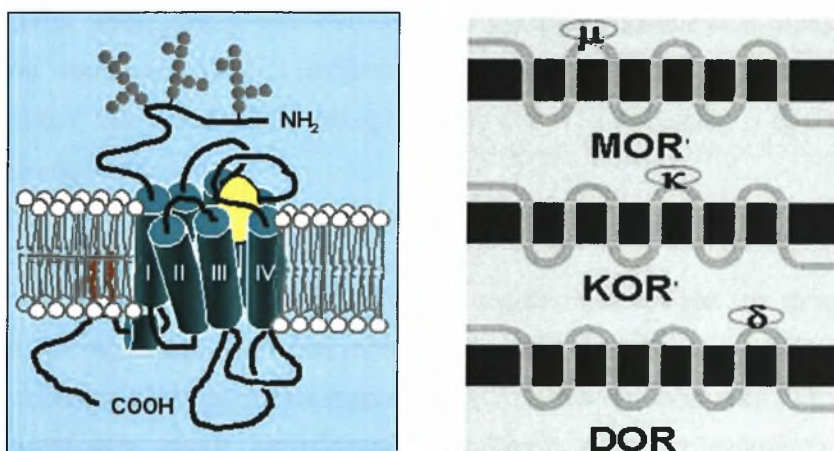
Επιπλέον, έχει προταθεί ότι ο ιππόκαμπος συμμετέχει στην ανάπτυξη μνήμης σχετιζόμενης με τον πόνο και στη δημιουργία μάθησης αποφυγής (*avoidance learning*). Υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν ότι η αντίληψη του πόνου σχετίζεται άμεσα με τον ιππόκαμπο. Οι Wei και συν. (2000) υποστηρίζουν ότι οι διεγερτικές γλουταμινεργικές συνάψεις στη CA1 περιοχή του ιπποκάμπου παίζουν ουσιαστικό ρόλο στην αποθήκευση πληροφοριών που σχετίζονται με τον πόνο. Περιφερικός επώδυνος ερεθισμός αύξησε τα διεγερτικά μετασυναπτικά δυναμικά (EPSPs) των πυραμιδικών νευρώνων της CA1 περιοχής. Ακόμη, περιφερική ιστική ή νευρική βλάβη επέφερε αύξηση των επιπέδων του γονιδιακού προϊόντος *Egr1* (ή *NGFI-A*, *Krox24* ή *zif/268*) στους νευρώνες της CA1 περιοχής. Σύμφωνα με τους Ceccarelli και συν. (1999), εφαρμογή συνεχούς επώδυνου ερεθίσματος (υποδόρια χορήγηση φορμαλίνης) προκάλεσε αλλαγή στην έκφραση του γονιδίου *c-Fos* σε υποπεριοχές του ιπποκάμπου. Επιπλέον, η χορήγηση

του τοπικού αναισθητικού λιδοκαΐνη στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου αρουραίων, εφόσον γίνεται στην ίδια πλευρά με την υποδότη ένεση φορμαλίνης, επέφερε μείωση της αίσθησης του πόνου (McKenna & Melzack, 1992).

## ΟΠΙΟΕΙΔΗ

### Οπιοειδείς υποδοχείς

Η επεξεργασία του οπιοειδούς *papaver somiferum* χρησιμοποιήθηκε για αρκετές εκατοντάδες χρόνια για την ανακούφιση του πόνου. Το 1803 ο Sertuner απομόνωσε ένα κρυσταλλικό δείγμα του κύριου εκπροσώπου των αλκαλοειδών, την μορφίνη, το οποίο αργότερα αποδείχθηκε πως ήταν αποκλειστικά υπεύθυνο για την αναλγητική δράση του ακατέργαστου οπίου.



Εικόνα 10. Οπιοειδικοί υποδοχείς  
([http://www.ipbs.fr/anglais/teams/meunier/noc\\_rcp.jpg](http://www.ipbs.fr/anglais/teams/meunier/noc_rcp.jpg))

Η δομή και τα στερεοχημικά χαρακτηριστικά -αναγκαία για την αναλγητική δράση- της μορφίνης και των υπολοίπων οπιοειδών, οδήγησαν στην θεωρία σύμφωνα με την οποία οι ουσίες αυτές δρουν μέσω αλληλεπίδρασης τους με ειδικούς υποδοχείς (Εικόνα 10). Η σκέψη ότι υπάρχουν περισσότερα από ένα είδος υποδοχέων γεννήθηκε για να εξηγήσει την διπλή δράση του συνθετικού οπιοειδούς ναλορφίνη, η οποία ανταγωνίζεται το αναλγητικό αποτέλεσμα της μορφίνης στον άνθρωπο αλλά επίσης δρά και σαν αναλγητικό. Ο Martin (1967) συμπέρανε ότι το αναλγητικό αποτέλεσμα της ναλορφίνης ρυθμίζεται από ένα υποδοχέα -αργότερα ονομάστηκε κ-οπιοειδικός υποδοχέας- ο οποίος είναι διαφορετικός από τον υποδοχέα της μορφίνης. Στοιχεία για την ύπαρξη περισσότερων υποδοχέων, μ, κ και σ, προέκυψαν από την απόδειξη διαφορετικών προφίλ φαρμακολογικής δραστηριότητας που παρουσίασαν οπιοειδή όπως η μορφίνη, η κεταζοκίνη και οπιοειδές ανάλογο SKF 10047 (Besse και συν., 1990). Η ύπαρξη του δ-υποδοχέα προτάθηκε για να εξηγήσει το προφίλ της *in vitro*



ενεργότητας των εγκεφαλίνων (ενδογενή οπιοειδικά πεπτίδια) και την ικανότητα του μ-οπιοειδικού ανταγωνιστή ναλοξόνη να αναστρέφει την νευρικής προέλευσης αναστολή της συσταλτικότητας από ενδογενή οπιοειδή πεπτίδια στον σπειραματικό πόρο μυός. Η ύπαρξή της επιβεβαιώθηκε αργότερα με μελέτες δέσμησης ραδιοαναλόγων σε ομογενοποιημένα εγκεφάλου αρουραίων.

Είναι πλέον γνωστό, μετά από ένα μεγάλο αριθμό μελετών που διεξήχθησαν τα 20 τελευταία χρόνια, πως υπάρχουν τρεις πολύ καλά ορισμένοι οπιοειδείς υποδοχείς, οι  $\mu$ ,  $\kappa$  και  $\delta$ . Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τους τρεις παραπάνω υποδοχείς έχουν κλωνοποιηθεί. Όλοι οι κλωνοποιημένοι υποδοχείς έχουν μια συγκεκριμένη δομή με μία εξωκυττάρια αμινοτελική περιοχή, επτά διαμεμβρανικές περιοχές και ένα ενδοκυττάριο καρβοξυτελικό άκρο. Οι παραπάνω υποδοχείς με μελέτες δέσμησης εκλεκτικών ραδιοαναλόγων διακρίνονται περαιτέρω στους υπότυπους:  $\mu_1$  και  $\mu_2$ ,  $\delta_1$  και  $\delta_2$  και  $\kappa_{1-4}$  οι υπότυποι αυτοί προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα του mRNA ή διμερισμό των πρωτεϊνών του υποδοχέα. Τέλος, υπάρχουν φαρμακολογικά στοιχεία για διάφορους άλλους υπότυπους των υποδοχέων όπως οι  $\epsilon$ ,  $\lambda$ ,  $\iota$ ,  $\zeta$ . Ο υποδοχέας  $\sigma$  δεν θεωρείται πλέον οπιοειδικός υποδοχέας.

### **Οπιοειδικά φάρμακα**

Τα οπιοειδικά φάρμακα χρησιμοποιούνται ως αναλγητικά για την αντιμετώπιση του οξέος και χρόνιου πόνου και αποτελούν μέρος της περιεχειρητικής αγωγής. Οι οπιοειδικοί υποδοχείς είναι οι στόχοι όπου δρουν τα οπιοειδή φάρμακα. Τα ενδογενή μόρια που συνδέονται στους οπιοειδικούς υποδοχείς είναι τα ενδογενή οπιοειδή πεπτίδια. Αυτά προέρχονται από τα πρόδρομα μόρια της προοπιομελανοκορτινης ( $\beta$ -ενδορφίνες), της προεγκεφαλίνης (εγκεφαλίνες) και της προδυνορφίνης (δυνορφίνες και νεοενδορφίνες, Cesselin, 2002). Τα φάρμακα αυτά αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς των οπιοειδών είτε σαν αγωνιστές ( δράση πλήρους αγωνιστή επί ενός τύπου υποδοχέα και μερικού ανταγωνιστή επί κάποιου άλλου), είτε ως ανταγωνιστές. Στα οπιοειδή συμπεριλαμβάνονται η μορφίνη, η φωσφορική κωδεΐνη, η υδροχλωρική μεπεριδίνη, το συμπυκνωμένο όπιο (paravetatum), η υδροχλωρική ηρωίνη, η ετορφίνη, η υδροχλωρική μεθαδόνη και η φεντανύλη.

Εκτός από την αναλγητική δράση τους, τα οπιοειδή χαρακτηρίζονται και από άλλες δράσεις στο ΚΝΣ, οι οποίες όμως δεν είναι όλες ευεργετικές (Nicoll και συν., 1980, Madison & Nicoll, 1998). Για παράδειγμα, τα οπιοειδή προκαλούν ευφορία συνοδευόμενη από ένα γενικό αίσθημα γαλήνης και ικανοποίησης, το οποίο και εξηγεί την παράνομη χρήση τέτοιων φαρμάκων από τα εξαρτημένα άτομα. Η συντελούμενη αυτή ψυχική ηρεμία, συνεισφέρει αναμφίβολα στην αναλγητική τους

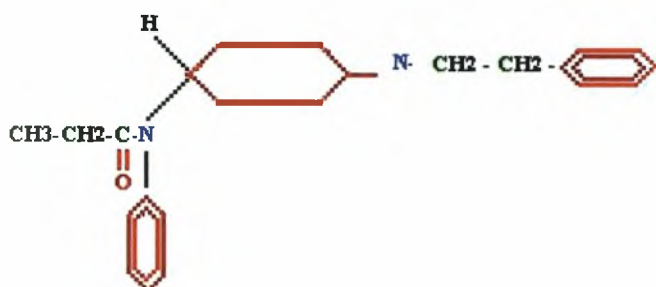
αποτελεσματικότητα, καθώς υποβοηθά στην απάλειψη του άγχους και της αγωνίας που σχετίζονται με το άλγος. Η επαγωγή από την μορφίνη ευφορική κατάσταση, φαίνεται να επέρχεται με τη μεσολάβηση της στην ενεργοποίηση  $\mu$  ή/ και  $\kappa$  υποδοχέων, οι οποίοι εντοπίζονται κυρίως στο μεταϊχμιακό σύστημα (Halasy και συν., 2000). Τα οπιοειδή χορηγούνται συστηματικά (per os, ενδομυικά, ή και υποδόρια) ή απ' ευθείας εντός του νωτιαίου μυελού (ενδοραχιαία). Συνήθως δίδεται μία δόση εφόδου, ακολουθούμενη από δόσεις συντήρησης, για την εξασφάλιση σταθερών συγκεντρώσεων στο πλάσμα.

### Φεντανύλη

Από τα οπιοειδή που συναντήσαμε παραπάνω θα ασχοληθούμε στην παρούσα μελέτη με το οπιοειδές φεντανύλη (Εικόνα 11). Η φεντανύλη είναι ένα συνθετικό οπιοειδές αναλγητικό -αγωνιστής των  $\mu$  οπιοειδικών υποδοχέων- 80 φορές ισχυρότερο από τη μορφίνη. Η ουσία αυτή είναι πολύ δραστική και χαρακτηριστική ένδειξη της ισχυρής δράσης της αποτελεί το γεγονός πως η Ρωσία δήλωσε ότι το αέριο που χρησιμοποιήθηκε στο θέατρο της Μόσχας το 2001, για την άρση της πολιορκίας των Τσετσένων ανταρτών, ήταν παράγωγο της φεντανύλης.

Η φεντανύλη ενδείκνυται για:

- Χρήση σαν ναρκωτικό αναλγητικό συμπλήρωμα σε γενική ή τοπική αναισθησία.
- Χορήγηση με ένα νευροληπτικό, όπως η δροπεριδόλη, σαν προαναισθητικός παράγοντας, για την εισαγωγή στην αναισθησία, και σαν συμπλήρωμα στη διατήρηση της γενικής και τοπικής αναισθησίας.
- Χρήση σαν αναισθητικός παράγοντας με οξυγόνο σε επιλεγμένους ασθενείς υψηλού κινδύνου που θα υποστούν μεγάλη χειρουργική επέμβαση.

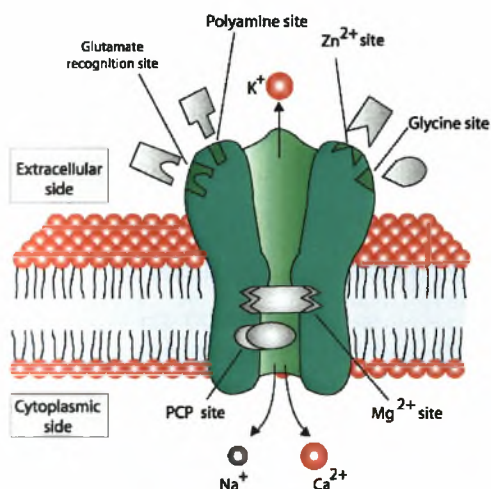


Εικόνα 11. Δομή Φεντανύλης  
<http://www.geocities.com/HotSprings/3515/fentanyl.jpg>

Η φεντανύλη στον άνθρωπο μεταβολίζεται κυρίως μέσω του ενζυμικού συστήματος CYP450 3A4. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε καμιά *in-vivo* αναστολή από την ιτρακοναζόλη, (γνωστή ουσία-αναστολέας του ενζυμικού συστήματος CYP450 3A4), πολύ πιθανόν λόγω του υψηλού ρυθμού ηπατικής κάθαρσης της φαιντανύλης. Η φεντανύλη δεν δρα αποκλειστικά στους  $\mu$  υποδοχείς, αλλά και στους  $\delta$  και  $\kappa$

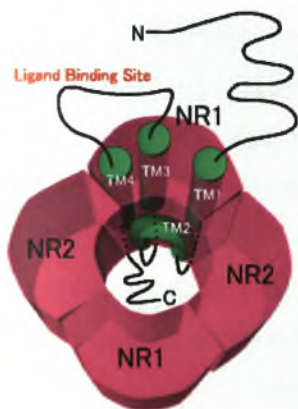
υποδοχείς, αν και η δέσμευση της στους  $\mu$  είναι 100 φορές πιο ισχυρή από ότι στους  $\delta$  και  $\kappa$  υποδοχείς ([http://www.deadiversion.usdoj.gov/drugs\\_concern/fentanyl.htm](http://www.deadiversion.usdoj.gov/drugs_concern/fentanyl.htm), Yoburn και συν., 1995, <http://en.wikipedia.org/wiki/Fentanyl>).

## NMDA ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ



Εικόνα 12. Δομή NMDA υποδοχέα <http://www.anaesthesiauk.com/article.aspx?articleid=100515>

Οι υποδοχείς NMDA (Εικόνα 12) ανήκουν στους ιοντοτρόπους υποδοχείς, δηλαδή στους υποδοχείς που αποτελούν διαύλους ιόντων. Οι ιοντοτρόποι υποδοχείς με τη σύνδεση του νευροδιαβιβαστή, που έχει απελευθερωθεί από το προσυναπτικό κύτταρο, επιτρέπουν τη μεταφορά φορτισμένων ιόντων διαμέσου διαύλου που σχηματίζεται από το σύμπλεγμα του υποδοχέα. Η ροή αυτή των ιόντων προκαλεί την εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης και τη δημιουργία δυναμικού ενέργειας που μεταδίδεται στο μετασυναπτικό κύτταρο (<http://www.bris.ac.uk/Depts/Synaptic/info/glutamate.html>).



Εικόνα 13. Υπομονάδες NMDA υποδοχέα

Οι NMDA υποδοχείς είναι πολυμερή συμπλέγματα τεσσάρων πρωτεϊνικών υπομονάδων, δύο NR1 και δύο NR2 υπομονάδων (Εικόνα 13, Petralia και συν., 1994, Krzysztof W. & Czyrak, 1997). Οι NR1 υπομονάδες προέρχονται από ένα και μόνο γονίδιο και υφίστανται σε οκτώ τουλάχιστον ισομορφές, οι οποίες είναι προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου αυτού. Οι NR2 υπομονάδες προέρχονται από 4 διαφορετικά γονίδια (NR2A-2D). Η έκφραση και των τεσσάρων υπομονάδων είναι απαραίτητη για τη δημιουργία λειτουργικών διαύλων. (<http://www.bris.ac.uk/Depts/Synaptic/info/glutamate.html>). Οι NR2 υπομονάδες είναι ρυθμιστικές, καθώς συνδυαζόμενες με τις NR1 σχηματίζουν διαύλους με διαφορετικές φυσιολογικές και φαρμακολογικές ιδιότητες. Η συμμετοχή της NR1 υπομονάδας θεωρείται απαραίτητη για τη συγκρότηση λειτουργικών διαύλων. (Ozawa και συν., 1998). Πρόσφατα ανακαλύφθηκε και μια τρίτη υπομονάδα, η NR3 (NR3A-NR3B), η οποία συνδυαζόμενη με την NR1 σχηματίζει υποδοχείς -διαύλους ελαττωμένης διαπερατότητας στο  $Ca^{++}$  (Chatterton και συν., 2002).

#### **Λειτουργία των NMDA υποδοχέων**

Για την ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων απαραίτητη είναι εκτός από τη σύνδεση του γλουταμικού και η σύνδεση της γλυκίνης (Εικόνα 12). Η γλυκίνη δρα ως συναγωνιστής του γλουταμικού και η θέση σύνδεσής της βρίσκεται στην NR1 υπομονάδα. Η θέση όπου προσδέεται το γλουταμικό βρίσκεται στο σημείο όπου ενώνονται η NR1 και η NR2 υπομονάδες (Εικόνα 13). Επιπλέον έχει διαπιστωθεί ότι οι NR2B υπομονάδες αποτελούν θέσεις πρόσδεσης πολυαμινών, οι οποίες είναι ρυθμιστικά μόρια που τροποποιούν τη λειτουργία του NMDA υποδοχέα. (<http://www.bris.ac.uk/Depts/Synaptic/info/glutamate.html>)

Οι NMDA υποδοχείς διαμεσολαβούν μία αργή συνιστώσα της συναπτικής διαβίβασης, η οποία εμπλέκεται στην διαδικασία της συναπτικής πλαστικότητας (Kandel και συν., 1999, Trujillo, 2000). Χαρακτηριστικό των υποδοχέων αυτών είναι ότι ελέγχονται από νευροδιαβιβαστές αλλά είναι ταυτόχρονα και τασεοεξαρτώμενοι. Συγκεκριμένα, στο δυναμικό ηρεμίας οι υποδοχείς NMDA είναι αδρανείς. Αυτό οφείλεται στο ότι ο διάυλος των NMDA υποδοχέων φράσσεται από ένα ιόν  $Mg^{++}$ , η παρουσία του οποίου στο κέντρο του διαύλου είναι τασεοεξαρτώμενη. Το  $Mg^{++}$  απομακρύνεται μετά από εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης με ηλεκτροστατική ώθηση. Η αρχική εκπόλωση της μεμβράνης του κυττάρου προκαλείται από τους AMPA υποδοχείς του γλουταμικού (<http://www.bris.ac.uk/Depts/Synaptic/info/glutamate.html>).



Η διέγερση των NMDA υποδοχέων προκαλεί αυξημένη εισροή ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο. Η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάρου ασβεστίου μετασυναπτικά προκαλεί την μετατόπιση της PKC από το κυτταρόπλασμα στην κυτταρική μεμβράνη, τη σύνδεσή της με αυτή και την ενεργοποίησή της. Η ενεργοποιημένη PKC καταλύει τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα οδηγώντας σε άρση του αποκλεισμού του διαύλου των NMDA υποδοχέων από το  $Mg^{++}$ , με αποτέλεσμα την περαιτέρω ενεργοποίησή του (Chen και συν., 1992). Η ενεργοποίηση περισσότερων NMDA υποδοχέων οδηγεί σε νέα είσοδο ασβεστίου (Greves και συν., 1998, Celerier και συν., 2004). Είσοδος ασβεστίου γίνεται και διαμέσου τασεοελεγχόμενων διαύλων ασβεστίου που ενεργοποιούνται λόγω της προκαλούμενης εκπόλωσης της μετασυναπτικής μεμβράνης. Συγχρόνως, η ενεργοποίηση μεταβοτρόπων υποδοχέων του γλουταμικού (mGluR) προκαλεί, διαμέσου G-πρωτεϊνών, την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC) με επακόλουθο την υδρόλυση φωσφολιπιδίων ινοσιτόλης της μεμβράνης σε 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη ( $IP_3$ ) και διακυλογλυκερόλη (DAG). Η  $IP_3$  κινητοποιεί επιπλέον ασβέστιο από ενδοκυττάρια αποθήκες, ενώ η DAG συμμετέχει στην ενεργοποίηση της PKC (Mao και συν., 1995, 1995B, Mayer και συν., 1996).

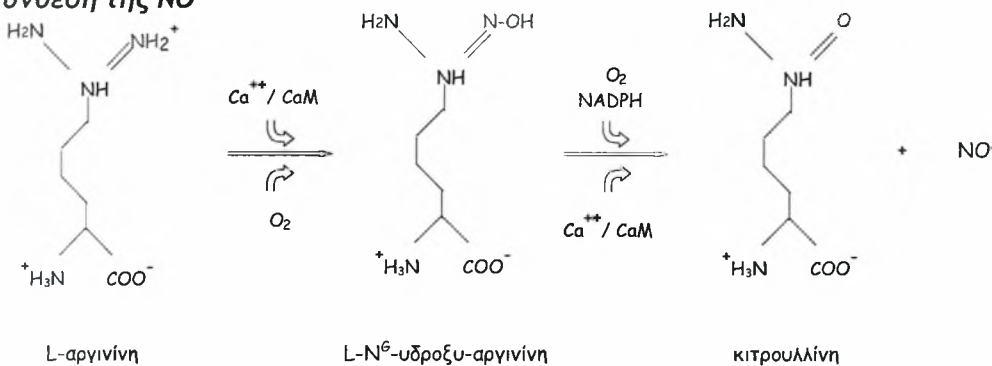
Η αύξηση ενδοκυττάρου ασβεστίου προκαλεί επίσης την ενεργοποίηση της συνθετάσης της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (NOS), η οποία εξαρτάται από  $Ca^{++}$ -καλμοδουλίνη. Το ένζυμο αυτό ρυθμίζει τη σύνθεση μίας μικρομοριακής ένωσης, της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου ( $NO^{\cdot}$ ), η οποία διαχέεται ελεύθερα διαμέσου της μεμβράνης του κυττάρου και μπορεί να δρα και στον προσυναπτικό νευρώνα.

### **ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΡΙΖΑ ΤΟΥ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ( $NO^{\cdot}$ )**

Περισσότερο γνωστή σαν ένας περιβαλλοντικός κίνδυνος, η ελεύθερη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου ( $NO^{\cdot}$ ) παράγεται από την καύση μηχανών και συμβάλει στην δημιουργία αιθαλομίχλης και όξινης βροχής καθώς επίσης ενοχοποιείται και για την καταλυτική καταστροφή της στοιβάδας του όζοντος (Lancaster και συν., 1992). Πέρα όμως από το περιβάλλον, η  $NO^{\cdot}$  φαίνεται να έχει διάφορους άλλους ρόλους στους ζωικούς οργανισμούς δρώντας θετικά ή αρνητικά ανάλογα με τις περιστάσεις. Η δράση της συνδέεται με το ανοσολογικό σύστημα, τον έλεγχο της πίεσης του αίματος και την υπέρταση, την αδυναμία ανύψωσης του πέους, το σηπτικό σοκ, με τον ινσουλινο-εξαρτώμενο διαβήτη και την χρήση του από τα μακροφάγα για την εξόντωση καρκινικών κυττάρων. Παρόλα αυτά, η εμπλοκή της στο νευρικό σύστημα αποτελεί ίσως την πιο εντυπωσιακή ανακάλυψη για το μόριο αυτό. (Koshland, 1992).

Εξ' αιτίας της δομής της, η ελεύθερη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου είναι μόριο υψηλά δραστικό και με πολύ μικρό χρόνο ημιζωής στο σώμα (6-15 sec), γεγονός που καθιστά τον εντοπισμό της αρκετά δύσκολο (Lancaster και συν., 1992). Η NO<sup>•</sup> διαχέεται εύκολα μέσω της κυτταρικής μεμβράνης από την θέση βιοσύνθεσής του και αποτελεί για τον λόγο αυτό ιδανικό μεσοκυττάριο παρακρινή αγγελιοφόρο ή δηλητήριο (Lancaster και συν., 1992). Στο σώμα η NO<sup>•</sup> αντιδρά με αναγωγικά μέταλλα όπως χαλκός, μαγνήσιο, τον σίδηρο της αίμης διαφόρων πρωτεϊνών, και το μοριακό οξυγόνο σχηματίζοντας νιτρώδη και νιτρικά άλατα.

### Σύνθεση της NO<sup>•</sup>



Εικόνα 14. Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης της NO<sup>•</sup>

Το ένζυμο που συνθέτει τη NO<sup>•</sup>, η συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS), έχει κλωνοποιηθεί. Η NO<sup>•</sup> μοιάζει δομικά με την ρεδοκτάση του κυτοχρώματος P-450 μια και περιέχει πολλές κοινές αλληλουχίες με αυτή και φέρει τις ίδιες θέσεις σύνδεσης για συν-ενεργοποιητές όπως τα : FMN, FAD, NADPH. Επιπρόσθετα η NOS παρέχει θέσεις πρόσδεσης για την καλμοδουλίνη και μία θέση φωσφορυλίωσης για την ρύθμισή της (Bredt, 1991, Snyder & Bredt, 1991). Η NO<sup>•</sup> συντίθεται από την NOS από την L-αργινίνη και το μοριακό οξυγόνο με επακόλουθη απελευθέρωση κιτρουλλίνης (Εικόνα 14). NADPH και τετραυδροβιοπερίνη απαιτούνται σαν συνπαράγοντες (Lancaster και συν., 1992).

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των υποτύπων της NOS.

	Γονίδιο	Αριθμός Εξονίων	Αριθμός Βάσεων	Υποκυτταρικός εντοπισμός	Ρύθμιση
nNOS	NOS1	29	1429-1433	κυρίως διαλυτή (εγκεφ); κυρίως ξεχωριστή (σκελετικοί μύες)	Ca <sup>2+</sup> /CaM
iNOS	NOS2	27	1144-1153	κυρίως διαλυτή	Κυτοκίνες, ανεξάρτητη Ca <sup>2+</sup>
eNOS	NOS3	26	1203-1205	κυρίως ξεχωριστή	Ca <sup>2+</sup> /CaM

Υπάρχουν τρεις ισομορφές της συνθετάσης της NO<sup>•</sup> (Πίνακας 1). Η νευρωνική (nNOS) και η ενδοθηλιακή (eNOS) εκφράζονται συστατικά και εξαρτώνται από το

ασβέστιο, ενώ η τρίτη ισομορφή δεν εξαρτάται από το ασβέστιο και εκφράζεται μόνο παρουσία κυτοκινών σε κύτταρα όπως τα μακροφάγα (iNOS) (Knowles & Moncada, 1994).

Η νευρωνική ισομορφή της NOS είναι μια διμερής κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, η οποία φέρει ένα πορφυρινικό δακτύλιο αναγκαίο για την καταλυτική της δράση. Το άμινο τελικό άκρο του ενζύμου είναι υπεύθυνο για την πρόσδεση του υποστρώματος (L-αργινίνη) και την καταλυτική παραγωγή NO<sup>·</sup>, ενώ το καρβόξυ τελικό του άκρο, περιέχει τις περιοχές πρόσδεσης με το NADPH, FAD και FMN (Bredt & Snyder, 1990, Stuehr & Ikeda-Saito, 1992, Bredt και συν., 1991). Η NOS ενεργοποιείται από Ca<sup>++</sup>/καλμοδουλίνη (CaM) και απενεργοποιείται από την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) και πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από cAMP, cGMP και Ca<sup>++</sup>/καλμοδουλίνη η δράση των οποίων κατευθύνεται στις θέσεις φωσφορυλίωσης που υπάρχουν πάνω στο μόριο της NOS (Bredt και συν., 1991, Jaffrey & Snyder, 1995).

### **Ρόλος της NO<sup>·</sup>**

Για να κατανοήσουμε καλύτερα τους νευροβιολογικούς ρόλους της NO<sup>·</sup> πρέπει να εξετάσουμε κάποια βιοχημικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά της. Η δομή της καθώς και ο μικρός χρόνος ημιζωής αλλά και η γρήγορη ικανότητα διάχυσης της, την καθιστούν έναν ιδανικό νευροδιαβιβαστή, μολονότι ασυνήθιστο. Στα περιφερικά αγγεία του αίματος, η ακετυλοχολίνη ή η βραδυκινίνη, δρουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων τα οποία προκαλούν απελευθέρωση του παράγοντα χάλασης EDRF (endothelium -derived relaxation factor) ο οποίος επιβεβαιώθηκε πως είναι NO<sup>·</sup> (Snyder & Bredt, 1991). Η ακετυλοχολίνη ή η βραδυκινίνη προκαλούν μια αύξηση στη συγκέντρωση του ενδοκυττάριου ασβεστίου μέσω της δράσης της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP3). Το αυξανόμενο ενδοκυττάριο ασβέστιο συνδέεται στην θέση πρόσδεσης της καλμοδουλίνης στη συνθάση της NO<sup>·</sup> (NOS) και διεγείρει τη σύνθεση της NO<sup>·</sup> η οποία διαχέεται γρήγορα μακριά από τη θέση σύνθεσής της στην μυϊκή μεμβράνη των αρτηριών του αίματος προκαλώντας αγγειοδιαστολή (Murray, 1993). Με τον τρόπο αυτό η NO<sup>·</sup> αποτελεί έναν δεύτερο νευροδιαβιβαστή ο οποίος ενισχύει τα αποτελέσματα της ακετυλοχολίνης ή βραδυκινίνης στην μυϊκή στοιβάδα των αρτηριών του αίματος. Στο σύστημα αυτό η NOS βρίσκεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Παρόλα αυτά, στις εγκεφαλικές αρτηρίες, η NOS βρίσκεται στο πλέγμα των νεύρων στην εξωτερική στοιβάδα των εγκεφαλικών αρτηριών (Snyder & Bredt, 1991).

## **NO και εγκέφαλος**

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες, μελέτες υβριδισμού *in situ* και η ιστοχημική χρώση NADPH-διαφοράσης απέδειξαν ότι ο εγκέφαλος έχει τα υψηλότερα επίπεδα NOS σε σχέση με οποιοδήποτε άλλο ιστό ενώ, η ευρεία αυτή κατανομή του ενζύμου εμπλέκει την NO. σε μεγάλο αριθμό εγκεφαλικών κυκλωμάτων (Garthwaite & Boulton, 1995). Στο κεντρικό νευρικό σύστημα η NOS έχει εντοπιστεί, σε υψηλές συγκεντρώσεις, στην παρεγκεφαλίδα, το άνω και κάτω διδύμιο, τους μεσεγκεφαλικούς πυρήνες, τον υπεροπτικό πυρήνα του υποθαλάμου, τον ιππόκαμπο και το οσφρητικό φύμα και σε μικρότερες συγκεντρώσεις, στον εγκεφαλικό φλοιό και το ραβδωτό σώμα (Snyder & Bredt, 1991). Σε αρκετές από τις παραπάνω θέσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος η NO. τροποποιεί τη συναπτική λειτουργία μεταβάλλοντας την έκκριση νευροδιαβιβαστών. Για παράδειγμα, η NO. αυξάνει τα επίπεδα ντοπαμίνης στα βασικά γάγγλια αρουραίου (Zhu & Luo, 1992), ασκεί τονική διέγερση της έκκρισης ακετυλοχολίνης και νοραδρεναλίνης στον ιππόκαμπο (Suzuki και συν., 1993, Lauth και συν., 1993) ενώ αναστέλλει την έκκριση του εκλυτικού παράγοντα κορτικοτροπίνης (CRF) από τον υποθάλαμο (Costa και συν., 1993).

## **Μηχανισμοί δράσης της ελεύθερης ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου στο Κ.Ν.Σ.**

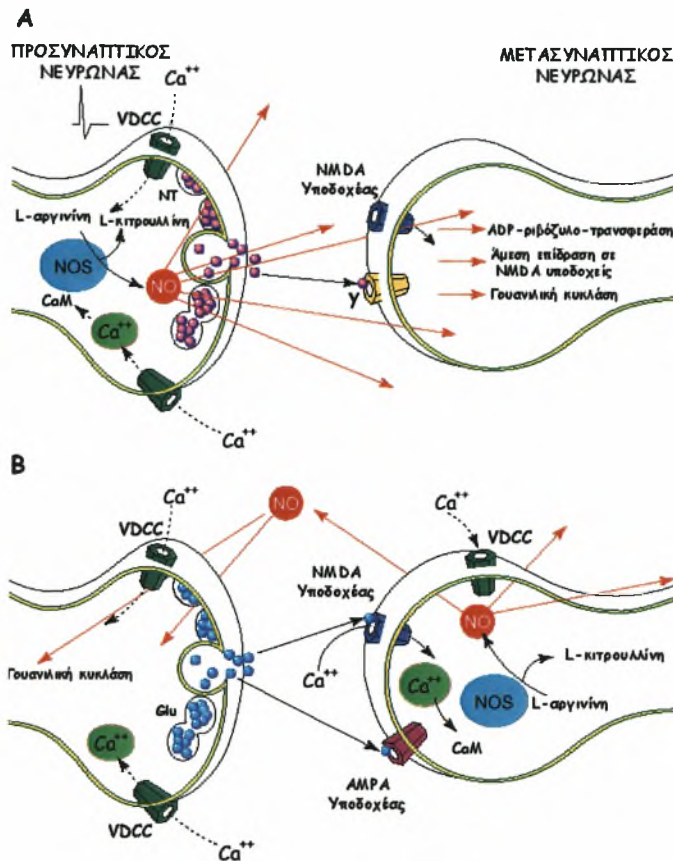
Όπως είναι ήδη γνωστό, οι περισσότεροι νευροδιαβιβαστές είναι πακεταρισμένοι σε κυστίδια και απελευθερώνονται στις συναπτικές σχισμές. Η NO παρόλα αυτά δεν πακετάρεται σε κυστίδια αλλά συντίθεται μετά από απαίτηση και διαχέεται στις γειτονικές θέσεις για να ασκήσει την δράση της (Snyder & Bredt, 1991). Η ικανότητα της NO να διαχέεται προς όλες τις κατευθύνσεις από το σημείο παραγωγής της προμηνύει πολλές από τις μοναδικές ιδιότητες της στον εγκέφαλο.

Όταν το γλουταμικό προσδένεται στους NMDA υποδοχείς το ενδοκυττάριο ασβέστιο των κυττάρων αυξάνει. Το ενδοκυττάριο ασβέστιο όπως είπαμε προσδένεται στην καλμοδουλίνη η οποία ενεργοποιεί την NOS να παράγει NO από την αργινίνη. Η NO είναι τότε ελεύθερη να διαχυθεί στις παρακείμενες περιοχές εξ' αιτίας της υψηλής της λιποδιαλυτότητας και γρήγορης διαχυτικής της ικανότητας (Snyder & Bredt, 1991, Giles και συν., 2003, Kiyofumi και συν., 1998). Η μοίρα της NO έχει πλέον να διαλέξει δύο δρόμους μετά την σύνθεσή της: (1) απενεργοποιείται μέσω της αλληλεπίδρασής της με ανιόντα υπεροξειδίου ή ελεύθερων νιτρωδών ριζών ή (2) δεσμεύεται στο κέντρο της αίμης της γουανυλικής κυκλάσης και πυροδοτεί την σύνθεση του κυκλικού GMP (cGMP) από GTP, ενεργοποιώντας έναν κυτταρικό καταράκτη γεγονότων αφού το cGMP είναι ένας δεύτερος αγγελιοφόρος.



Η NO<sup>·</sup> ανακαλύφθηκε στον εγκέφαλο μετά τη παρατήρηση ότι η δραστηριότητα των νευρώνων της παρεγκεφαλίδας αύξησε τα επίπεδα του cGMP καταδεικνύοντας ότι ίσως η ίδια η NO<sup>·</sup> να ήταν υπεύθυνη γι αυτό. Στη συνέχεια διαπιστώθηκε πράγματι ότι, τα επίπεδα της NO<sup>·</sup> αυξάνουν μετά από διέγερση των NMDA υποδοχέων μετά από χορήγηση γλουταμινικού οξέος (Young, 1993).

Περαιτέρω μελέτες απέδειξαν ότι, το γλουταμικό απελευθερώνεται από τον προσυναπτικό νευρώνα σε απάντηση ενός δυναμικού ενεργείας και προσδένεται σε μετασυναπτικούς NMDA υποδοχείς. Μέσω του μονοπατιού Ca<sup>++</sup>/καλμοδουλίνης που συζητήθηκε παραπάνω, η NO<sup>·</sup> συντίθεται από την NOS σε απάντηση του υψηλού ενδοκυττάριου ασβεστίου στον μετασυναπτικό νευρώνα (Εικόνα 15, Willmott και συν., 1996, Lancaster και συν., 1992). Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα του cGMP αυξάνονται στον προσυναπτικό νευρώνα καταδεικνύοντας πως η NO<sup>·</sup> έχει δράση και στο νευρώνα από τον οποίο συντίθεται. Συγκεκριμένα η NO<sup>·</sup> διαχέεται μέσα στον προσυναπτικό νευρώνα και διεγείρει τη σύνθεση cGMP προκαλώντας την απελευθέρωση περισσότερου γλουταμινικού οξέος ενισχύοντας έτσι την επικοινωνία μεταξύ των δύο νευρώνων (Snyder & Bredt, 1991). Αυτό αποτελεί ένα μοντέλο μακρόχρονης ενδυνάμωσης (LTP), μιας διαδικασίας με την οποία ως γνωστό, δημιουργείται η μνήμη.



Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση του προσυναπτικού (A) και του μετασυναπτικού (B) εντοπισμού της NO· - Πιθανοί μηχανισμοί δράσης της. NT: νευροδιαβιβαστής, VDCC: τασεο-εξαρτώμενοι διάλυτοι  $Ca^{++}$ , NOS:συνθετάση της NO·, CaM:  $Ca^{++}$ /καλμοδουλίνη, Glu: γλουταμινικό οξύ, Y: υποδοχέας.

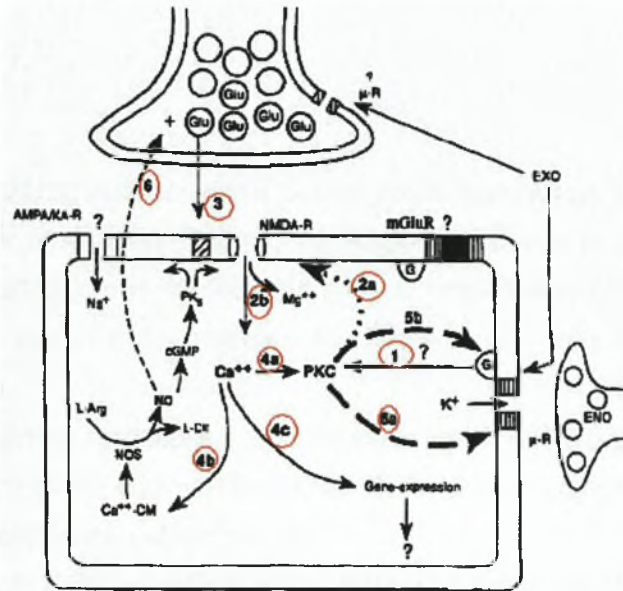
### NADPH-διαφοράση

Από τα μέσα σχεδόν του 20<sup>ου</sup> αιώνα ήταν γνωστό ότι ορισμένοι νευρώνες του εγκεφάλου έχουν τη δυνατότητα να μετατρέπουν τη διαλυτή χρωστική κυανό του τετραζολίου σε αδιάλυτο ίζημα παρουσία NADPH, γεγονός που αποτελεί τη βάση της ιστοχημικής χρώσης της NADPH-διαφοράσης (Scherer-Singler και συν., 1983, Dawson και συν., 1991, Vincent & Hope, 1992, Vincent & Kimura, 1992). Η αντίδραση αυτή αποδόθηκε πολύ αργότερα, στη συνθετάση της NO· λόγω της ικανότητας του ενζύμου να μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NADPH στο κυανό του τετραζολίου και να το μετατρέπει σε ίζημα (Bredt και συν., 1991 Dawson και συν., 1991, Hope και συν., 1991, Djamgoz και συν., 1996). Η ταύτιση των δύο αυτών ενζύμων επιτρέπει τη χρήση της ιστοχημικής μεθόδου της NADPH-διαφοράσης για τον εντοπισμό των κυττάρων που συνθέτουν την NO· ανεξάρτητα από την ισομορφή της NOS που αυτά εκφράζουν. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι υπάρχουν τουλάχιστον άλλα έξι ένζυμα τα οποία εξαρτώνται από το NADPH (Tracey και συν., 1993).

## ΥΠΕΡΑΛΓΗΣΙΑ ΚΑΙ ΟΠΙΟΕΙΔΗ

Για την ανάπτυξη υπεραλγησίας από τα οπιοειδή έχει προταθεί η ύπαρξη, τουλάχιστον στο οπίσθιο κέρασ του νωτιαίου μυελού, ένας κοινού κυτταρικού μηχανισμού (Mao και συν., 1995, 2002 Εικόνα 16).

Συγκεκριμένα, πιστεύεται ότι η δέσμευση ενός εξωγενώς χορηγούμενου οπιοειδικού αγωνιστή σε ένα μετασυναπτικό μ-οπιοειδικό υποδοχέα προκαλεί μέσω ενεργοποίησης G-πρωτεϊνών την μετατόπιση προς την κυτταρική μεμβράνη και την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) (Εικόνα 16, 1). Η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C προκαλεί:



Εικόνα 16. Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου ανάπτυξης υπεραλγησίας στα οπιοειδή στο νωτιαίο μυελό (Mao και συν., 1995).

α) άρση του αποκλεισμού του διαύλου NMDA από το  $Mg^{++}$  (Εικόνα 16, 2) με συνέπεια την αυξημένη ενεργοποίηση των υποδοχέων (Εικόνα 16, 3) και την εισροή ιόντων  $Ca^{++}$  είτε μέσω των διαύλων NMDA είτε μέσω τασεοελεγχόμενων διαύλων ασβεστίου που ενεργοποιούνται λόγω της προκαλούμενης εκπόλωσης της μετασυναπτικής μεμβράνης. Η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου μετασυναπτικά προκαλεί την περαιτέρω ενεργοποίηση της PKC (Εικόνα 16, 4α), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση περισσότερων NMDA υποδοχέων και νέα είσοδο ασβεστίου, με επακόλουθη ενεργοποίηση της εξαρτώμενης από  $Ca^{++}$ -καλμοδουλίνη συνθετάσης της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (Εικόνα 16, 4β). Ενδεχομένως, παρατηρούνται αλλαγές και στη γονιδιακή έκφραση του κυττάρου (Εικόνα 16, 4γ). Η συνεπαγόμενη παραγωγή της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου συμβάλει στην αύξηση της προσυναπτικής απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών

(Εικόνα 16, 6) και κατά συνέπεια στην παρατεταμένη αύξηση της συναπτικής αποτελεσματικότητας (υπερευαισθησία-υπεραλγησία) (Μαο και συν., 1995).

β) αποσύνδεση των μ-οπιοειδικών υποδοχέων από τις G-πρωτεΐνες με τις οποίες είναι συζευγμένες (απευαισθητοποίηση-αντοχή) (Εικόνα 16, 5B) και

γ) τροποποίηση της δραστηριότητας των διαύλων  $K^+$  που έχουν ανοίξει με την ενεργοποίηση του οπιοειδικού υποδοχέα (Εικόνα 16, 5α, Μαο και συν., 1995).

Από τα παραπάνω θα εστιάσουμε την προσοχή μας στην ελεύθερη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου και πως η έκφραση της μεταβάλλεται ή όχι στην περιοχή του ιπποκάμπου επίμυος μετά από χορήγηση φεντανύλης.

## **ΣΚΟΠΟΣ**

Ελάχιστες μελέτες υπάρχουν στη βιβλιογραφία σχετικά με την οξεία επίδραση των οπιοειδών στον ιππόκαμπο. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της φεντανύλης στη νευροδιαβίβαση του ιπποκάμπου επίμυος, ο οποίος ως γνωστό εμπλέκεται άμεσα στην αποθήκευση πληροφοριών που σχετίζονται με την αντίληψη του πόνου.

Πραγματοποιήθηκαν ιστοχημικές μελέτες εντοπισμού του ενζύμου διαφοράση του φωσφορικού-β-νικοτινάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτιδίου (NADPH-διαφοράση), το οποίο ταυτίζεται με το βιοσυνθετικό ένζυμο της NO<sup>•</sup>.

Οι μελέτες αυτές είχαν ως στόχο: α) τον εντοπισμό της συνθέτασης της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου στα νευρικά κύτταρα του ιπποκάμπου, β) την μελέτη της ενδεχόμενης δράσης της φεντανύλης στα επίπεδα έκφρασης της NOS στον ιππόκαμπο.



## ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή ήταν ενήλικοι αρσενικοί επίμυες Wister Βάρους 180 - 250 gr, οι οποίοι αγοράστηκαν από το Θεαγένειο Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης. Οι επίμυες διατηρήθηκαν σε κλουβιά με ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή. Ο κύκλος ημέρας-νύκτας ήταν 12 ώρες. Της ημέρας του πειράματος προηγούνταν «γνωριμία» με τα πειραματόζωα για λίγα λεπτά κάθε μέρα για την ελαχιστοποίηση του άγχους και του φόβου. Οι συνθήκες διαβίωσης και χειρισμού των πειραματόζωων ήταν σύμφωνες με τον Ελληνικό Νόμο (Π.Δ. 160/91).

### ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΦΕΝΤΑΝΥΛΗΣ - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ

Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν τυχαία σε 5 ομάδες των 4-5 ζώων. Από αυτές, η πρώτη ομάδα αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου. Στα ζώα των υπόλοιπων ομάδων χορηγήθηκαν υποδορίως και ανά 15-20 λεπτά, τέσσερις δόσεις φεντανύλης των 80μg/0,4ml/kg (συνολική δόση φεντανύλης: 320μg/1,6ml/kg). Οι επίμυες θανατώθηκαν 4, 6, 12 και 24 ώρες μετά την τελευταία ένεση φεντανύλης. Για την αποφυγή του θανάτου των πειραματόζωων λόγω καταστολής της αναπνοής από τη χορήγηση του οπιοειδούς, υπήρξε συνεχής παρακολούθηση ή/και «ανάληψη» του ζώου για χρονικό διάστημα έως και δύο ώρες μετά την τελευταία χορήγηση του φαρμάκου.

### ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΙΣΤΟΥ

Για τη λήψη και μονιμοποίηση του εγκεφάλου των πειραματόζωων, τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση πεντοθάλης (60-120μg ανά 450 γραμμάρια). Στη συνέχεια έγινε διάνοιξη της θωρακικής κοιλότητας και εισαγωγή φλεβοκαθετήρα 18G στην αριστερή κοιλία της καρδιάς. Ο φλεβοκαθετήρας ήταν συνδεδεμένος με ασκό που περιείχε 300 ml παγωμένου (4°C) φυσιολογικού ορού, ο οποίος έρεε με πίεση 130 mmHg. Μια τρύπα στη δεξιά κοιλία διευκόλυνε την έξοδο του αίματος. Αμέσως μετά την αφαίρεση του αίματος, χορηγήθηκαν κατά τον ίδιο τρόπο 500ml παγωμένου (4°C) διαλύματος παραφορμαλδεΐδης (4% PFA) σε 0,1M PB (0,1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) pH 7,4.

Μετά τη μονιμοποίηση και αφαίρεση τους, οι ιστοί επώαστηκαν για 16-18 ώρες σε διάλυμα 0,1M PB 30% σουκρόζης στους 4°C για την επίτευξη κρυοπροστασίας. Στη συνέχεια, έγινε ταχεία ψύξη των ιστών, με εμβύθιση τους για ένα λεπτό σε ισοπεντάνιο

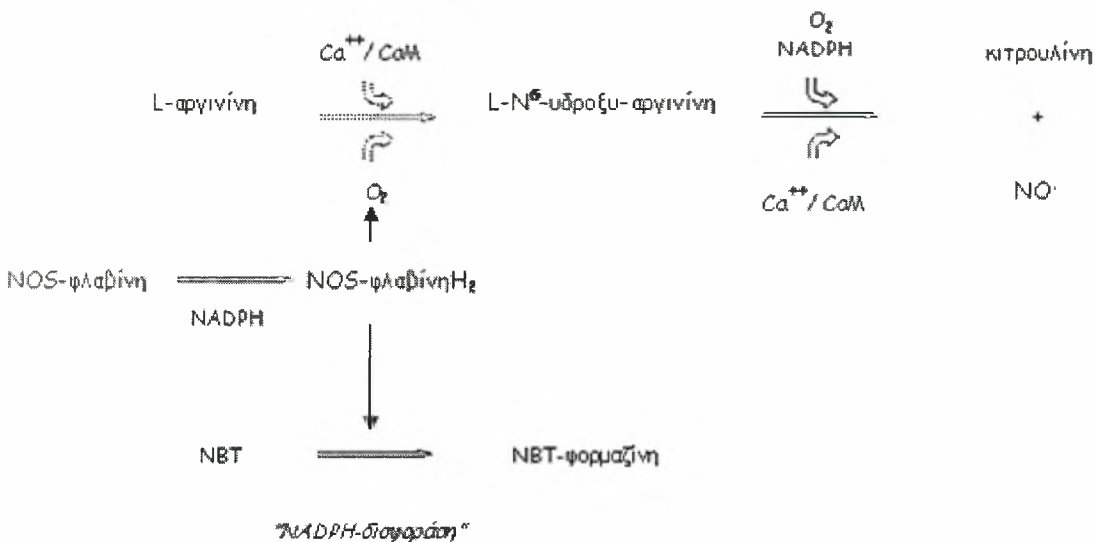
στους -45°C. Οι ιστοί διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι την κοπή τους. Για τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, κόπηκαν εγκάρσιες τομές πάχους 10μm σε κρουτόμο (*Leica*) και τοποθετήθηκαν σε ζελατινοποιημένες αντικειμενοφόρες πλάκες, οι οποίες διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

### ΖΕΛΑΤΙΝΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΦΟΡΩΝ ΠΛΑΚΩΝ

Η ζελατινοποίηση των αντικειμενοφόρων πλακών πραγματοποιήθηκε με την εμβύθισή τους σε μίγμα 0,5 w/v ζελατίνης (-300 bloom, *Merck*) και 1mM θειικού χρωμιούχου καλίου ( $K[Cr(SO_4)_4](H_2O)] \cdot 6H_2O$ , *AlCrO\_3*, *Merck*) σε θερμοκρασία 62°C και στέγνωμα στους 30°C για 16-18 ώρες.

### ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΧΡΩΣΗ NADPH-ΔΙΑΦΟΡΑΣΗΣ

Για τον εντοπισμό των νευρικών κυττάρων τα οποία συνθέτουν την ελεύθερη ρίζα του οξειδίου του αζώτου ( $NO^\cdot$ ) εφαρμόστηκε η ιστοχημική μέθοδος ανίχνευσης του ενζύμου διαφοράση του φωσφορικού-β-νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοσιδίου (NADPH-διαφοράση). Η NADPH-διαφοράση ταυτίζεται με το βιοσυνθετικό ένζυμο της  $NO^\cdot$ : συνθάση της  $NO^\cdot$  (Djamgoz και συν., 1996, Εικόνα 17).



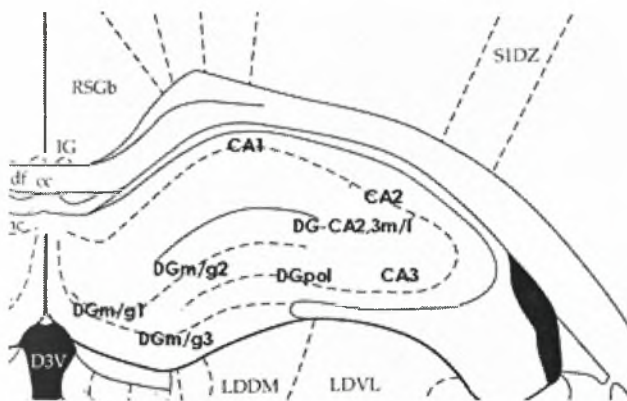
Εικόνα 17: Σχηματική αναπαράσταση της βιοσύνθεσης της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου - Αντίδραση NADPH-διαφοράσης. Η NOS αρχικά δέχεται ηλεκτρόνια από το NADPH ανεξάρτητα από την παρουσία L-αργινίνης και  $Ca^{++}/καλμοδουλίνης$  ( $Ca^{++}/CaM$ ). Η αναγμένη μορφή της NOS οξειδώνεται και πάλι παρουσία δεκτών ηλεκτρονίων όπως το NBT (NADPH-διαφοράση). Παρουσία  $Ca^{++}$ , CaM και μοριακού οξυγόνου η αναγμένη μορφή της NOS υδροξυλιώνει την L-αργινίνη η οποία στη συνέχεια οξειδώνεται από τη NOS σε κιτροουλίνη και  $NO^\cdot$ .

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στις μελέτες αυτές αποτελεί μια ελαφρώς τροποποιημένη μορφή του πρωτοκόλλου του Kowall και των συνεργατών του (1985)

(Vasilaki και συν., 2001, 2002) και στηρίζεται στη μετατροπή του εξωγενούς υποστρώματος Nitro Blue Tetrazolium σε έγχρωμο ίζημα παρουσία β-NADPH (Σχήμα 3). Συγκεκριμένα, οι τομές ξεπλύθηκαν αρχικά τρεις φορές επί δέκα λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M Tris-HCl pH 7,4 και στη συνέχεια επώασθηκαν για μιάμιση ώρα σε 0,1M Tris-HCl pH 7.4 το οποίο περιείχε 0,8mM β-NADPH (*Sigma*), 1mM Nitro Blue Tetrazolium (*Sigma*), 10mM Malic Acid (*Sigma*) και 1,5% Triton X-100. Τέλος, οι τομές ξεπλύθηκαν και πάλι τρεις φορές επί δέκα λεπτά με 0,1M Tris-HCl. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε στους 37°C. Στη συνέχεια, οι ιστοί παρέμειναν για να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 16 ώρες. Τέλος, οι τομές αφυδατώθηκαν με εμβύθιση τους για δύο λεπτά σε διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης (75, 95 και 100%) και ξυλόλη. Οι τομές αφού ξεπλύθηκαν με TBS, καλύφθηκαν με υλικό επικάλυψης (Edellan<sup>R</sup> neu, *Merck*) και παρατηρήθηκαν με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου.

#### ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

Τα παρασκευάσματα των ανοσοϊστοχημικών και ιστοχημικών μελετών παρατηρήθηκαν σε συμβατικό μικροσκόπιο [μικροσκόπιο Zeiss Axioskop (*Zeiss*), με φακό Plan-Neofluar x40/ 0.75]. Για την καλύτερη μελέτη των υποπεριοχών του ιπποκάμπου, ο ιππόκαμπος χωρίστηκε σε 8 υποπεριοχές, όπως φαίνεται στην εικόνα 23. Η λήψη των φωτογραφιών έγινε με τη χρήση κάμερας συνδεδεμένης με ηλεκτρονικό υπολογιστή και η επεξεργασία των φωτογραφιών έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα Adobe Photoshop 7.0.



Εικόνα 18. Ιππόκαμπος. Οι υποπεριοχές του ιπποκάμπου από τις οποίες ελήφθησαν οι φωτογραφίες.

Οι περιοχές από τις οποίες λήφθηκαν φωτογραφίες ήταν (Εικόνα 18):

*DGm/g 1*, *DGm/g 2*, *DGm/g 3*: οδοντωτή έλικα, στιβάδα κοκκωδών κυττάρων και μοριώδης στιβάδα

DGrol: οδοντωτή έλικα, στιβάδα πολύμορφων κυττάρων

CA1, CA2, CA3: CA1-3 πεδία του ιπποκάμπου

DG-CA2,3m/l: μοριώδης - βοθριώδης στιβάδα των CA2/CA3 πεδίων και της οδοντωτής έλικας

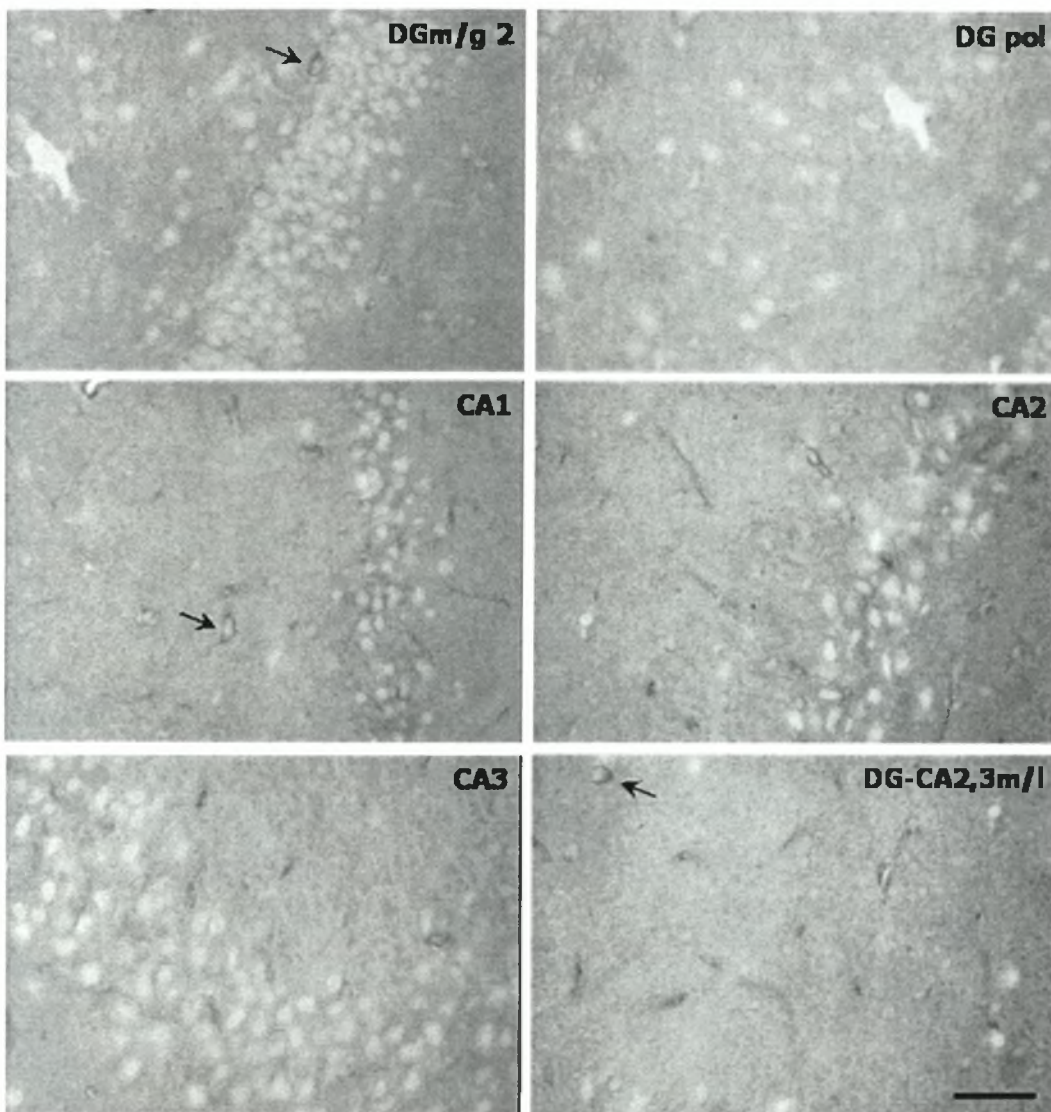
Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του ενζύμου NADPH-διαφοράση στα κυτταρικά σώματα των ενδονευρώνων του ιπποκάμπου (Quantitative image analysis) μετρήσαμε την ένταση της φωτεινότητας ανά εικονοστοιχείο (luminosity per pixel). Συγκεκριμένα, με τη βοήθεια του προγράμματος ανάλυσης εικόνων Adobe Photoshop 7.0, έγινε καταγραφή της έντασης της φωτεινότητας στο κυτταρόπλασμα των θετικών στην NADPH-διαφοράση κυττάρων (μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση έντασης φωτεινότητας / εικονοστοιχείο). Για τη μελέτη της επίδρασης της φεντανύλης στον αριθμό των ενδονευρώνων που εκφράζουν NADPH-διαφοράση, μετρήσαμε τον αριθμό των ενδονευρώνων ανά 100  $\mu\text{m}$  μήκους πυραμιδικής ή κοκκώδους στιβάδας για το αμμώνιο κέρας και την οδοντωτή έλικα αντίστοιχα.



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΟΣ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΗΣ NADPH-ΔΙΑΦΟΡΑΣΗΣ

Για τον εντοπισμό των νευρικών κυττάρων τα οποία συνθέτουν την NO· εφαρμόστηκε η ιστοχημική μέθοδος ανίχνευσης του ενζύμου διαφοράση του φωσφορικού-β-νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (NADPH-διαφοράση, Εικόνα 19).



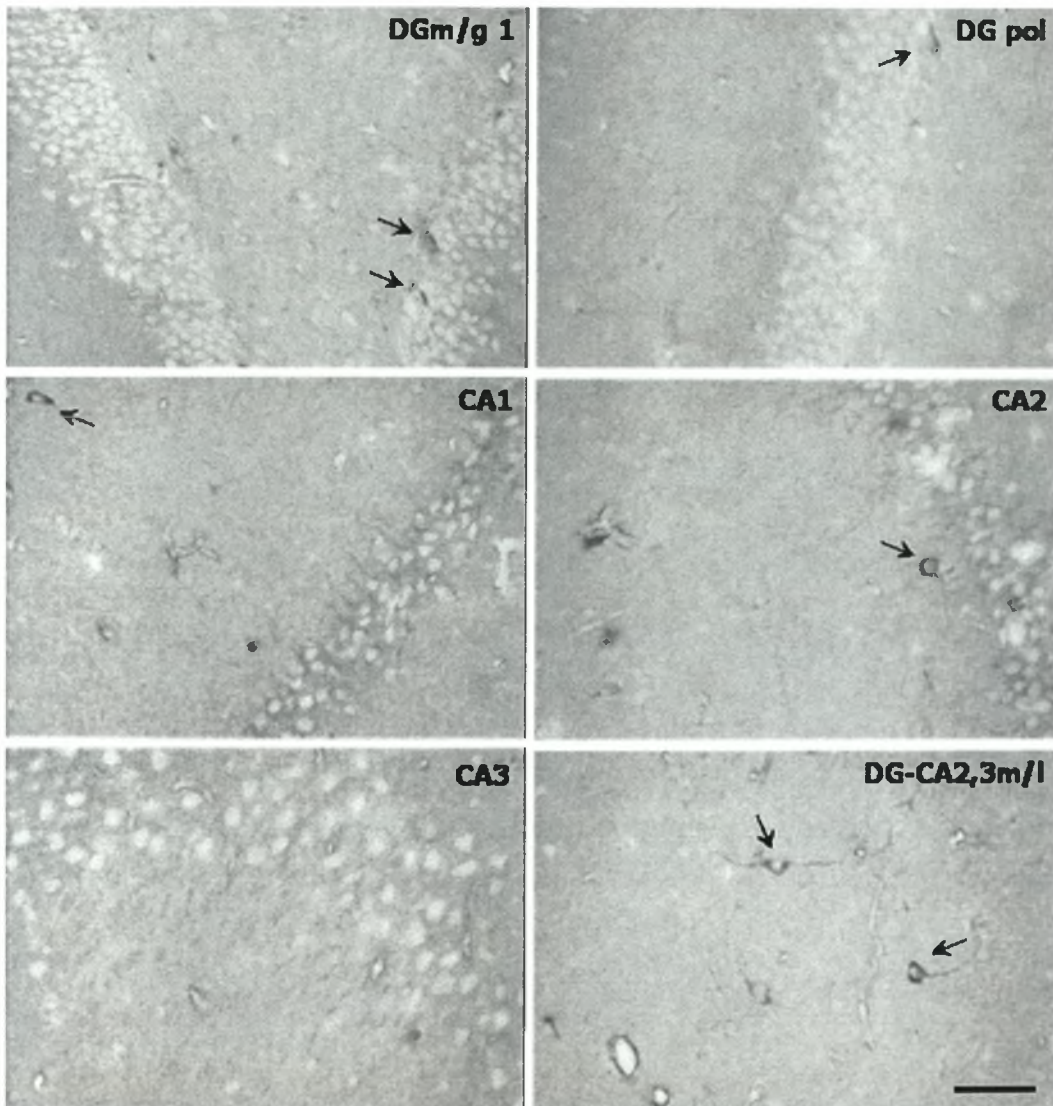
Εικόνα 19. Ιστοχημικός εντοπισμός της NADPH-διαφοράσης στον ιππόκαμπο επίμους ζώων ελέγχου. Βέλη: θετικά σσημασμένα κυτταρικά σώματα, Κλίμακα: 50μm.

Τα κύτταρα που εκφράζουν NADPH-διαφοράση έχουν θέση και χαρακτήρα ενδονευρώνων. Τα επίπεδα του ενζύμου αυτού στον ιππόκαμπο αρουραίων της ομάδας ελέγχου είναι πάρα πολύ χαμηλά, ενώ το ένζυμο φαίνεται να εντοπίζεται σε κυτταρικά σώματα και αποφύσεις μορφολογικά ετερογενών ενδονευρώνων παρόντων σε όλες τις υποπεριοχές του ιπποκάμπου.

## ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΦΕΝΤΑΝΥΛΗΣ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ NADPH-ΔΙΑΦΟΡΑΣΗΣ ΣΤΟΝ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟ ΕΠΙΜΥΟΣ

Για την μελέτη της ενδεχόμενης δράσης της φεντανύλης στα επίπεδα έκφρασης της NADPH-διαφοράσης στον ιππόκαμπο καθώς επίσης και στον αριθμό των νευρώνων που εκφράζουν το ένζυμο πραγματοποιήθηκαν ιστοχημικές μελέτες 4, 6, 12, 24 ώρες μετά την υποδόρια χορήγηση φεντανύλης.

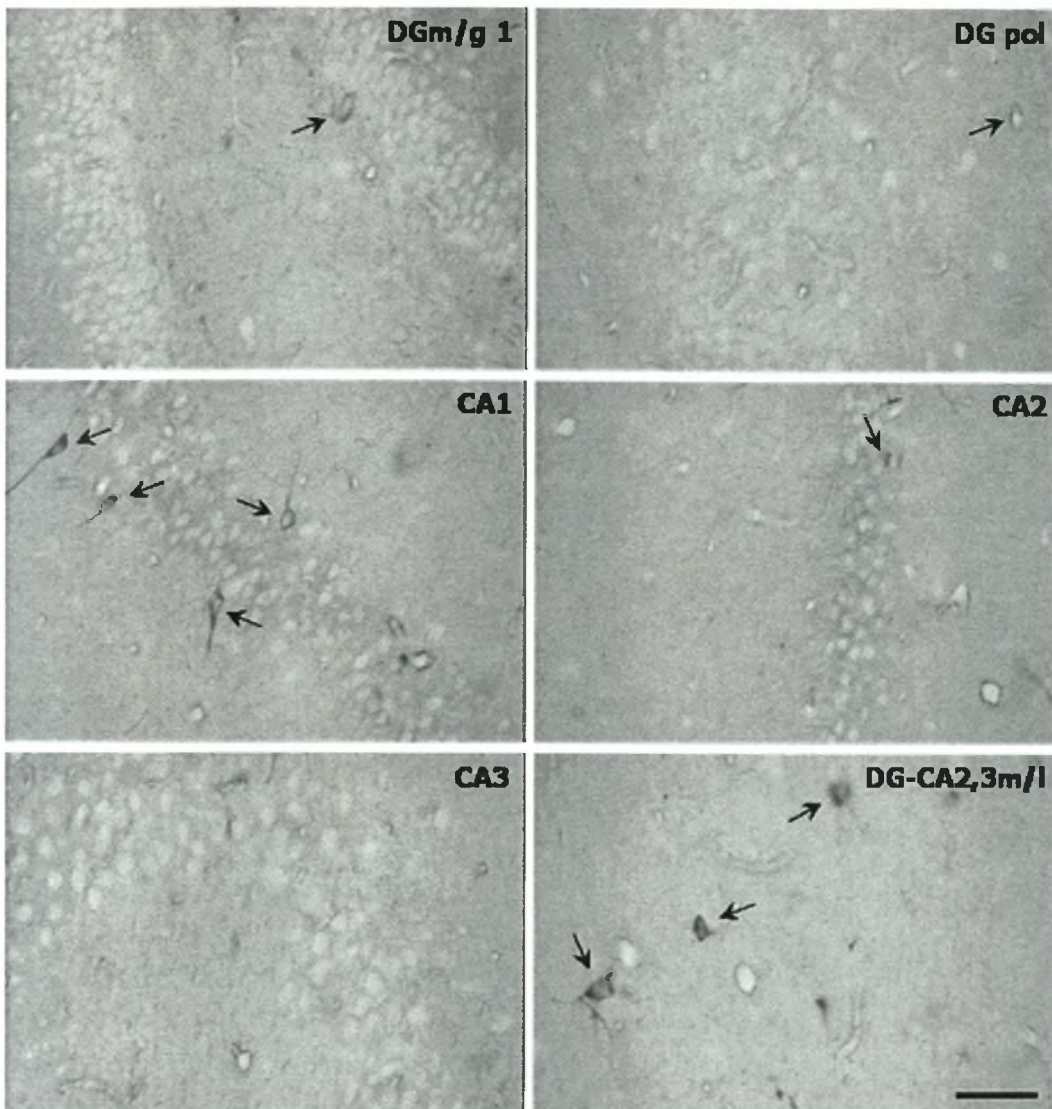
### Επίδρασης της φεντανύλης στον αριθμό των κυττάρων που εκφράζουν NADPH-διαφοράση



Εικόνα 20. Ιστοχημικός εντοπισμός της NADPH-διαφοράσης στον ιππόκαμπο επίμυος 4 ώρες μετά τη χορήγηση φεντανύλης. Βέλη: θετικά σεσημασμένα κυτταρικά σώματα, Κλίμακα: 50μm.

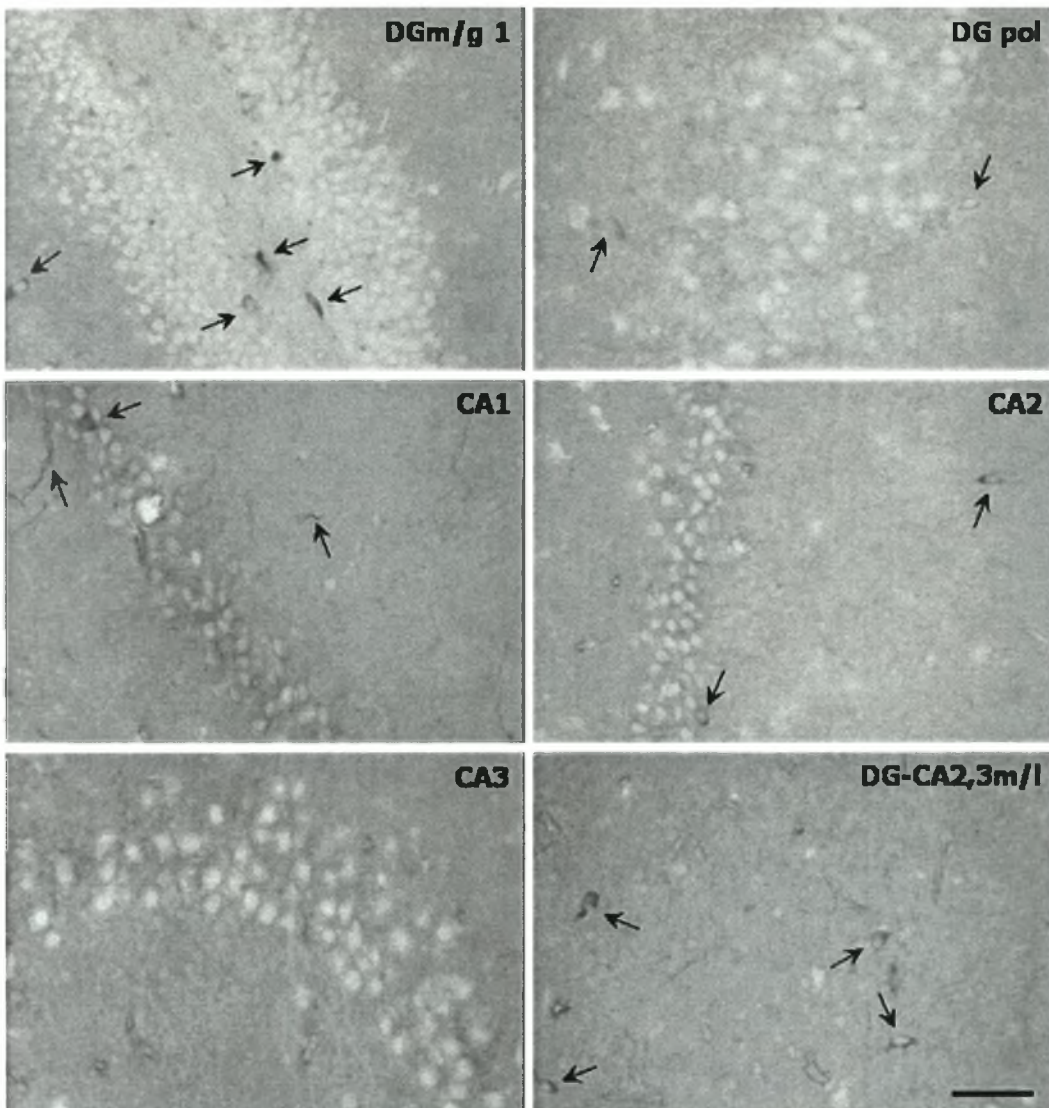
Τέσσερις ώρες μετά τη χορήγηση φεντανύλης παρατηρείται μια μικρή αύξηση στα θετικά στην NADPH -διαφοράση κύτταρα (Εικόνα 20).





Εικόνα 21. Ιστοχημικός εντοπισμός της NADPH-διαφοράσης στον ιππόκαμπο επίμυος 6 ώρες μετά τη χορήγηση φεντανύλης. Βέλη: θετικά σεσημασμένα κυτταρικά σώματα, Κλίμακα: 50μm.

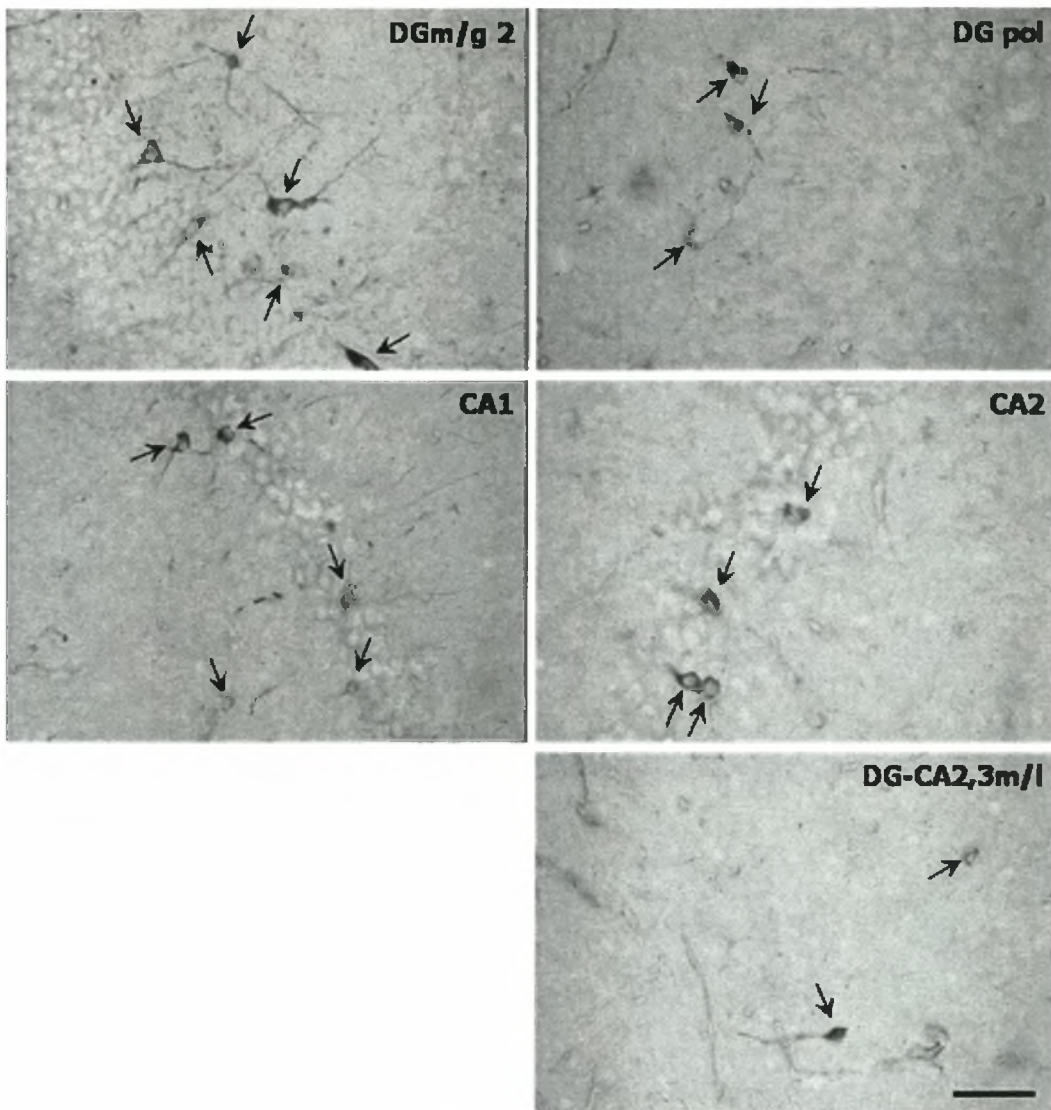
Έξι ώρες μετά την χορήγηση φεντανύλης εμφανίζεται όπως και στις περίπτωση των τεσσάρων ωρών μία μικρή αύξηση στον αριθμό των κυττάρων που εκφράζουν το ένζυμο NADPH-διαφοράση (Εικόνα 21).



Εικόνα 22. Ιστοχημικός εντοπισμός της NADPH-διαφοράσης στον ιππόκαμπο επίμυος 12 ώρες μετά τη χορήγηση φεντανύλης. Βέλη: θετικά σεσημασμένα κυτταρικά σώματα ή αποφύσεις κυττάρων, Κλίμακα: 50μm.

Δώδεκα ώρες μετά την χορήγηση φεντανύλης ο αριθμός των κυττάρων που εκφράζουν το ένζυμο NADPH-διαφοράση παραμένει αυξημένος (Εικόνα 22).





Εικόνα 23. Ιστοχημικός εντοπισμός της NADPH-διαφοράσης στον ιππόκαμπο επίμυος 24 ώρες μετά τη χορήγηση φεντανύλης. Βέλη: θετικά σεσημασμένα κυτταρικά σώματα, Κλίμακα: 50μm.

Η ποσότητα της NOS φαίνεται να αυξάνεται δραματικά 24 ώρες μετά τη χορήγηση φεντανύλης σε σύγκριση με τα ζώα ελέγχου σε όλες τις υποπεριοχές του ιπποκάμπου οι οποίες εξετάστηκαν (εικόνα 23).

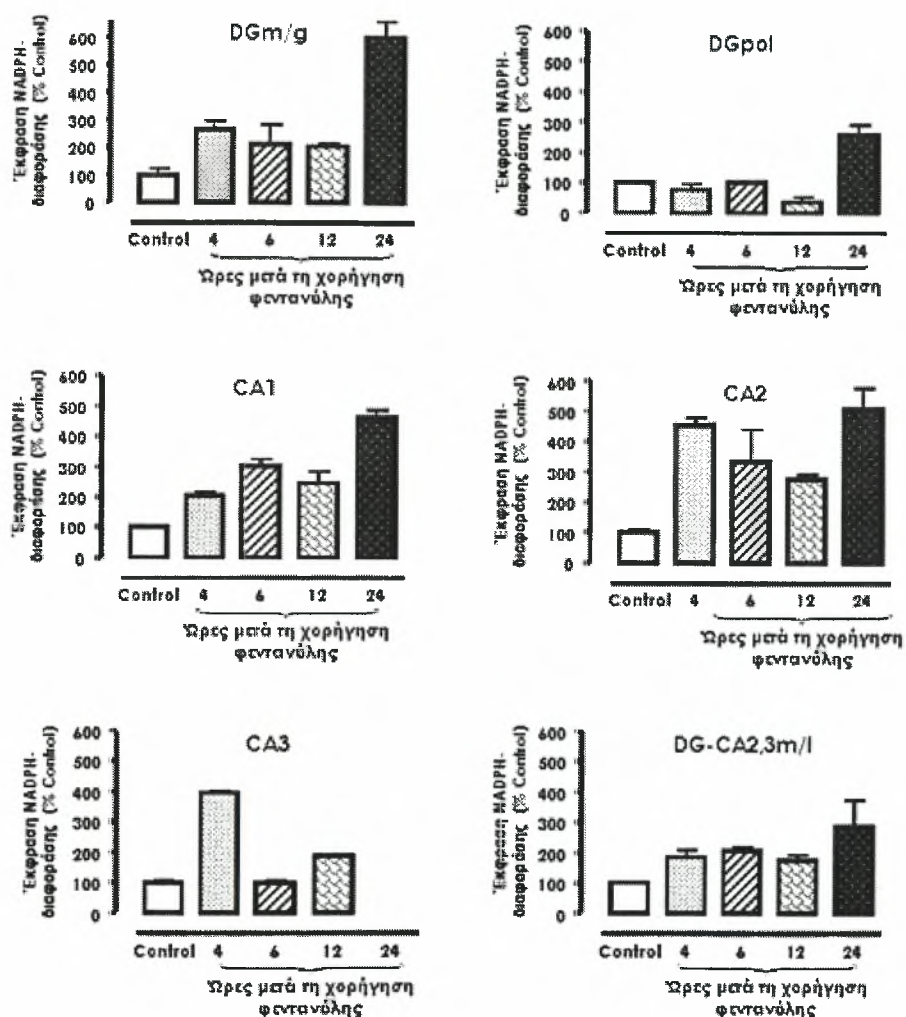
Στις ώρες 4,6,12 λοιπόν παρατηρείται μικρότερη και όχι πάντα τόσο ευδιάκριτη αύξηση στα επίπεδα της NOS. Συγκεκριμένα, αν εκφράσουμε με 1 σταυρό την ελάχιστη έκφραση της NOS, όπως στην εικόνα 22, και με 5 σταυρούς την μέγιστη έκφραση της NOS, όπως στην περιοχή 2 του ιπποκάμπου στην εικόνα 24, για τις υπόλοιπες περιοχές του ιπποκάμπου και τις υπόλοιπες ώρες έχουμε τα εξής αποτελέσματα (Πίνακας 2):

Πίνακας 2. Έκφραση της NADPH διαφωράσης στους ενδονευρώνες του ιπποκάμπου πριν και μετά τη χορήγηση της φεντανύλης.

	DGm/g 1	DGm/g 2	DG pol	DGm/g 3	CA1	CA2	CA3	DG-CA2,3m/l
Control	+	+	+	+	+	+	+	+
Fentanyl								
4 ώρες	++	+	+	++	++	+++	+	++
6 ώρες	+++	+	+	++	+++	++	++	+++
12 ώρες	+++	++	++	+	++	++	++	+++
24 ώρες	++++	++++	++++	;	++++	++++	;	++++

### Επίδρασης της φεντανύλης στα επίπεδα έκφρασης της NADPH-διαφοράσης

Για εξαγωγή ποσοτικών συμπερασμάτων όσο αφορά την NADPH-διαφοράση μετρήθηκε η ένταση φωτεινότητας εικονοστοιχείου (luminosity/pixel) με το πρόγραμμα Photoshop. Η παρατηρούμενη ένταση εμφανίζεται να αυξάνει σε μεγαλύτερο βαθμό μετά από 24 ώρες ενώ στα προηγούμενα διαστήματα παρουσιάζει μια σχετική αύξηση στις περισσότερες περιοχές του ιπποκάμπου, γεγονός που αντιστοιχεί σε αύξηση της συγκέντρωση της NADPH-διαφοράσης στα κύτταρα που την εκφράζουν (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Ποσοτική έκφραση της NADPH-διαφοράσης ανάλογα με την ένταση φωτεινότητας εικονοστοιχείου.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα οπιοειδή χρησιμοποιούνται ευρέως κλινικά για την αντιμετώπιση του πόνου και θεωρούνται -στις περισσότερες περιπτώσεις- ως τα πιο ισχυρά αναλγητικά.. Η χρησιμοποίηση οπιοειδών φαρμάκων για μεγάλο χρονικό διάστημα (ημέρες ή εβδομάδες), προκαλεί προοδευτική μείωση της δράσης τους, η οποία είναι γνωστή ως *απευαισθητοποίηση (ή εξάρτηση ή αντοχή)*. Ωστόσο, η παρουσία απευαισθητοποίησης δεν είναι η μοναδική αιτία για την ελάττωση του αναλγητικού αποτελέσματος των οπιοειδών φαρμάκων. Η οξεία χορήγηση οπιοειδών αναλγητικών προκαλεί την ανάπτυξη υπεραλγησίας (αυξημένη απάντηση σε επώδυνο ερεθισμό) και αλλοδυνίας (αντίληψη ενός φυσιολογικά μη επώδυνου ερεθίσματος ως πόνου), φαινόμενο που χαρακτηρίζεται ως «οξεία αντοχή» (acute dependence) (Harris και συν., 2005, Kim και συν., 1990). Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των παραπάνω φαινομένων φαίνεται να κατέχει η ελεύθερη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου.

Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε σε δύο σημεία:

- α. στον εντοπισμό των νευρώνων που συνθέτουν το ένζυμο NADPH-διαφοράση σε ζώα control, και
- β. στην επίδραση του οπιοειδούς φεντανύλη στη σύνθεση του ενζύμου NADPH-διαφοράση 4h, 6h, 12h, και 24h μετά την χορήγηση της.

Τα κύτταρα που εκφράζουν NADPH-διαφοράση έχουν θέση και χαρακτήρα ενδονευρώνων. Τα επίπεδα του ενζύμου αυτού στον ιππόκαμπο αρουραίων της ομάδας ελέγχου είναι πάρα πολύ χαμηλά, ενώ το ένζυμο φαίνεται να εντοπίζεται σε κυτταρικά σώματα και αποφύσεις μορφολογικά ετερογενών ενδονευρώνων παρόντων σε όλες τις υποπεριοχές του ιπποκάμπου. Όπως περιγράφεται και από τους Valtchanoff και συν., (1993), μόνο σε ένα μικρό κλάσμα των νευρώνων του ιπποκάμπου αρουραίου ανιχνεύεται η NADPH-διαφοράση, ενώ ο εντοπισμός της σε κυτταρικά σώματα και νευράξονες, οι οποίοι διακλαδίζονται σχεδόν σε κάθε υποπεριοχή του ιπποκάμπου, επιβεβαιώνεται και από τους Kotti και συν., (1997).

Η ποσότητα της NOS φαίνεται να αυξάνει σταδιακά μετά τη χορήγηση φεντανύλης, με τη μέγιστη έκφρασή της να εντοπίζεται στις 24 ώρες σε όλες τις υποπεριοχές του ιπποκάμπου. Στις υπόλοιπες ώρες παρατηρείται μικρότερη και όχι πάντα τόσο ευδιάκριτη αύξηση στα επίπεδα της NOS. Η αύξηση αυτή της NOS πιθανότατα είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C που έπεται της δέσμευσης της φεντανύλης στον μ οπιοειδικό υποδοχέα. Όπως ήδη αναφέρθηκε

(Μαο και συν., 1995β, Mayer και συν., 1996), η ενεργοποίηση της PKC προκαλεί μεταξύ των άλλων άρση του αποκλεισμού του διαύλου των NMDA υποδοχέων από το  $Mg^{2+}$ , με συνέπεια την αυξημένη ενεργοποίηση των υποδοχέων και την εισροή ιόντων  $Ca^{2+}$ . Η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάρου ασβεστίου μετασυναπτικά προκαλεί την περαιτέρω ενεργοποίηση της PKC, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση περισσότερων NMDA υποδοχέων και νέα είσοδο ασβεστίου με επακόλουθη ενεργοποίηση της ασβέστιο-καλμοδουλίνης-εξαρτώμενης συνθετάσης της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (NO<sup>·</sup>). Η συνεπαγόμενη παραγωγή NO<sup>·</sup> συμβάλλει στην αύξηση της προσυναπτικής απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών και κατά συνέπεια στην παρατεταμένη αύξηση της συναπτικής αποτελεσματικότητας (*υπερευαισθησία - υπεραλγησία*, De Conno και συν., 1991, Mao και συν., 1995, 1995β, 2002 Devulder και συν., 1997, Larcher και συν., 1998, Celerier και συν., 1999, Celerier και συν., 2000).

Αντιλαμβανόμαστε λοιπόν πόσο σημαντικός είναι ρόλος της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου στην νευροδιαβίβαση του εγκεφάλου και την καταλυτική δράση που ασκεί αυτή στην ανάπτυξη ανεπιθύμητων φαινομένων που συνοδεύουν την χορήγηση οπιοειδών. Η εύρεση της αναλογικής σχέσης μεταξύ των χρονικών διαστημάτων από την χορήγηση αγωνιστών των οπιοειδών όπως η φεντανύλη και της αύξησης της συγκέντρωσης της NO με την πάροδο του χρόνου, καταδεικνύει πως η μελέτη δράσης του μορίου αυτού έχει πολλά ακόμα να μας διδάξει.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## Δημοσιεύσεις

1. Archer D.P. and Roth S.H. Pharmacodynamics of thiopentone: nocifensive reflex threshold changes correlate with hippocampal electroencephalography. *Br J Anaesth* 79 (1997) 744-9.
2. Besse D., Lombard M.C., Zajac J.M., Roques B.P., Besson J.M., Pre- and postsynaptic distribution of  $\mu$ ,  $\delta$  and  $\kappa$  opioid receptors in the superficial layers of the cervical dorsal horn of the rat spinal cord. *Brain Research*. 521 (1990) 15-22.
3. Bredt, D.S., and Snyder, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, (1990) 682-5.
4. Bredt, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R.R., and Snyder, S.H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351 (1991) 714-718.
5. Calejesan AA, Kim SJ, Zhuo M and Eur J, Descending facilitatory modulation of a behavioral nociceptive response by stimulation in the adult rat anterior cingulate cortex. *Pain* 4 (2000) 83-96.
6. Costa, A., Trainer, P., Besser, M., and Grossman, A. (1993) Nitric oxide modulates the release of corticotropin-releasing hormone from the rat hypothalamus in vitro. *Brain Res*. 605:187-192.
7. Ceccarelli I., Scaramuzzino A., Aloisi A.M., Effects of formalin pain on hippocampal c-Fos expression in male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 64, 4 (1999) 797-802.
8. Celerier E., Simonnet G., Maldonado R., Prevention of fentanyl-induced delayed pronociceptive effects in mice lacking the protein kinase  $C\gamma$  gene. *Neuropharmacology*. 46 (2004) 264-272.
9. Celerier E., Laulin J.P. Larcher A., Le Moal M., Simonnet G., Evidence for opiate-activated NMDA processes masking opiate analgesia in rats. *Brain Research*. 847 (1999) 18-25.
10. Celerier E., Rivat C., Jun Y., Laulin J.-P., Larcher A., Reynier P., Simonnet G., Long-lasting hyperalgesia induced by fentanyl in rats. *Anesthesiology*. 92 (2000) 465-472.

11. Celerier E., Laulin J.P., Corcuff J.B., Le Moal M., Simonnet G., Progressive Enhancement of Delayed Hyperalgesia Induced by Repeated Heroin Administration: A Sensitization Process. *The Journal of Neuroscience*. 21 (2001) 4074-4080.
12. Chatterton E. Jon, Marc Awobuluyi, Louis S. Premkumar, Hiroto Takahashi, Maria Talantova, Yeonsook Shin, Jiankun Cui, Shichun Tu, Kevin A. Sevarino, Nobuki Nakanishi, Gang Tong, Stuart A. Lipton and Dongxian Zhang., Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature*. 415 (2002) 793-798.
13. Chen L., Huang L.Y., Protein kinase C reduces Mg<sup>++</sup> block of NMDA receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature*. 356 (1992) 521-523.
14. Commons G. Kathryn, Milner A. Teresa, Localization of delta opioid receptor immunoreactivity in interneurons and pyramidal cells in the rat hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*. 381, 3 (1998) 373-387.
15. Dawson, T.M., Brecht, D.S., Fotuhi, M., Hwang, P.M., and Snyder, S.H. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 7797-7801.
16. De Conno F., Caraceni A., Martini C., Spoldi E., Salvetti M., Ventafridda V., Hyperalgesia and myoclonus with intrathecal infusion of high dose morphine. *Pain* 47 (1991) 337-339.
17. Devulder J., Hyperalgesia induced by high-dose intrathecal sufentanil in neuropathic pain. *J Neurosurg Anesthesiol*. 9 (1997) 146 -148.
18. Djamgoz A.B.M., Aguilo R., Greenstreet H.E., Reynolds R., Wilkin P.G., Histochemistry of NADPH-diaphorase—A marker for neuronal nitric oxide synthase—In the carp retina. *Neurochemistry International*. 28, 3 (1996) 283-291.
19. Drake C.T., Milner T.A., Mu opioid receptors are in somatodendritic and axonal compartments of GABAergic neurons in rat hippocampal formation. *Brain Res*. 849, (1-2) (1999) 203-15.
20. Freund T.F. and Buzsaki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6 (1996) 427-429.
21. Garthwaite, J., and Boulton, C.L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol*. 57 (1995) 683-706.
22. Giles E. Hardingham and Hilmar Bading., The Yin and Yang of NMDA receptor Signalling. *Trends in Neurosciences* 26, 2 (2003) 81-89.

23. Greves Pierre, Wan Huang, Qin Zhou, Madeleine Thornwall, Fred Nyberg, Acute effects of morphine on the expression of mRNAs for NMDA receptor subunits in the rat hippocampus, hypothalamus and spinal cord. *European Journal of Pharmacology*. 341 (1998) 161-16.
24. Harris C.A., Gewirtz C.J., Acute opioid dependence: characterizing the early adaptations underlying drug withdrawal. *Review Psychopharmacology*, 178 (2005) 353-366
25. Halasy K, Racz B, Maderspach K., Kappa opioid receptors are expressed by interneurons in the CA1 area of the rat hippocampus: a correlated light and electron microscopic immunocytochemical study. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 19 (2000) 233-241.
26. Hope B.T, Michael G.J, Knigge K.M, Vincent S.R. Neuronal NADPH-d is a nitric oxide synthase. *Pro Nalt Acad Sci USA*, 85 (1991) 5162-5166.
27. Jaffrey, S.R., and Snyder, S.H. Nitric oxide: a neural messenger. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11( 1995) 417-440.
28. Jasmin L, Rabkin SD, Granato A, Budah A and Ohara PT Analgesia and hyperalgesia from GABA-mediated modulation of the cerebral cortex. *Nature* 424 (2003) 316-320.
29. Kakigi R., Inui K., Tran D.T., Qiu Y., Wang X., Watanabe S. and Hoshiyama M., Human brain processing and central mechanisms of pain as observed by electro- and magneto-encephalography. *J Chin Med Assoc* 67 (2004) 377-86.
30. Kim D.H., Fields H.L., Barbaro N.M., Morphine analgesia and acute physical dependence: rapid onset of two opposing, dose-related processes. *Brain Res.* 516, 1 (1990) 37-40.
31. Kiyofumi Yamada, Toshitaka Nabeshima., Changes in NMDA Receptor/Nitric Oxide Signaling Pathway in the Brain With Aging. *Microscopy Research and Technique* 43 (1998) 68-74.
32. Kotti T., Halonen T., Sirvio J., Riekkinen P., Miettinen R., Comparison of NADPH diaphorase histochemistry, somatostatin immunohistochemistry, and silver impregnation in detecting structural and functional impairment in experimental status epilepticus. *Neuroscience* 80, 1 (1997) 105-117.
33. Koshland DE Jr. The molecule of the year. *Science* 258 (1992) 1861.
34. Kowall N.W., Beal M.F., Ferrante R.J. and Martin J.B., Topography of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase staining neurons in rat striatum. *Neurosci. Lett.* 59 (1985) 61-66.

35. Krzysztof W. & Czyrak A. The distribution of the NMDA R1 subunit in the rat hippocampus - an immunocytochemical study. *Brain Research*. 768 (1997) 333-337.
36. Larcher A., Laulin P.J., Celerier E., Le Moal M., Simmonet G., Acute tolerance associated with a single opiate administration: involvement of N-Methyl-D-Aspartate-Depended pain facilitatory systems. *Neuroscience*. 84 (1998) 583-589.
37. Laulin J.P., Larcher A., Celerier E., Le Moal M., Simmonet G., Long lasting increased pain sensitivity in rat following exposure to heroin for the first time. *European Journal of Neuroscience*. 10 (1998) 782-785.
38. Laulin J.P., Celerier E., Larcher A., Le Moal M., Simmonet G., Opiate tolerance to daily heroin administration: an apparent phenomenon associated with enhanced pain sensitivity. *Neuroscience* 89 (1999) 631-636.
39. Lauth, D., Hertting, G., and Jackisch, R. Involvement of nitric oxide synthase in 3,4-diaminopyridine-evoked noradrenaline release in rat hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* 236 (1993) 165-166.
40. Lancaster JR Jr, Langrehr JM, Bergonia HA, Murase N, Simmons RL, Hoffman RA. EPR detection of heme and nonheme iron-containing protein nitrosylation by nitric oxide during rejection of rat heart allograft. *J Biol Chem*. 267 (1992) 10994-8.
41. Madison D.V. and Nicoll R.A., Enkephalin hyperpolarizes intraneurons in the rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)* 398 (1988) 123-130.
42. Mao J., Opioid-induced abnormal pain sensitivity: implications in clinical opioid therapy. Topical review. *Pain* 100 (2002) 213-217.
43. Mao J., Price D.D., Mayer J.D., Mechanisms of hyperalgesia and morphine tolerance: a current view of their possible interactions. Review article. *Pain*. 62, 3 (1995) 259-274.
44. Mao J., Price D.D., Philips L.L., Lu J., Mayer J.D., Increases in protein kinase C gamma immunoreactivity in the spinal cord of rats associated with tolerance to the analgesic effects of morphine. *Brain Res*. 677, 2 (1995B) 257-67.
45. Mayer D.J., Mao J., Price D.D., The development of morphine tolerance and dependence is associated with translocation of protein kinase C. *Pain*. 67, 1 (1996) 227-9.
46. McKenna J.E., Melzack R., Analgesia produced by lidocaine microinjection into the dentate gyrus. *Pain*. 49,1 (1992) 105-112.

47. Meller S.T. and Gebhart G.F., Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 52 (1993) 127-136.
48. Nicoll R.A., Alger B.E. and Jahr C.E., Enkephalin blocks inhibitory pathways in the vertebrate CNS. *Nature*. 287 (1980) 22-25.
49. Petralia R.S., Wang Y.X., Wenthold R.J., The NMDA receptor subunits NR2A and NR2B show histological and ultrastructural localization patterns similar to those of NR1. *The Journal of neuroscience*. 14, 10 (1994) 6102-6120.
50. Scherer-Singler, U., Vincent, S.R., Kimura, H., and McGeer, E.G. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J. Neurosci. Methods* 9 (1983) 229-234.
51. Stuehr, D.J., and Ikeda-Saito, M. Spectral characterization of brain and macrophage nitric oxide synthases. Cytochrome P-450-like heme proteins that contain a flavin semiquinone radical. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 20547-20550.
52. Snyder, S.H., and Brecht, D.S. Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharmacol. Sci.* 12 (1991) 125-128.
53. Svoboda R. Kurt, Cathy E. Adams, Carl R. Lupica, Opioid receptor subtype expression defines morphologically distinct classes of hippocampal interneurons. *The Journal of Neuroscience*. 19, 1 (1999) 85-95.
54. Suzuki, T., Nonaka, H., Fujimoto, K., and Kawashima, K. (1993) Effects of physostigmine and some nitric oxide-cyclic GMP-related compounds on muscarinic receptor-mediated autoinhibition of hippocampal acetylcholine release. *J. Neurochem.* 60:2285-2289.
55. Tamaki Mabuchi, Shinji Matsumura, Emiko Okuda-Ashitaka, Takahiro Kitano, Hirotatsu Kojima, Tetsuo Nagano, Toshiaki Minami and Seiji Ito., Attenuation of neuropathic pain by the nociceptin/orphanin FQ antagonist JTC-801 is mediated by inhibition of nitric oxide production. *European Journal of Neuroscience* 17 (2003) 1384-1392.
56. Tracey, W.R., Nakane, M., Pollock, J.S., and Forstermann, U. Nitric oxide synthases in neuronal cells, macrophages and endothelium are NADPH diaphorases, but represent only a fraction of total cellular NADPH diaphorase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195 (1993) 1035-1040.
57. Trujillo A.K., Are NMDA receptors involved in opiate-induced neural and behavioural plasticity? A review of preclinical studies. *Psychopharmacology*. 151 (2000) 121-141.



58. Valtschanoff J.G., Weinberg R.J., Kharazia V.N., Nakane M., Schmidt H.H., Neurons in rat hippocampus that synthesize nitric oxide. *J. Comp. Neurol.* 331, 1 (1993) 111-21.
59. Vasilaki A., Mouratidou M., Schulz S., Thermos K., Somatostatin mediates nitric oxide production by activating sst2 receptors in the rat retina. *Neuropharmacology.* 43 (2002) 899-909.
60. Vasilaki A., Gardette R., Epelbaum J., Thermos K., NADPH-diaphorase colocalization with somatostatin receptor subtypes sst2A and sst2B in the retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 42 (2001) 1600-1609.
61. Vincent, S.R., and Hope, B.T. Neurons that say NO. *Trends Neurosci.* 15 (1992) 108-113.
62. Vincent, S.R., and Kimura, H. (1992) Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46:755-784.
63. Wei F., Xu Z.C., Qu Z., Milbrandt J., Zhuo M., Role of EGR1 in hippocampal synaptic enhancement induced by tetanic stimulation and amputation. *J. Cell Biol.* 149, 7 (2000) 1325-34.
64. Willmott Nick, Jaswinder K. Sethi, Timothy F. Walseth, Hon Cheung Lee, Alison M. White and Antony Galionei., Nitric Oxide-induced Mobilization of Intracellular Calcium via the Cyclic ADP-ribose Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 7 (1996) 3699-3705.
65. Zhu, X.Z., and Luo, L.G. (1992) Effect of nitroprusside (nitric oxide) on endogenous dopamine release from rat striatal slices. *J. Neurochem.* 59:932-935.

#### **Διαδίκτυακοί Τόποι**

<http://en.wikipedia.org/wiki/Fentanyl>

[http://en.wikipedia.org/wiki/Gamma-aminobutyric\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Gamma-aminobutyric_acid)

<http://en.wikipedia.org/wiki/Hippocampus>

[http://en.wikipedia.org/wiki/Limbic\\_system](http://en.wikipedia.org/wiki/Limbic_system)

<http://instruct1.cit.cornell.edu/courses/bionb424/students/cth5/anatomy.html>

<http://web.indstate.edu/thcme/anderson/LDL.html>

<http://www.acssurgery.com/acsonline/thumbs/F300324T.gif>

<http://www.angelfire.com/yt/yas709neuroscience/hippocampus.htm>

<http://www.benbest.com/science/anatmind/anatmd3.html#hippo>

<http://www.bris.ac.uk/Depts/Synaptic/info/glutamate.html>

<http://www.bris.ac.uk/Depts/Synaptic/info/pathway/himpcampal.htm>  
[http://www.deadiversion.usdoj.gov/drugs\\_concern/fentanyl.htm](http://www.deadiversion.usdoj.gov/drugs_concern/fentanyl.htm)  
[http://www.deadiversion.usdoj.gov/drugs\\_concern/fentanyl.htm](http://www.deadiversion.usdoj.gov/drugs_concern/fentanyl.htm)  
<http://www.geocities.com/HotSprings/3515/fentanyl.jpg>  
[http://www.ipbs.fr/anglais/teams/meunier/noc\\_rcp.jpg](http://www.ipbs.fr/anglais/teams/meunier/noc_rcp.jpg)  
[http://www.janssen-cilag.gr/product/detail.jhtml?itemname=fentanyl\\_all](http://www.janssen-cilag.gr/product/detail.jhtml?itemname=fentanyl_all)  
<http://www.undergrad.ahs.uwaterloo.ca/~vmucci/hippoc>

### Βιβλία

1. Στοιχεία ανατομικής του ανθρώπου εν συσχετισμώ προς την λειτουργική μορφολογίαν και εφηρμοσμένην ανατομοκήν. Νικόλαος Κανδρεβιώτης. Τεύχος Α': το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα. Εκδόσεις: Υπηρεσία Δημοσιευμάτων Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Θεσσαλονίκη (1997) 66-68.
2. Επίτομη Ανατομική του Ανθρώπου και Άτλας. Αλέξανδρος Σάββας. Τόμος Δεύτερος. Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη. Θεσσαλονίκη (1989) 185-187.
3. Αναισθησιολογία. Αργυρώ Ι. Φασουλάκη. Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης. Αθήνα (2005) 588-602.
4. Κλινική Αναισθησιολογία. G. Edward Morgan, Maged S. Mikhail. 1ος τόμος. Δεύτερη Έκδοση. Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου. Αθήνα (2000) 390-406.
5. Αναισθησιολογία. Επείγουσα και εντατική ιατρική Αντιμετώπιση του πόνου. Γκιάλα Μ. Μαρία. University Studio Press. Θεσσαλονίκη (1998) 271-279.
6. Νευροεπιστήμη και συμπεριφορά. Kandel R. Eric, Schwartz H. James, Jessell M. Thomas. Παναπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. Ηράκλειο (1999).
7. Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα του Ανθρώπου Σύνοψη και Άτλαντας. Nieuwenhuys R., Voogd J., Chr. van Huijzen. Εκδόσεις Αφών Κυριακίδη. Θεσσαλονίκη (1983).
8. Φαρμακολογία. Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman. Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης. Αθήνα (1998)