



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
Αριθ. Πρωτ. .... 130 .....
Ημερομηνία 4/2/2010 .....

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ  
ΦΕΝΤΑΝΥΛΗΣ ΣΕ ΤΟΜΕΣ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ  
ΑΡΟΥΡΑΙΟΥ 24 ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ *in vivo*  
ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΤΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΥ

Σταυρούλα Ζαχαρία

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Ευτυχία Ασπροδίνη, Αναπλ. Καθηγήτρια Φαρμακολογίας

Λάρισα 2010



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

Αριθ. Εισ.: 8229/1

Ημερ. Εισ.: 28-04-2010

Δωρεά: \_\_\_\_\_

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2010

ZAX

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087086

Στους γονείς μου, Κωνσταντίνο και Ελένη

## Στοιχεία διπλωματικής εργασίας

Το εργαστηριακό και πειραματικό μέρος της διπλωματικής εργασίας μου πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, την περίοδο Φεβρουαρίου-Σεπτεμβρίου 2009 με επιβλέπουσα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ευτυχία Ασπροδίνη.

### Τριμελής Επιτροπή:

Ευτυχία Ασπροδίνη

Δημήτρης Κουρέτας

Καλλιόπη Λιαδάκη

Ε. Ασπροδίνη  


## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
ΠΟΝΟΣ.....	8
Κατηγορίες πόνου.....	8
Υποδοχείς και διαβίβαση του πόνου.....	9
ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΣ.....	12
Ανατομία και ιστολογία του ιπποκάμπου.....	14
Ρόλος του ιπποκάμπου.....	20
ΟΠΙΟΕΙΔΗ.....	23
Οπιοειδή φάρμακα.....	23
Οπιοειδικοί υποδοχείς.....	24
Φεντανύλη.....	26
γ-ΑΜΙΝΟΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ.....	28
ΣΚΟΠΟΣ.....	30
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	31
ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ.....	31
ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΦΕΝΤΑΝΥΛΗΣ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ.....	31
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΙΣΤΟΥ.....	31
ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ.....	32
ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ.....	33
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	35
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	44
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	46

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους:

Ευτυχία Ασπροδίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τις πολύ σημαντικές και χρήσιμες συμβουλές της σε θέματα φαρμακολογίας και την πολύτιμη βοήθεια της σε θέματα εργαστηρίου καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής εργασίας.

Καλλιόπη Λιαδάκη, Λέκτορα Φαρμακολογίας του Τμήματος Βιοχημείας κ Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για την συμβολή της στην πραγματοποίηση της πτυχιακής εργασίας.

Δημήτριο Κουρέτα, Καθηγητή Φαρμακολογίας του Τμήματος Βιοχημείας κ Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, μέλος της τριμελούς επιτροπής και για την συμβολή του στην πραγματοποίηση της πτυχιακής εργασίας.

Ελένη Πάσχου, ιατρό και Νίκη Πιππίδου, ιατρό για την πολύτιμη βοήθειά τους σε θέματα εργαστηρίου αλλά και την άφογη συνεργασία καθ' όλη την διάρκεια της πτυχιακής εργασίας.

Ζερδελή Αησιόλαο, φοιτητή Ιατρικής, για τις πολύτιμες γνώσεις του και την άφογη συνεργασία καθ' όλη την διάρκεια της πτυχιακής εργασίας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αναλγητικά οπιοειδή αποτελούν την πλέον αποτελεσματική θεραπεία για την αντιμετώπιση του πόνου. Υπάρχουν αρκετές κατηγορίες οπιοειδών τόσο ενδογενών όσο και εξωγενώς χορηγούμενων συνθετικών αλλά και φυσικών ουσιών. Ωστόσο, όλες οι κατηγορίες οπιοειδών αλληλεπιδρούν με ειδικούς οπιοειδικούς υποδοχείς των οποίων οι τρεις κύριες κατηγορίες είναι οι μ, κ και δ.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως η νευρωνική πλαστικότητα που σχετίζεται με την ανάπτυξη ανοχής στα οπιοειδή ενεργοποιεί ένα νευρωνικό μηχανισμό ο οποίος επενεργεί αρνητικά στα αναλγητικά αποτελέσματα των οπιοειδών. Σαν συνέπεια αυτού, η χορήγηση οπιοειδών μπορεί να οδηγήσει σε δυο φαινομενικά άσχετες κυτταρικές διαδικασίες: την ανάπτυξη ανοχής και την επαγόμενη από τα οπιοειδή υπεραλγησία. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιώντας την ιστοχημική ανάλυση του GABA, εξετάσαμε την επίδραση του οπιοειδούς φεντανύλη στον ιππόκαμπο επίμυων.

Το GABA θεωρείται ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής του ιπποκάμπου και εκλύεται από τους ενδονευρώνες οι οποίοι αποτελούν το 10-20% του συνόλου των νευρώνων του ιπποκάμπου. Ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση οπιοειδών αναστέλλει την απελευθέρωση GABA από τους ενδονευρώνες του ιπποκάμπου με τελικό αποτέλεσμα την αυξημένη δραστηριότητα των πυραμιδικών νευρώνων.

Για την μελέτη της επίδρασης της φεντανύλης, χορηγήθηκε σε πειραματόζωα φυσιολογικός ορός (μάρτυρες) ή φεντανύλη (480 μg/kg, υποδόρια ανά χρονικά διαστήματα των 15-20 λεπτών). 12, 24 και 48 ώρες μετά την χορήγηση της τελευταίας δόσης, συλλέχθηκαν οι εγκεφαλοι των πειραματοζώων και με την χρήση κρουτόμου προετοιμάσθηκαν τομές των

εγκεφάλων οι οποίες περιελάμβαναν την περιοχή του ιπποκάμπου. Επακολούθησε ανοσοϊστοχημική μελέτη με χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων κατά του GABA με σκοπό τον εντοπισμό του στα νευρικά κύτταρα του ιπποκάμπου και την μελέτη της πιθανής επίδρασης της φεντανύλης στα επίπεδα έκφρασής του.



# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## ΠΟΝΟΣ

Αν και η έννοια του πόνου είναι γνωστή στον καθένα, εν τούτοις, το τι ακριβώς είναι ο πόνος είναι δύσκολο να καθοριστεί, κι αυτό γιατί ο πόνος αποτελεί ουσιαστικά μια προσωπική εμπειρία και όχι ένα απλό κύκλωμα «ερεθίσματος-απάντησης».

Ο πόνος είναι το δυσάρεστο εκείνο αίσθημα, το οποίο προκύπτει σε περίπτωση βλαπτικών ερεθισμάτων από το περιβάλλον ή από το ίδιο το σώμα μας και αποτελεί πολύτιμο σήμα που καθοδηγεί την συμπεριφορά μας έτσι ώστε να αποφεύγουμε την βλάβη (Μόντη, 2001).

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, 1998). Όπως και να ορίσουμε την λέξη πόνος, δεν αλλάζει το γεγονός πως αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της ζωής μας καθορίζοντας την ποιότητα διαβίωσής μας και γι' αυτό το λόγο καθίσταται σημαντική η μελέτη του.

### Κατηγορίες πόνου

Κλινικά ο πόνος μπορεί να διαιρεθεί σε δύο κατηγορίες: τον οξύ πόνο και τον χρόνιο πόνο.

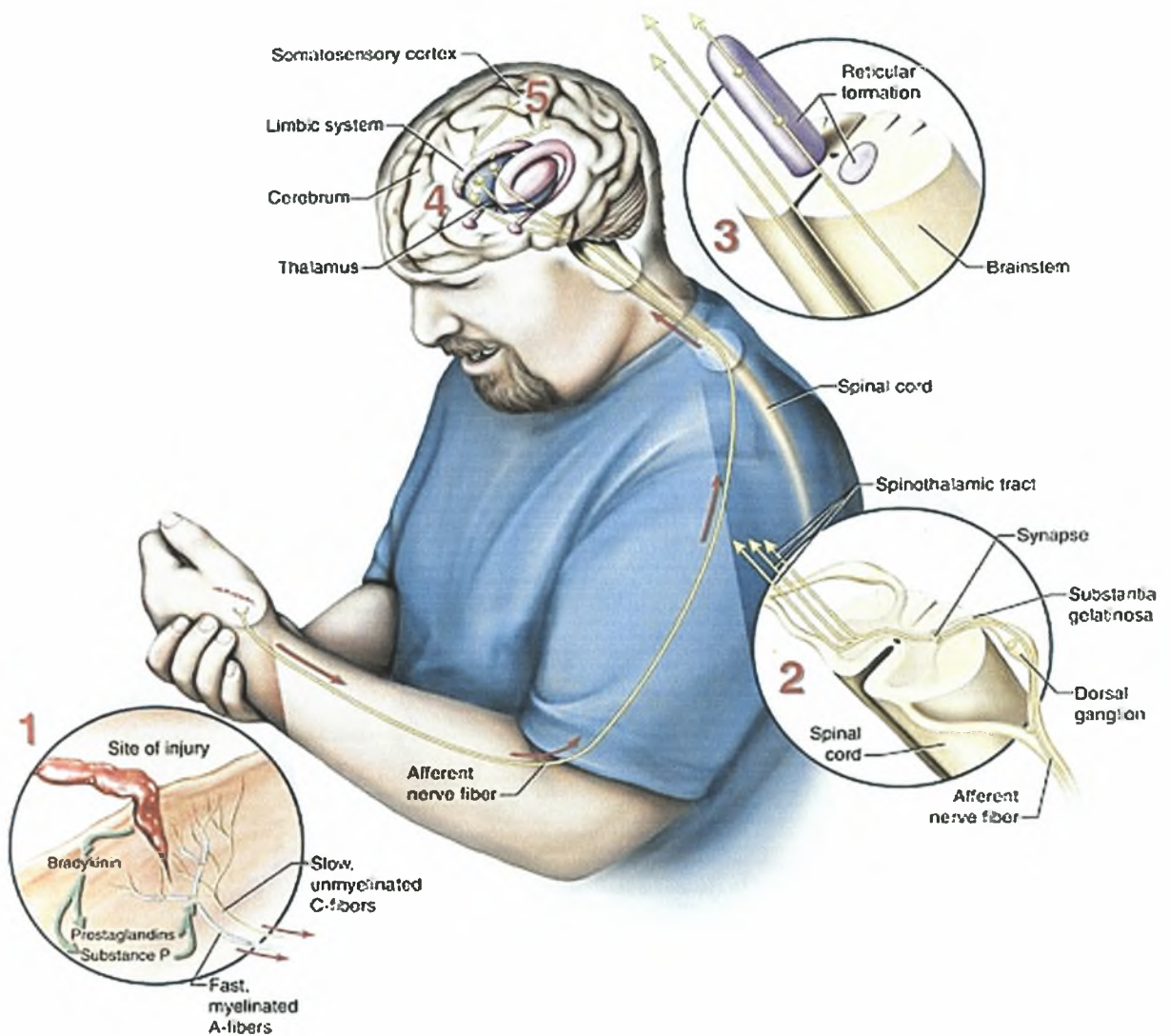
- Ο οξύς πόνος οφείλεται κυρίως σε αλγασθησία (αίσθηση άλγους), είναι βραχυχρόνιος, παραμένει μόνο για το διάστημα κατά το οποίο υφίσταται ιστική βλάβη και αντιπροσωπεύει μια φυσιολογική

αμυντική αντίδραση του οργανισμού. Διακρίνεται σε επιφανειακό, εν τω βάθει σωματικό και σπλαχνικό. Ο επιφανειακός άγεται από το δέρμα, τους υποδόριους ιστούς και τους βλεννογόνους και είναι σαφής και εντοπισμένος. Ο εν τω βάθει σωματικός προέρχεται από τους μύς, τους τένοντες, τις αρθρώσεις ή τα οστά και είναι λιγότερο εντοπισμένος. Ο σπλαχνικός πόνος είναι βύθιος, διάχυτος, μη σαφώς εντοπισμένος και άγεται από τα σπλάχνα μέσω του αυτόνομου νευρικού συστήματος.

- Ο χρόνιος πόνος επιμένει πέρα από τη συνήθη διαδρομή μιας οξείας νόσου ή μετά από ένα εύλογο, για την επούλωση χρονικό διάστημα, το οποίο ποικίλλει από 1 έως 6 μήνες. Ένα χαρακτηριστικό του είναι ότι ψυχολογικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες συχνά παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωσή του.

### Υποδοχείς και διαβίβαση του πόνου

Ο πόνος ανιχνεύεται από ειδικούς υποδοχείς, τους αλγοϋποδοχείς και δεν αποτελεί συνέπεια υπερδιέγερσης άλλων τύπων υποδοχέων. Οι αλγοϋποδοχείς είναι ελεύθερες νευρικές απολήξεις που εντοπίζονται σε όλο το σώμα περιλαμβάνοντας το δέρμα, τους μύες, τις αρθρώσεις, τα οστά και τα κοιλιακά σπλάχνα. Αναγνωρίζουν βλαπτικά ερεθίσματα και μετατρέπουν τη μηχανική, χημική και θερμική ενέργεια στο σημείο της διέγερσης σε νευρικές ώσεις. Οι αλγοϋποδοχείς είναι ευαίσθητοι σε μηχανικά ερεθίσματα, σε ακραίες θερμοκρασίες ( $>42^{\circ}\text{C}$  και  $<18^{\circ}\text{C}$ ) και χημικές ουσίες που σε αυτές περιλαμβάνονται η βραδυκίνη, η ισταμίνη, η σεροτονίνη, ιόντα  $\text{K}^+$  και  $\text{H}^+$ , προσταγλανδίνες και το ATP.

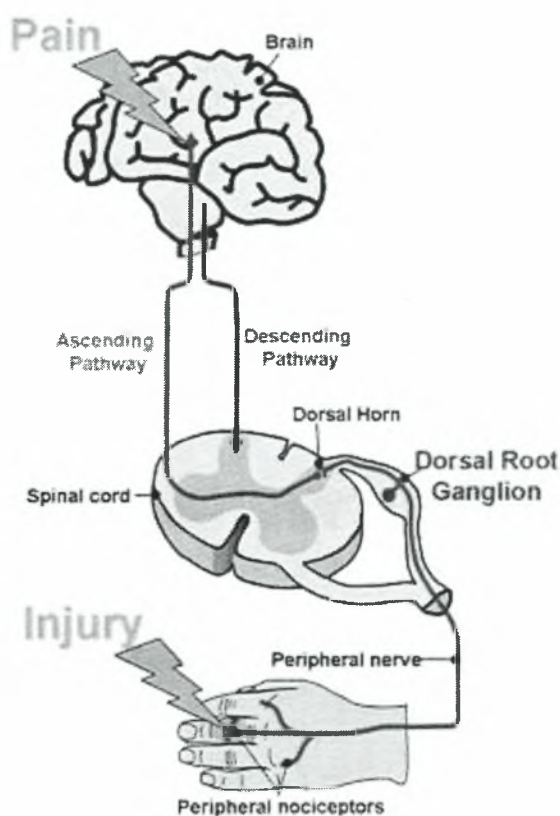


Εικόνα 1. Μονοπάτι διαβίβασης του πόνου

([http://wildiris3.securesites.netcms\\_prodfiles/course91pain-pathways.jpg](http://wildiris3.securesites.netcms_prodfiles/course91pain-pathways.jpg))

Υπεύθυνες για την μετάδοση του πόνου είναι οι μικρές ίνες που χαρακτηρίζονται ως Αδ και C (Φασουλάκη 2005). Οι Αδ είναι μεγάλης διαμέτρου, εμμυελες ίνες, διεγείρονται από ερεθίσματα μικρής έντασης και μεταφέρουν το ερέθισμα με μεγάλη ταχύτητα (5-25m/sec). Μεταφέρουν τον οξύ πόνο και διεγείρονται κυρίως από μηχανικά ερεθίσματα. Οι C ίνες είναι μικρής διαμέτρου, αμύελες, διεγείρονται με ερεθίσματα μεγάλης έντασης και

μεταφέρουν το ερέθισμα με μικρή ταχύτητα (<2m/sec). Μεταφέρουν τον βύθιο και αμβλύ πόνο και διεγείρονται από ουσίες που παράγονται κατά την καταστροφή των ιστών (Γκιάλα, 1998).



Εικόνα 2. Νευροδιαβίβαση του πόνου

([http://www.icaaen.commediaimagesrd\\_pain2.jpg](http://www.icaaen.commediaimagesrd_pain2.jpg))

Οι οδοί του πόνου είναι οργανωμένες σε τρία επίπεδα. Οι πρώτης τάξης αισθητικοί νευρώνες έχουν σώματα στα γάγγλια των οπισθίων ριζών, περιφερικούς άξονες που προσλαμβάνουν πληροφορίες από τα διάφορα όργανα και κεντρικούς άξονες που προβάλλουν στα οπίσθια κέρατα του νωτιαίου μυελού (Φασουλάκη, 2005). Εντός του οπισθίου κέρατος, εκτός από τις συνάψεις με τους νευρώνες δευτέρας τάξης, οι άξονες των νευρώνων πρώτης τάξης είναι δυνατόν να συναφθούν με διάμεσους νευρώνες, συμπαθητικούς νευρώνες και κινητικούς νευρώνες του προσθίου κέρατος

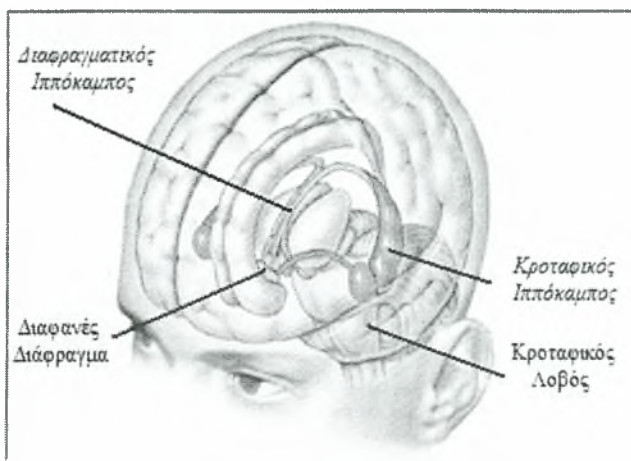
(Morgan 2000). Εκεί δημιουργούνται τα νωτιαία αντανακλαστικά, αλλά δεν γίνεται ενσυνείδητη αντίληψη του πόνου. Στις συνάψεις μεταξύ των πρώτης και δεύτερης τάξης αισθητικών νεύρων, δρουν ως νευροδιαβιβαστές, διεγερτικά αμινοξέα, όπως το γλουταμικό οξύ, και νευροκινίνες, όπως η ωσία Ρ.

Τα δεδομένα που προσλαμβάνουν οι αισθητικοί νευρώνες δευτέρας τάξεως, αφού τροποποιηθούν από νωτιαίες και υπερνωτιαίες επιρροές, αναμεταδίδονται στα ανώτερα κέντρα με την μορφή ενός «πακέτου» πληροφόρησης για το αλγογόνο ερέθισμα. Από το οπίσθιο κέρας του νωτιαίου μυελού, οι δεύτερης τάξης ανιόντες αισθητικοί νευρώνες, αφού χιαστούν, μεταδίδουν τα σήματα του πόνου στο θάλαμο και από εκεί με τη σειρά τους οι τρίτης τάξης αισθητικοί νευρώνες προβάλλουν στο φλοιό ή σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου (Φασουλάκη, 2005), όπως είναι το μεταιχμιακό σύστημα (limbic system), όπου συντονίζονται οι συναισθηματικές παράμετροι του άλγους. Ο ιππόκαμπος μαζί με την αμυγδαλή αποτελούν τμήματα του μεταιχμιακού συστήματος.

## ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΣ

Ο ιππόκαμπος είναι δομή του εγκεφάλου η οποία ανήκει στο μεταιχμιακό σύστημα. Η δομή πήρε το όνομά της το δέκατο έκτο αιώνα από τον ανατόμο Julius Caesar Arnaizi, ως αναφορά στον θαλάσσιο ιππόκαμπο, με τον οποίο προσομοιάζει σε μετωπιαία διατομή. Από τη δεκαετία του 1950 και μετά, με αφορμή δημοσίευση αναφορικά με το περιστατικό του ασθενούς Η.Μ ο οποίος υποβλήθηκε σε εγχείρηση αφαίρεσης του ιπποκάμπειου σχηματισμού και των περιβαλλόντων ιστών (Scoville and Milner, 1957), αναγνωρίστηκε ο σημαντικός του ρόλος στη μνήμη και τη μάθηση. Η συμμετοχή του ιπποκάμπου

επίσης θεωρείται σημαντική στην πρόκληση επιληπτικών κρίσεων, στην εμφάνιση σχιζοφρένειας και της νόσου του Alzheimer.



Εικόνα 3. Η θέση του ιπποκάμπου στον ανθρώπινο εγκέφαλο

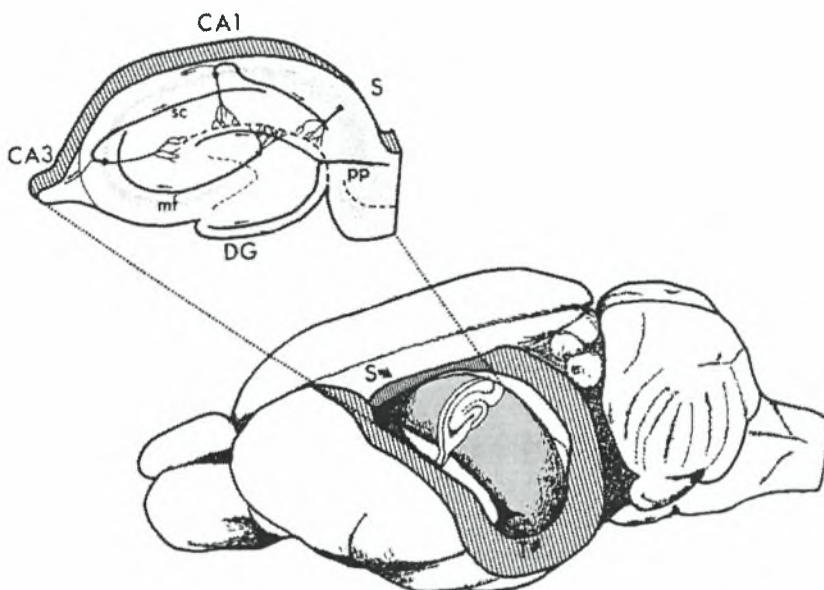
(<http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh27-2/IMAGES/Page191.gif>)

Το μεταιχμιακό σύστημα, μέρος του οποίου αποτελούν, όπως προαναφέρθηκε, η αμυγδαλή και ο ιππόκαμπος, αναφέρεται και ως «συναισθηματικός εγκέφαλος». Περιλαμβάνει μια σειρά δομών του εγκεφάλου που εμπλέκονται στη δημιουργία του συναισθήματος. Επιπλέον, επηρεάζει τη δημιουργία της μνήμης και της μάθησης συνδυάζοντας συναισθηματικές καταστάσεις με προϋπάρχουσες ή νεοσχηματιζόμενες μνημονικές παραστάσεις. Περιλαμβάνει πολλές διαφορετικές φλοιώδεις και υποφλοιώδεις εγκεφαλικές δομές, όπως η αμυγδαλή, η έλικα του προσαγωγίου, ο υποθάλαμος, η ψαλίδα, τα μαστία, ο επικλινής πυρήνας του διαφράγματος και ο ενδορρινικός φλοιός.

Ο ιππόκαμπος αποτελεί πιθανότατα την πιο μελετημένη δομή του εγκεφάλου καθώς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης. Μπορεί να είναι είτε σταθμός για τη μακροχρόνια μνήμη είτε

μεταβατική δομή επεξεργασίας της πληροφορίας προκειμένου η μνήμη να αποθηκευθεί κάπου αλλού στον εγκέφαλο (Kandel, 1997).

Παρότι βρίσκεται κάτω από τον εγκεφαλικό φλοιό, ο ιππόκαμπος δεν αποτελεί υποφλοιώδη δομή, αλλά είναι μια αναδίπλωση του φλοιού, πολύ λιγότερο αναπτυγμένη από το νεοφλοιό που τον περιβάλλει. Για το λόγο αυτό ονομάζεται αρχαιο- ή παλαιοφλοιός.

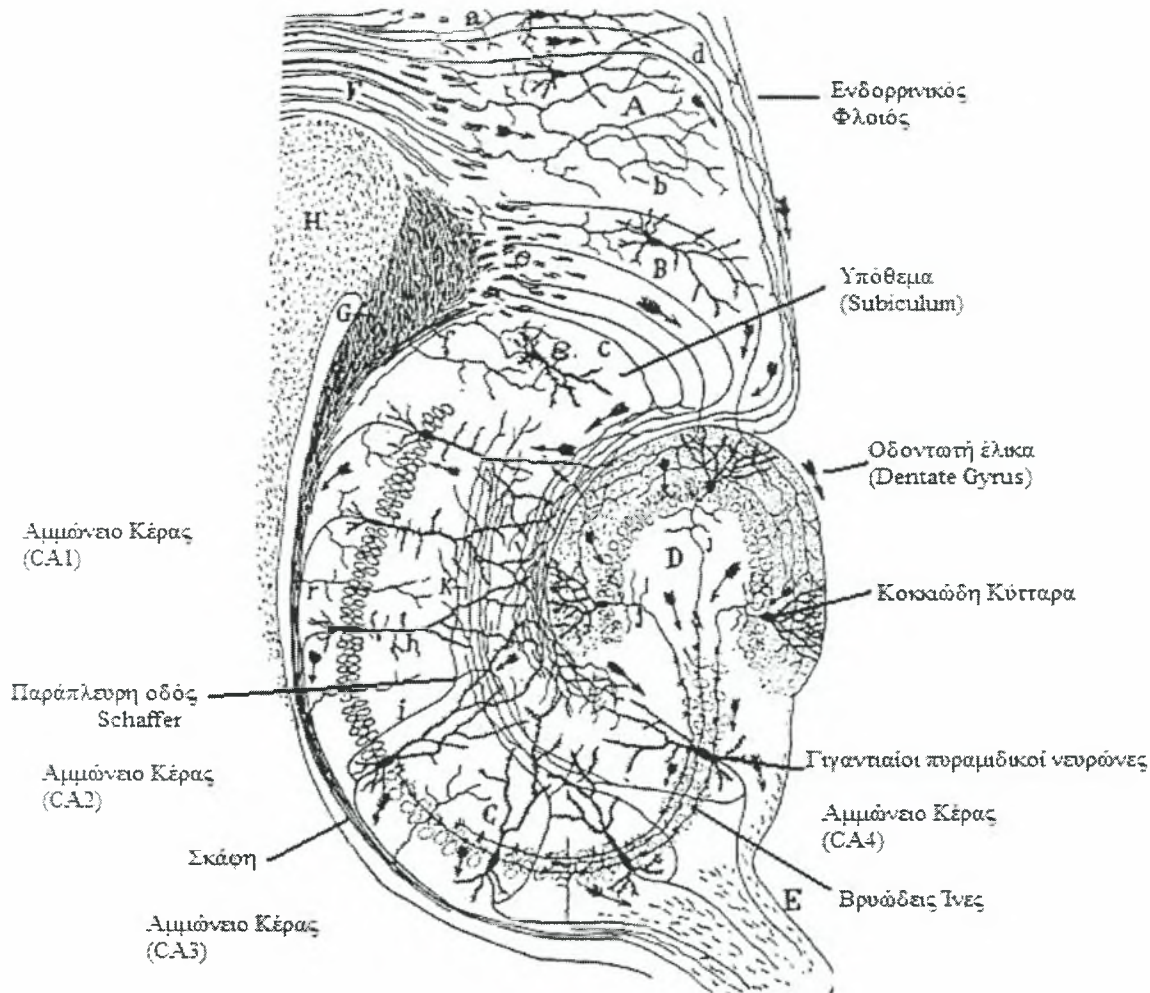


Εικόνα 4. Ο ιππόκαμπος στον εγκέφαλο του αρουραίου απεικονίζεται με έντονο χρώμα. Η κάθετη τομή κατά μήκος του άξονα του ραβδόμορφου σχηματισμού που αποτελεί τον αριστερό ιππόκαμπο αποκαλύπτει την οδοντωτή έλικα (DG) το αμμώνιο κέρας (CA) και το υπόθεμα (S) (Amaral et al., 1989).

### Ανατομία και ιστολογία του ιπποκάμπου

Μπορούμε να φανταστούμε το σχήμα του ιπποκάμπου ως δύο ραβδόμορφους σχηματισμούς οι οποίοι έχουν κυρτωθεί σε σχήμα C και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν μαζί έτσι ώστε στο ένα τους άκρο να έρχονται σε επαφή και στη συνέχεια να απομακρύνονται ο ένας από τον άλλο (Εικ.3).

Η δομή εκτείνεται από το διάφραγμα κοντά στη μέση γραμμή, πορεύεται κατά μήκος της οροφής της πλάγιας κοιλίας και, αφού κυρτωθεί, κατευθύνεται προς τα κάτω και έξω και καταλήγει στον κροταφικό λοβό. Στον άνθρωπο διακρίνεται σε οπίσθιο ή κροταφικό και πρόσθιο ή διαφραγματικό ιππόκαμπο.



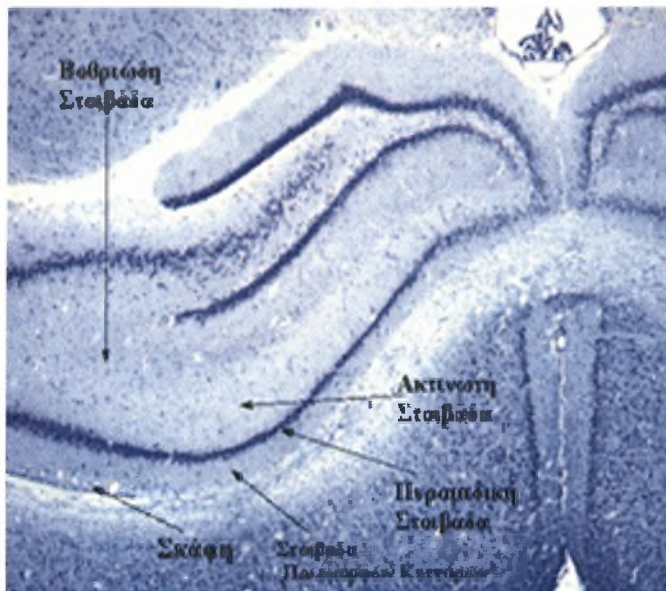
Εικόνα 5. Στοιχεία του ιπποκάμπειου σχηματισμού. Διακρίνονται: το υπόθεμα, μέρος του ενδοθωρακικού φλοιού, η οδοντωτή έλικα και οι περιοχές CA1-CA3. Επίσης, υποσημαίνονται τα κοκκιάδη κύτταρα της οδοντωτής έλικας, οι γιγαντιοί πυραμιδικοί νευρώνες του Αμμωνίου κέρατος, η σκάφη, και οι βρυώδεις ίνες και η παράπλευρη οδός του Schaffer (χειρόγραφο σχέδιο του Ramon y Cajal, 1911) (<http://www.pageoneuroplasticity.info/>).



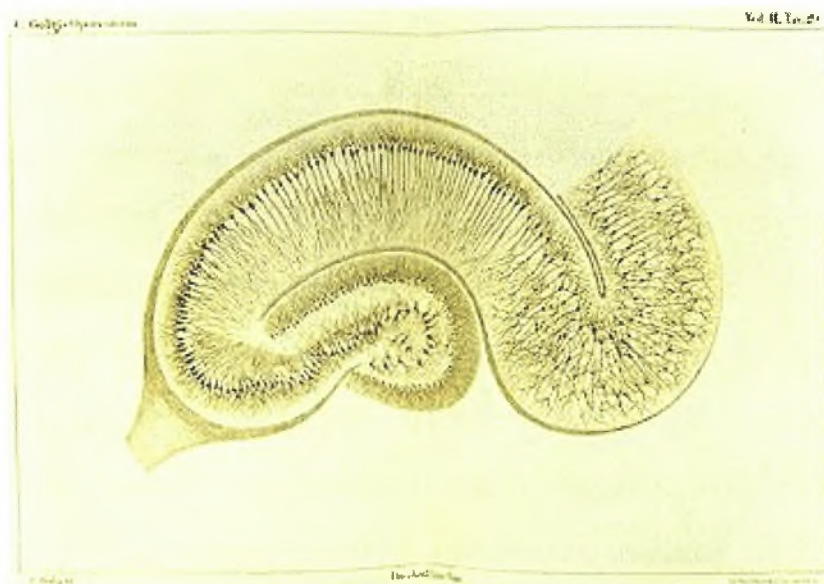
Η εσωτερική δομή του ιπποκάμπειου σχηματισμού, σε τομή κάθετη ως προς τον επιμήκη άξονα κάθε ενός από τους δύο ραβδόμορφους σχηματισμούς, διαφοροποιείται σε τρία μορφώματα: την οδοντωτή έλικα (Dentate Gyrgus), το Αμμώνειο κέρας (Cornu Ammonis) ή κυρίως ιππόκαμπο και το υπόθεμα (Subiculum) (Εικ.4 και 5).

Το Αμμώνειο κέρας διακρίνεται στις εξής στιβάδες:

- i. τη σκάφη, μία μικρού εύρους σπιβάδα που διατρέχεται κυρίως από εξερχόμενες αλλά και εισερχόμενες αξονικές ίνες, οι οποίες σχηματίζουν αρχικά την παρυφή και εν συνεχεία την ψαλίδα
- ii. τη σπιβάδα των πολύμορφων κυττάρων στην οποία βρίσκονται οι βασικοί δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων του ιπποκάμπου
- iii. την πυραμιδική σπιβάδα, που περιλαμβάνει τα κυτταρικά σώματα των πυραμιδοειδών νευρώνων, των κυρίως νευρώνων του Αμμωνείου κέρατος
- iv. την ακτινωτή σπιβάδα και τη βοθριώδη-μοριακή σπιβάδα, οι οποίες περικλείουν τμήματα κορυφαίων δενδριτών των πυραμιδοειδών κυττάρων (τους εγγύς και τους άπω κορυφαίους δενδρίτες, αντίστοιχα)



Εικόνα 6. Στιβαδωτή δομή εγκάρσιας τομής του ιπποκάμπεου σχηματισμού εμποτισμένη με τη χρώση Nissl. Λόγω της συγκεκριμένης μεθόδου χρώσεως διακρίνεται η πυραμιδική στιβάδα του Αμμωνείου κέρατος που περιέχει τα κυτταρικά σώματα των νευρώνων του ιπποκάμπεου (<http://www.synapses.mcg.edu/anatomy>).



Εικόνα 7. Πρόκειται για μία από τις πρώτες χρώσεις που έγιναν με νιτρικό άργυρο, από τον ίδιο τον C. Golgi το 1883. Φαίνονται τα πυραμδικά κύτταρα του Αμμωνείου κέρατος, τα κοκκιώδη της οδοντωτής έλικας και η αναφερόμενη ως περιοχή CA4.

([http://www.wjh.harvard.edu/~daddis/images/hippocampus\\_golgi.jpg](http://www.wjh.harvard.edu/~daddis/images/hippocampus_golgi.jpg))

Η πυραμιδική στιβάδα του Αμμωνείου κέρατος διακρίνεται σε τρεις επιμέρους υποπεριοχές, ξεκινώντας από τα όρια της οδοντωτής έλικας, στην πορεία προς το υπόθεμα: τις CA3, CA2, και CA1 κατά σειρά (Εικ.4).

Στην οδοντωτή έλικα διακρίνουμε τρεις στιβάδες νευρικών κυττάρων :

- i. την κοκκιώδη στιβάδα, η οποία περιέχει τα κύρια κύτταρα της οδοντωτής έλικας με σφαιρικό σώμα
- ii. τη μοριώδη στιβάδα όπου εκτείνονται οι δενδρίτες των κοκκιωδών κυττάρων
- iii. την πολύμορφη στιβάδα που περιέχει κύτταρα ποικίλης μορφολογίας τα οποία συνάπτονται μόνο τοπικά

Παρά το γεγονός ότι η οδοντωτή έλικα περιλαμβάνεται στις δομές του ιπποκάμπου, η κυτταροαρχιτεκτονική της διαφέρει από αυτή του κυρίως ιπποκάμπου. Κάποιες φορές, στην πύλη της οδοντωτής έλικας, στην περιοχή που βρίσκεται μέσα στον ημικυκλικό σχηματισμό που δημιουργούν τα κύτταρα της κοκκώδους στιβάδας, αναφέρεται η περιοχή CA4. Στην περιοχή αυτή, η πυκνά δομημένη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων του Αμμωνείου κέρατος, των περιοχών CA1-3 αρχίζει να αποδομείται και τα πυραμιδικά κύτταρα εντοπίζονται εδώ αραιά διασπαρμένα.

Σε όλες τις στιβάδες του ιπποκάμπου βρίσκονται ανασταλτικοί νευρώνες, οι ενδονευρώνες (ή διάμεσοι νευρώνες), οι οποίοι εκλύουν GABA. Αποτελούν το 10-20% των νευρώνων του ιπποκάμπου και αναστέλλουν τα πυραμιδικά κύτταρα σχηματίζοντας GABAεργικές συνάψεις σε διαφορετικά τμήματα του μετασυναπτικού νευρώνα. Πράγματι, οι ενδονευρώνες είναι μια ετερογενής ομάδα νευρώνων κάποιοι από τους οποίους σχηματίζουν ανασταλτικές συνάψεις στα σώματα των πυραμιδικών νευρώνων ή στο αρχικό τμήμα του νευράξονα, ενώ άλλοι συνάπτονται στους δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων (Snoboda et al., 1999).

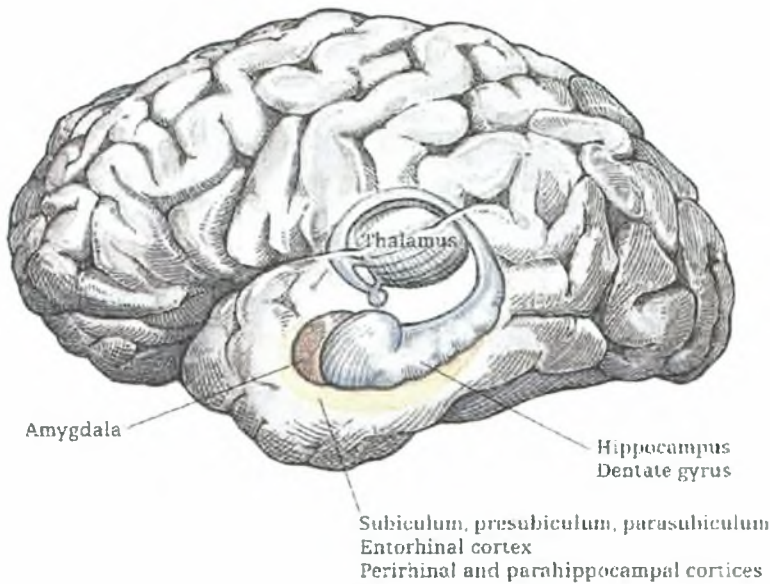
Οι ενδονευρώνες του ιπποκάμπου διακρίνονται σε υποομάδες ανάλογα με την εντόπισή τους και τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Στο Αμμώνειο κέρας απαντώνται έξι διαφορετικές υποκατηγορίες ενδονευρώνων, με σημαντικότερα:

- i. τα καλαθοειδή κύτταρα, τα οποία εντοπίζονται στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων και σχηματίζουν με αυτά πολλαπλές συνάψεις
- ii. τα αξο-αξονικά κύτταρα, τα οποία βρίσκονται στα όρια της πυραμιδικής στιβάδας και συνάπτονται με το αρχικό τμήμα του νευράξονα των πυραμιδικών κυττάρων
- iii. τα διστιβαδωτά κύτταρα, των οποίων τα σώματα βρίσκονται τόσο μέσα στη στιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων όσο και έξω από αυτή και νευρώνουν κορυφαίους και βασικούς δενδρίτες των στιβάδων αυτών

Σε ό,τι αφορά την οδοντωτή έλικα υπάρχουν:

- i. τα καλαθοφόρα κύτταρα, των οποίων τα κυτταρικά σώματα εντοπίζονται στο όριο μεταξύ της κοκκώδους και της στιβάδας πολύμορφων κυττάρων και σχηματίζουν συνάψεις με τα κοκκώδη κύτταρα
- ii. τα αξο-αξονικά κύτταρα, τα οποία εντοπίζονται στη στιβάδα των πολύμορφων κυττάρων και συνάπτονται στη ζώνη έκφυσης των αξόνων των κοκκωδών κυττάρων (Freund et al., 1996).

Αξίζει να αναφερθεί ότι στον ιπποκάμπειο σχηματισμό θεωρείται ότι ανήκουν και άμεσα γειτονικές δομές όπως ο ενδορρινικός φλοιός, ο περιρρινικός φλοιός, η παραίπποκάμπεια έλικα, το προϋπόθεμα και το παραϋπόθεμα.(Εικ. 5 και Εικ. 8)



Εικόνα 8. Μία άλλη άποψη της ανατομίας του ιπποκάμπου, όπου φαίνονται εκτός από τις δομές του ιπποκάμπου και ο θάλαμος και η αμυγδαλή. Οι δομές του ιπποκάμπου που αναφέρονται είναι η οδοντωτή έλικα (dentate gyrus), το υπόθεμα (subiculum), το προϋπόθεμα (presubiculum), το παραϋπόθεμα (parasubiculum), ο ενδορρινικός φλοιός (entorhinal cortex), περιρρινικός φλοιός (perirhinal cortex) και η παραίπποκάμπεια έλικα (parahippocampal cortex).

(<http://www.cognitiveneurosciencearena.com/brain-scans/dehaan05.asp>)

## Ρόλος του ιπποκάμπου

- *Ιππόκαμπος και μνήμη*

Ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές στον ιππόκαμπο θηλαστικών έχουν δείξει ότι αυτός δέχεται οπτικές, ακουστικές, απτικές, σπλαχνικές και λίγες μόνο οσφρητικές διεγέρσεις. Είναι συντονιστικό όργανο που επηρεάζει την ορμονική, σπλαχνική και συναισθηματική κατάσταση μέσω των συνδέσεών του

με τον υποθάλαμο, τους πυρήνες του διαφράγματος και την υπερμεσολόβια έλικα. Όπως προαναφέρθηκε, μια από τις κύριες φυσιολογικές λειτουργίες του ιπποκάμπου είναι οι διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης.

Η μνήμη διαιρείται στην έκδηλη μνήμη και στην άδηλη μνήμη. Για να ορίσουμε την έννοια έκδηλη μνήμη μπορούμε να πούμε πως με αυτή μαθαίνουμε τι είναι ο κόσμος, αποκτώντας γνώσεις για πρόσωπα, θέσεις και πράγματα οι οποίες είναι προσιτές στη συνείδηση. Χρησιμοποιώντας την άδηλη μνήμη μαθαίνουμε πώς να εκτελούμε πράξεις, αποκτώντας κινητικές ή αντιληπτικές ικανότητες που ωστόσο είναι απρόσιτες στη συνείδηση. Βλάβες στον ιπποκάμπειο σχηματισμό έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια της έκδηλης μνήμης. Ο ιππόκαμπος, δηλαδή, θεωρείται η δομή η οποία είναι υπεύθυνη για τη συνειδητή μάθηση, αλλά δε σχετίζεται με την άδηλη μνήμη (Kandel et al., 1997).

Η απόπειρα θεραπείας της επιληψίας με αμφοτερόπλευρη αφαίρεση του ιπποκάμπου στον άνθρωπο (Scoville and Milner, 1957) είχε ως αποτέλεσμα σημαντική διαταραχή της μνημονικής λειτουργίας: οι παλιές μνήμες παρέμειναν ενώ οι πρόσφατες παραστάσεις διατηρούνταν μόνο για λίγα λεπτά. Παρομοίως, σε μελέτες που έγιναν σε ασθενείς με βλάβες στον ιπποκάμπειο σχηματισμό, δεν παρατηρούνταν προβλήματα όταν η ανάκληση της μνήμης γινόταν με μικρή καθυστέρηση από την καταγραφή της, ενώ, όταν η ανάκληση της μνήμης γινόταν με μεγάλη καθυστέρηση από το χρόνο της καταγραφής της, εμφανίζονταν απώλεια μνήμης, όπως και αδυναμία προσανατολισμού στο χώρο (Milner 1972, Nicholls et al., 1992, Scoville, 1954). Σε σχετικές μελέτες που έγιναν σε αρουραίους παρατηρήθηκε πως τραυματισμός του ιπποκάμπου είχε σαν αποτέλεσμα απώλεια της χωριακής μνήμης, με ταυτόχρονη μείωση του αριθμού των νευρώνων και παρουσία ευρημάτων τα οποία παρέπεμπαν σε σκλήρυνση του ιπποκάμπου (Kotloski et al., 2002).

Ο ιππόκαμπος πιθανολογείται ότι είναι παροδικός χώρος αποθήκευσης της μακρόχρονης μνήμης και ότι τελικά μεταβιβάζει τις πληροφορίες που αποκτήθηκαν σε άλλες περιοχές (πιθανώς στο φλοιό των ημισφαιρίων) για μόνιμη αποθήκευση. Για παράδειγμα, οι αισθητικές πληροφορίες που είναι απαραίτητες για την αναγνώριση ενός προσώπου αρχικά υφίστανται επεξεργασία στον κάτω κροταφικό λοβό (η οπτική περιοχή του φλοιού που έχει σχέση με την αναγνώριση προσώπων). Παράλληλα, οι οπτικές αυτές πληροφορίες μεταβιβάζονται και στον ενδορρινικό φλοιό, από τον οποίο εκπορεύεται η κύρια προσαγωγός οδός του ιπποκάμπου, η διατιτραίνουσα οδός. Πιστεύεται ότι τόσο ο κροταφικός λοβός όσο και ο ιππόκαμπος επεξεργάζονται αυτές τις πληροφορίες για περίοδο εβδομάδων ή μηνών και τελικά τις μεταβιβάζουν στο φλοιό, πιθανώς στην περιοχή του οπτικού φλοιού η οποία έχει σχέση με την αναγνώριση προσώπων. Εναλλακτικά, πιθανολογείται ότι ο ιππόκαμπος δε συγκρατεί καθόλου πληροφορίες, παρά μόνο διευκολύνει την αποθήκευση των πληροφοριών οι οποίες υπέστησαν αρχικά επεξεργασία από τον κάτω κροταφικό λοβό (Kandel et al., 1997).

- *Ιππόκαμπος και πόνος*

Έχει προταθεί ότι ο ιππόκαμπος συμμετέχει στην ανάπτυξη μνήμης σχετιζόμενης με τον πόνο και στη δημιουργία μάθησης αποφυγής. Υπάρχουν μελέτες που υποδεικνύουν 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. Αναφέρθηκε ότι περιφερικός επώδυνος ερεθισμός αυξάνει τα διεγερτικά μετασυναπτικά δυναμικά (EPSPs) των πυραμιδικών νευρώνων της CA1 περιοχής. Ακόμη, περιφερική ή ιστική ή νευρική βλάβη επιφέρει αύξηση των

επιπέδων του γονιδιακού προϊόντος *Egr1* στους νευρώνες της CA1 περιοχής. Σύμφωνα με τους Ceccarelli και συν. (1999), εφαρμογή συνεχούς επώδυνου ερεθίσματος (υποδόρια χορήγηση φορμαλίνης) προκαλεί 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 υποδόρια ένεση φορμαλίνης, επιφέρει μείωση της αίσθησης του πόνου (McKenna & Melzack, 1992).

## ΟΠΙΟΕΙΔΗ

### Οπιοειδή φάρμακα

Τα οπιοειδή φάρμακα χρησιμοποιούνται ως αναλγητικά για την αντιμετώπιση του οξέος και χρόνιου πόνου και αποτελούν μέρος της περιεγχειρητικής αγωγής. Οι στόχοι όπου δρουν τα οπιοειδή είναι οι οπιοειδικοί υποδοχείς. Υπάρχουν ενδογενή μόρια που συνδέονται στους οπιοειδικούς υποδοχείς, τα λεγόμενα ενδογενή οπιοειδή πεπτίδια. Αυτά προέρχονται από τα πρόδρομα της προοπιομελανοκορτίνης (βενδορφίνες), της προεγκεφαλίνης (εγκεφαλίνες) και της προδυνορφίνης (δυνορφίνες και νεοδνορφίνες, Cesselin, 2002). Τα φάρμακα αυτά αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς τους, είτε σαν αγωνιστές, είτε σαν ανταγωνιστές. Στα οπιοειδή συμπεριλαμβάνονται η μορφίνη, η υδροχλωρική ηρωίνη, η ετορφίνη, η φωσφορική κωδεΐνη, το συμπυκνωμένο όπιο, η υδροχλωρική μεθαδόνη και η φεντανύλη.

Τα οπιοειδή, εκτός από την αναλγητική δράση τους, χαρακτηρίζονται και από άλλες δράσεις στο ΚΝΣ, οι οποίες δεν είναι όλες ευεργετικές (Nicolli και



συν., 1980; Madison & Nicoll, 1998). Για παράδειγμα, τα οπιοειδή προκαλούν ευφορία συνοδευόμενη από ένα γενικό αίσθημα γαλήνης και ικανοποίησης, το οποίο εξηγεί την παράνομη χρήση τέτοιων φαρμάκων από 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 τον πόνο. Τα οπιοειδή χορηγούνται συστηματικά (per os, ενδομυικά, ή υποδόρια) ή απ'ευθείας εντός του νωτιαίου μυελού (ενδοραχιαία). Συνήθως δίδεται μια δόση εφόδω, ακολουθούμενη από δόσεις συντήρησης, για τη εξασφάλιση σταθερών συγκεντρώσεων στο πλάσμα.

### Οπιοειδικοί υποδοχείς

Έχουν ταυτοποιηθεί τρεις κύριες κατηγορίες οπιοειδικών υποδοχέων: οι  $\mu$ ,  $\kappa$  και  $\delta$  υποδοχείς (ή αντίστοιχα MOR, KOR και DOR). Οι παραπάνω υποδοχείς με μελέτες δέσμευσης εκλεκτικών ραδιοαναλόγων, διακρίνονται περαιτέρω στους υπότυπους:  $\mu_1$  και  $\mu_2$ ,  $\delta_1$  και  $\delta_2$  και  $\kappa_{1-4}$ . Η ύπαρξη τριών μόνο γονιδίων οπιοειδικών υποδοχέων υποδηλώνει ότι οι υπότυποι προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα του mRNA ή διμερισμό των πρωτεϊνών του υποδοχέα.

Οι οπιοειδικοί υποδοχείς ανήκουν στους μεταβοτρόπους υποδοχείς και είναι συζευγμένοι με  $G$  πρωτεΐνες. Ενεργοποιούν τις  $G_i/o$  πρωτεΐνες και προκαλούν αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης, με αποτέλεσμα την ελάττωση των επιπέδων του κυκλικού AMP. Επιπρόσθετα, η ενεργοποίηση των υποδοχέων προκαλεί διαμέσου της  $\beta\gamma$  υπομονάδας των  $G$  πρωτεϊνών, το άνοιγμα διαύλων καλίου και το κλείσιμο διαύλων ασβεστίου. Η αύξηση της αγωγιμότητας για το κάλιο και η μείωση για το ασβέστιο οδηγεί σε μείωση της διεγερσιμότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Επιπλέον, ένας αριθμός

δεύτερων αγγελιοφόρων έχει συσχετιστεί με την ενεργοποίηση των οπιοειδικών υποδοχέων με την μεσολάβηση της βγ υπομονάδας των G πρωτεϊνών. Αυτοί περιλαμβάνουν την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), τη φωσφολιπάση C, την κινάση των υποδοχέων που σχετίζονται με τις G πρωτεΐνες, τη δυναμίνη 1 και τη MAP κινάση (MAPK) (Cesselin, 2002).

Μετά από συνεχή διέγερση του υποδοχέα λαμβάνει χώρα φωσφορυλίωση στο καρβοξυτελικό άκρο ή/και στην τρίτη ενδοκυττάρια αγκύλη αυτού. Η φωσφορυλίωση μπορεί να γίνει από την PKC, την ασβεστιο-καλμοδουλίνη εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση, τη GRK ή τη MAPK. Η φωσφορυλίωση συμβάλλει στη λειτουργική απευαισθητοποίηση του υποδοχέα εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση του με τις G πρωτεΐνες. Επιπλέον, αποτελεί έναυσμα για την ενδοκύττωση του υποδοχέα σε κυστίδια καλυπτόμενα με κλαθρίνη, η οποία γίνεται με την μεσολάβηση πρωτεϊνών που καλούνται αρρεστίνες. Από την στιγμή που ο υποδοχέας ενδοκυττωθεί, είτε ανακυκλώνεται και επιστρέφει στην επιφάνεια του κυττάρου, είτε οδηγείται προς τρωτεόλυση στο σύμπλεγμα ουβικούϊίνης-πρωτεασώματος.

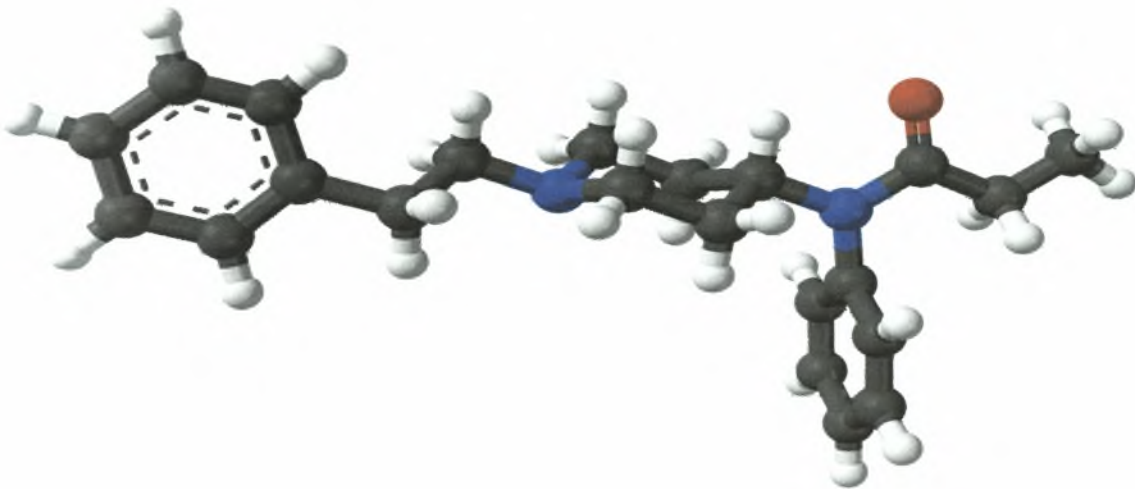
Στον ιππόκαμπο οπιοειδικοί υποδοχείς υπάρχουν σχεδόν αποκλειστικά στους GABAεργικούς ενδονευρώνες (Drake και συν. 1999). Όπως προαναφέρθηκε οι ενδονευρώνες του ιππόκαμπου αποτελούν το 10-20% των κυττάρων αυτού και αναστέλλουν τα πυραμιδικά κύτταρα του ιππόκαμπου σχηματίζοντας ανασταλτικές GABAεργικές συνάψεις σε διαφορετικά τμήματα της μετασυναπτικής μεμβράνης. Είναι μια ετερογενής ομάδα κυττάρων, καθώς 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).

Στον ιππόκαμπο απαντώνται οπιοειδικοί υποδοχείς και των τριών τύπων μ, δ και κ (Drake και συν., 1999, Commons και συν., 1998, Katalin

Halasy και συν., 2000). Η ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της δραστηριότητας των ενδονευρώνων με συνέπεια την άρση της αναστολής που προκαλούν οι ενδονευρώνες στα πυραμιδικά κύτταρα του ιππόκαμπου. Το τελικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των οπιοειδικών υποδοχέων στον ιππόκαμπο είναι η αύξηση της δραστηριότητας των πυραμιδικών νευρώνων (Svoboda και συν., 1999).

### Φεντανύλη

Στην κατηγορία των οπιοειδών ανήκει και η φεντανύλη η οποία αποτελεί αντικείμενο της παρούσας εργασίας. Η φεντανύλη είναι ένα συνθετικό οπιοειδές αναλγητικό-αγωνιστής των μ-οπιοειδικών υποδοχέων, 80 φορές ισχυρότερο από την μορφίνη. Χαρακτηρίζεται από ταχεία έναρξη και βραχεία διάρκεια δράσης και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται στη διεγχειρητική αναισθησία. Είναι πολύ δραστική ουσία 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 φεντανύλης (<http://en.wikipedia.org/wiki/Fentanyl>).



Εικόνα 9 . Δομή φεντανύλης

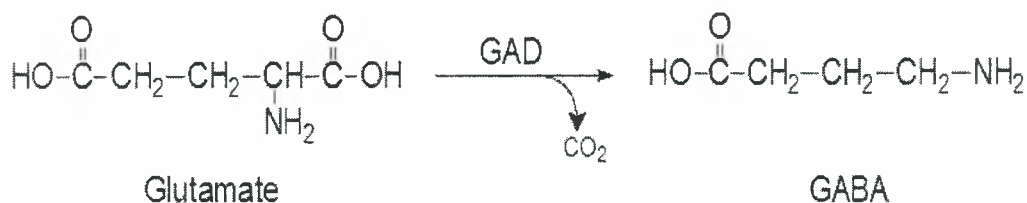
Η φεντανύλη στον άνθρωπο μεταβολίζεται κυρίως μέσω του ενζυμικού συστήματος CYP450 3A4. Παρόλα αυτά δεν παρατηρήθηκε καμία *in vivo* αναστολή από την ιτρακοναζόλη (ουσία-αναστολέας του ενζυμικού συστήματος CYP450 3A4), πολύ πιθανό λόγω του υψηλού ρυθμού ηπατικής κάθαρσης της φεντανύλης. Η φεντανύλη δεν δρα μόνο στους μ υποδοχείς, αλλά και στους δ και κ υποδοχείς, αν και η δέσμευση της στους μ είναι 100 φορές πιο ισχυρή απ'ότι στους κ και δ υποδοχείς.

Η φεντανύλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί:

- Ως ναρκωτικό αναλγητικό συμπλήρωμα σε γενική ή τοπική αναισθησία
- Με παράλληλη χορήγηση ενός νευροληπτικού, όπως η δροπεριδόλη, σαν προαναισθητικός παράγοντας για την εισαγωγή στην αναισθησία και σαν συμπλήρωμα για την διατήρηση της γενικής και τοπικής αναισθησίας
- Ως αναισθητικός παράγοντας με οξυγόνο σε ασθενείς υψηλού κινδύνου που πρόκειται να υποστούν μεγάλη χειρουργική επέμβαση.

## γ-ΑΜΙΝΟΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ (GABA)

Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) είναι ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής του ιπποκάμπου, αλλά και ολόκληρου του κεντρικού νευρικού συστήματος. Μαζί με τη γλυκίνη ευθύνεται για την πλειονότητα της ανασταλτικής νευροδιαβίβασης στο ΚΝΣ. Το GABA συντίθεται από γλουταμικό οξύ με τη δράση του ενζύμου δεκαρβοξυλάση του γλουταμικού, εκλύεται από τους ενδονευρώνες (ανασταλτικοί νευρώνες στον ιππόκαμπο) και μεταβολίζεται από το ένζυμο GABA-τρανσαμινάση. Η σύνθεσή του συνδέεται με τον κύκλο του Krebs ενώ απαιτείται η παρουσία της βιταμίνης Β6 ως συνενζύμου. Με αυτό τον τρόπο ο κύριος διεγερτικός νευροδιαβιβαστής (γλουταμικό) μετατρέπεται στον κύριο ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή του ΚΝΣ (GABA). Φάρμακα που δρουν ως αγωνιστές των υποδοχέων του GABA ή αυξάνουν την συγκέντρωσή του στο ΚΝΣ έχουν αγχολυτική, κατασταλτική και αντισπασμωδική δράση.



Εικόνα 10. Βιοσύνθεση του GABA

Το GABA ασκεί τη δράση του συνδεδεμένο με υποδοχείς που βρίσκονται είτε στην προσυναπτική είτε στην μετασυναπτική κυτταρική μεμβράνη. Οι υποδοχείς του GABA διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> και GABA<sub>C</sub>. Στην περίπτωση του GABA<sub>A</sub>, οι υποδοχείς είναι διάλυτοι ιόντων χλωρίου και με τη σύνδεση του GABA επιτρέπουν την είσοδο αρνητικά

φορτισμένων ιόντων χλωρίου στο κύτταρο, προκαλώντας υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα να μειωθεί η πιθανότητα δημιουργίας δυναμικού ενέργειας (Foye και συν., 1995, Watling 1998, Kandel και συν., 2000).



Εικόνα 11. Υποδοχέας GABA

(<http://www.bio.ph.ic.ac.uk/~brickleyimagesGABA-receptor.jpg>)

Οι υποδοχείς  $GABA_C$ , όπως και οι υποδοχείς  $GABA_A$ , ανήκουν στην κατηγορία των ιοντοτρόπων υποδοχέων. Είναι πενταμερή συμπλέγματα διαμεμβρανικών υπομονάδων διατεταγμένα σε σχήμα δαχτυλιδιού, στο μέσο του οποίου δημιουργείται ένας πόρος. Με τη σύνδεση του νευροδιαβιβαστή επιτρέπεται η μεταφορά ιόντων διαμέσου του διαύλου που σχηματίζεται. Οι υποδοχείς  $GABA_B$  ανήκουν στην κατηγορία των μεταβοτρόπων υποδοχέων. Με τη μεσολάβηση  $G$  πρωτεϊνών και συστημάτων δεύτερων αγγελιοφόρων ανοίγουν δίαυλοι καλίου, θετικά φορτισμένα ιόντα καλίου εξέρχονται από το κύτταρο με αποτέλεσμα την υπερπόλωση της μεμβράνης.

Η χορήγηση οπιοειδών μεταβάλλει την  $GABA$ εργική νευροδιαβίβαση στον ιππόκαμπο. Ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η *in vitro* χορήγηση οπιοειδούς αναστέλλει την απελευθέρωση  $GABA$  από τους ενδονευρώνες του ιπποκάμπου (Cohen και συν., 1992, Madison και συν., 1988; Nicoll και συν., 1980) με συνέπεια την άρση της αναστολής που προκαλούν οι ενδονευρώνες στα πυραμιδικά κύτταρα και τελικό αποτέλεσμα την αυξημένη δραστηριότητα των πυραμιδικών νευρώνων (Snoboda και συν., 1999).

## ΣΚΟΠΟΣ

Ελάχιστες μελέτες υπάρχουν στην βιβλιογραφία σχετικά με την οξεία *in vivo* χορήγηση των οπιοειδών και τη μελέτη της επίδρασής τους, *in vitro*, στον ιππόκαμπο πειραματοζώων, δομή η οποία εμπλέκεται στην αποθήκευση πληροφοριών που σχετίζονται με την αντίληψη του πόνου. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της οξείας *in vivo* χορήγησης φεντανύλης στον ανοσοϊστοχημικό εντοπισμό του GABA στον ιππόκαμπο επίμυος, 12, 24 και 48 ώρες αργότερα.

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική μελέτη με τη χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων κατά του GABA με στόχο τη διερεύνηση της ενδεχόμενης δράσης της φεντανύλης στα επίπεδα έκφρασης του GABA στον ιππόκαμπο

## ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### Πειραματόζωα

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ενήλικοι αρσενικοί επίμυες Wistar, βάρους 180-250 gr. Οι επίμυες διατηρήθηκαν σε κλουβιά με ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή. Ο κύκλος ημέρας-νύχτας 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 των πειραματόζωων ήταν σύμφωνες με τον Ελληνικό Νόμο (Π.Δ. 160/91).

### Χορήγηση φεντανύλης-Πειραματικές ομάδες

Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν τυχαία σε 4 ομάδες των 7-8 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 80 $\mu$ g/0,4ml/kg (συνολική δόση φεντανύλης: 320 $\mu$ g/1,6ml/kg). Οι επίμυες θανατώθηκαν 12, 24 και 48 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 του ζώου για χρονικό διάστημα έως και δύο ώρες μετά την τελευταία χορήγηση του φαρμάκου.

### Προετοιμασία ιστού

Για τη λήψη και μονιμοποίηση του εγκεφάλου των πειραματόζωων, τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με χρήση πτητικού αναισθητικού (δισαιθυλαιθέρα). Στη συνέχεια έγινε διάνοιξη της θωρακικής κοιλότητας και εισαγωγή βελόνας στην αριστερή κοιλία της καρδιάς. Η βελόνα ήταν συνδεδεμένη με ασκό που



περιείχε 100 ml παγωμένου (4°C) φυσιολογικού ορού, ο οποίος έρεε με πίεση 250 mmHg. Μια τρύπα στην δεξιά κοιλία διευκόλυε την έξοδο του αίματος. Αμέσως μετά την αφαίρεση του αίματος, χορηγήθηκαν κατά τον ίδιο τρόπο 200 ml παγωμένου (4°C) διαλύματος παραφορμαλδεύδης (4% PFA) σε 0,1 M PBS (0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) pH 7,4.

Μετά την μονιμοποίηση και αφαίρεση τους, οι ιστοί επώαστηκαν overnight σε διάλυμα PFA και ακολούθησε επώαση για 3 μέρες σε διάλυμα 0,1M PBS 30% σουκρόζης στους 4°C για την επίτευξη κρυοπροστασίας. Στη συνέχεια, έγινε 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 -24°C μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

### **Ανοσοϊστοχημική μελέτη**

Για τον κυτταρικό εντοπισμό και τη μελέτη της πιθανής δράσης της φεντανύλης στα επίπεδα έκφρασης του ανασταλτικού νευροδιαβιβαστή GABA πραγματοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικές μελέτες με χρήση αντισωμάτων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα ανεπτυγμένο σε κουνέλι κατά του GABA σε τελική συγκέντρωση 1/500.

Για τις χρώσεις οι ιστοί, αφού ξεπάγωσαν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ξεπλύθηκαν δυο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα TBS (0,1 M Tris-HCl και 0,9% NaCl, pH 7,4) και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά σε διάλυμα 0,1 M TBS το οποίο περιείχε 3,3% φυσιολογικό ορό αίγας (NGS) για την αποφυγή της μη ειδικής δέσμευσης των αντισωμάτων. Ακολούθως, οι ιστοί ξεπλύθηκαν τρεις φορές με TBS και επώαστηκαν για 16-18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, με το πρώτο αντίσωμα το οποίο είχε

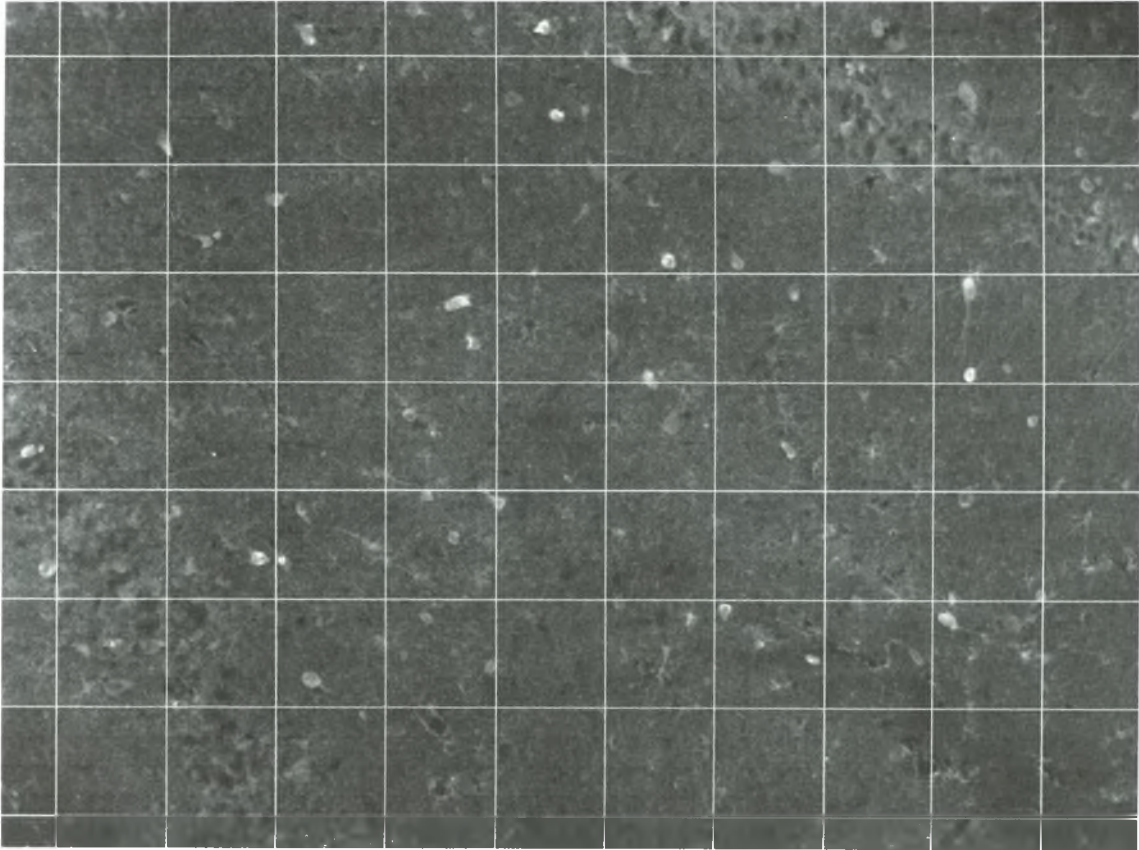
προηγουμένως διαλυθεί σε διάλυμα 0,1M TBS το οποίο περιείχε 0,5% NGS και 0,3% Triton X-100. Μετά από αυτό, οι τομές ξεπλύθηκαν τρεις φορές με 0,1 M TBS και επώαστηκαν για 1,5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με φθορίζον δεύτερο αντίσωμα συνδεδεμένο με φλουορεσκεΐνη (αντίσωμα αίγας κατά των IgG(H+L) ανοσοσφαιρινών κουνελιού, σε συγκέντρωση 1:150, Vector Laboratories, ΗΠΑ). Οι τομές αφού ξεπλύθηκαν με TBS, καλύφθηκαν με υλικό κάλυψης φθορισμού, το οποίο περιείχε τη χρωστική DAPI για την σήμανση των κυτταρικών πυρήνων και στη συνέχεια παρατηρήθηκαν με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου.

### **Μικροσκοπία**

Για την οπτικοποίηση του ιστού χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο φθορισμού AxioImager Z1 (Carl Zeiss, Jena, Germany) εξοπλισμένο με φίλτρα κατάλληλου μήκους κύματος και λογισμικό AxioVision software, 4.7.1 και αντικειμενικός φακός Plan-Neofluar 10X. Για την καταγραφή των εικόνων χρησιμοποιήθηκε ασπρόμαυρη κάμερα AxioCam CCD (Carl Zeiss, Jena).

Την οπτικοποίηση των τομών ακολούθησε ποσοτική ανάλυση των εικόνων που προέκυψαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό ανάλυσης εικόνας ImageJ 1,37v. Για την ποσοτική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν ασπρόμαυρες εικόνες 8-bit των οποίων το χρωματικό εύρος αναπαραστάθηκε σε κλίμακα μη προσημασμένων ακεραίων εύρους από 0 έως 250. Έγινε καταμέτρηση των νευρώνων οι οποίοι παρουσίαζαν διακριτό περίγραμμα του κυτταρικού σώματος καθώς και διακριτό πυρήνα. Στην παρούσα μελέτη δεν πραγματοποιήθηκε μέτρηση της έντασης φθορισμού των κυτταρικών σωμάτων ή των αποφυάδων των νευρώνων.

Η καταμέτρηση των νευρώνων έγινε σε 20, τυχαίως επιλεγέντα, τετράγωνα πεδία στα οποία χωρίσθηκε η προς ανάλυση εικόνα με τη βοήθεια του λογισμικού ImageJ όπως φαίνεται παρακάτω.

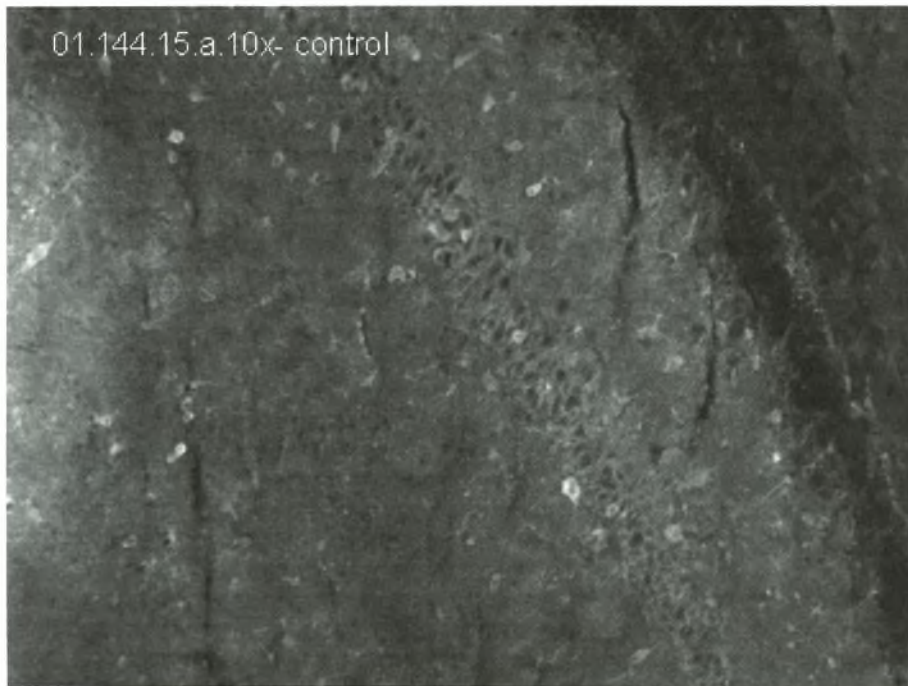
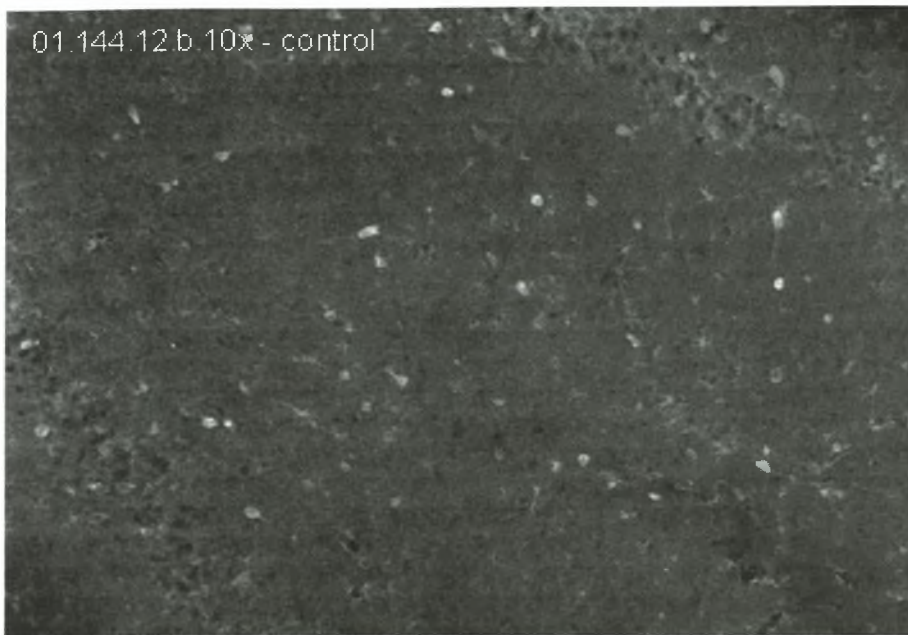


## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

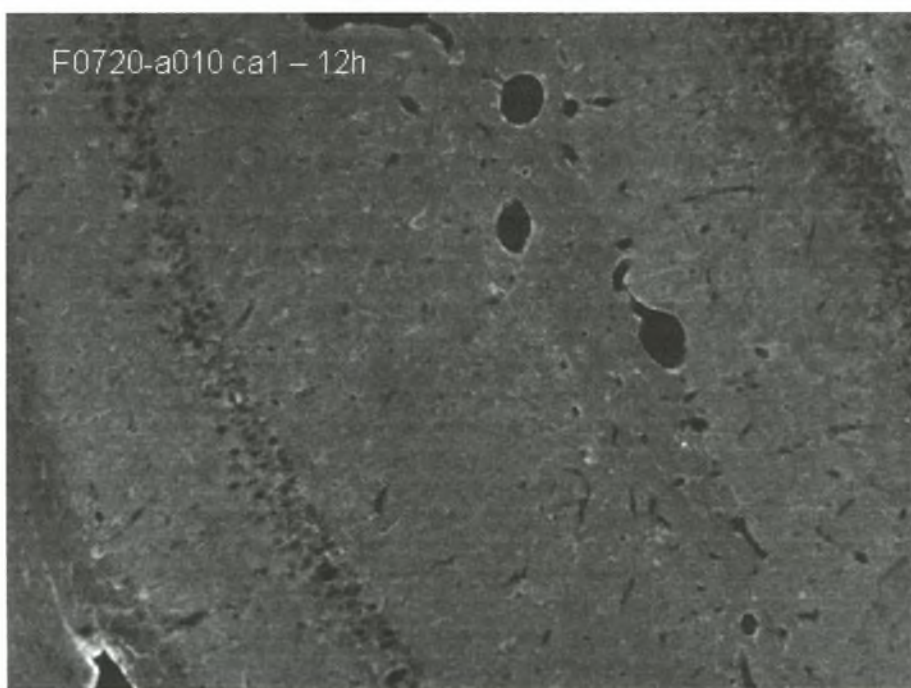
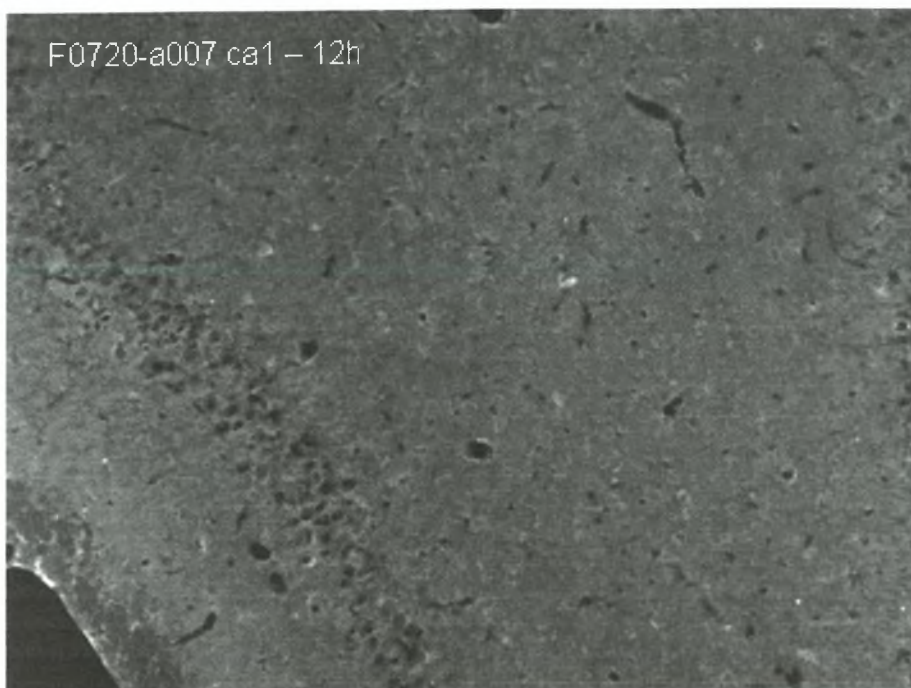
Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε αριθμός πειραματόζων ο οποίος παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα

	Αριθμός πειραματόζων που τους χορηγήθηκε φεντανύλη	Αριθμός εγκεφάλων που μονιμοποιήθηκαν και καταψύχθηκαν	Αριθμός εγκεφάλων που αποψύχθηκαν	Αριθμός εγκεφάλων στους οποίους έγινε ανοσοϊστοχημεία
Ομάδα ελέγχου	9	9	7	2
Φεντανύλη 12	7	5	4	1
Φεντανύλη 24	8	5	5	2
Φεντανύλη 48	7	4	4	2

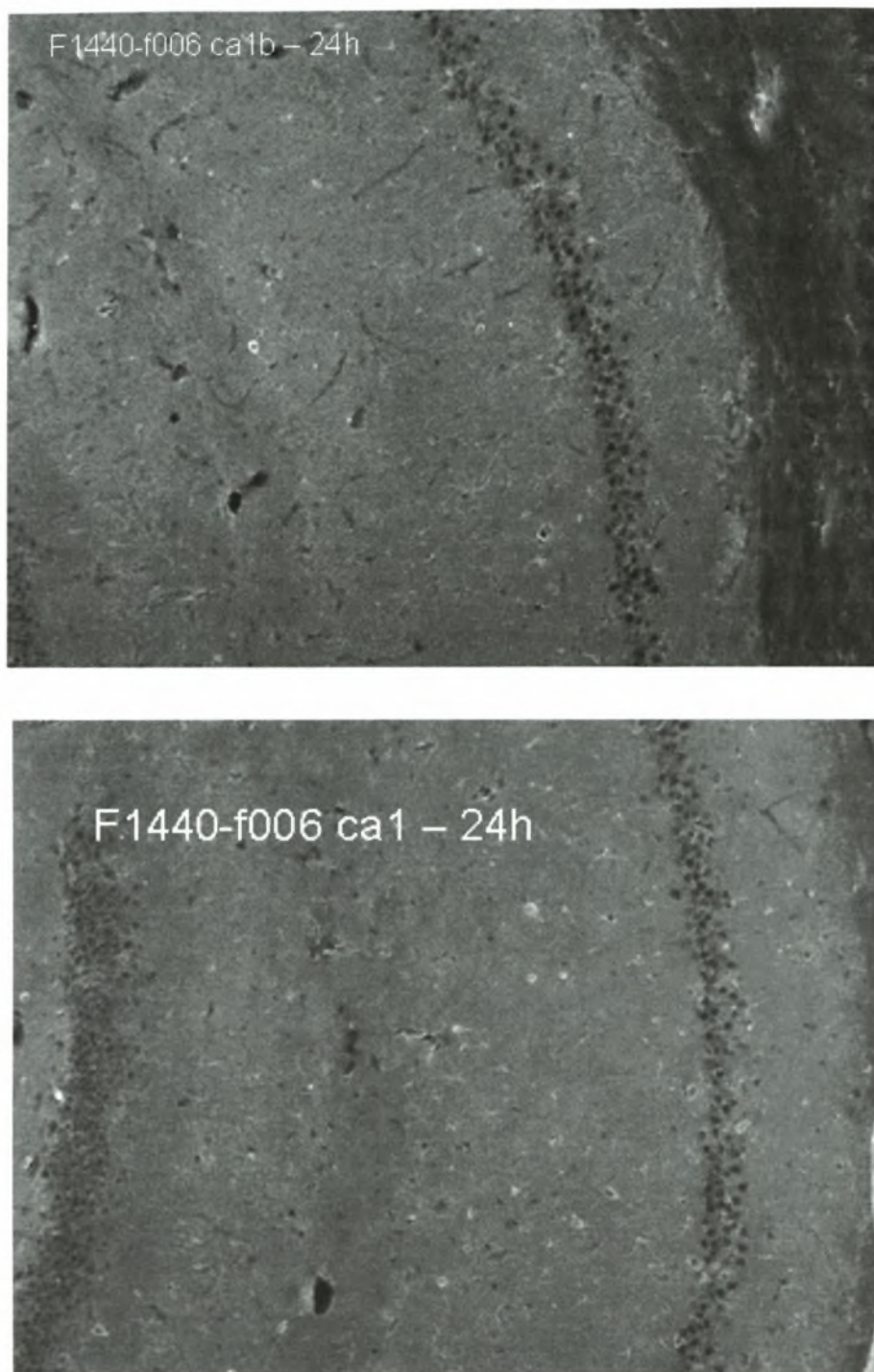
Για την μελέτη της ενδεχόμενης δράσης της φεντανύλης στα επίπεδα έκφρασης του GABA πραγματοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικές μελέτες 12, 24 και 48 ώρες μετά την υποδόρια χορήγηση φεντανύλης.



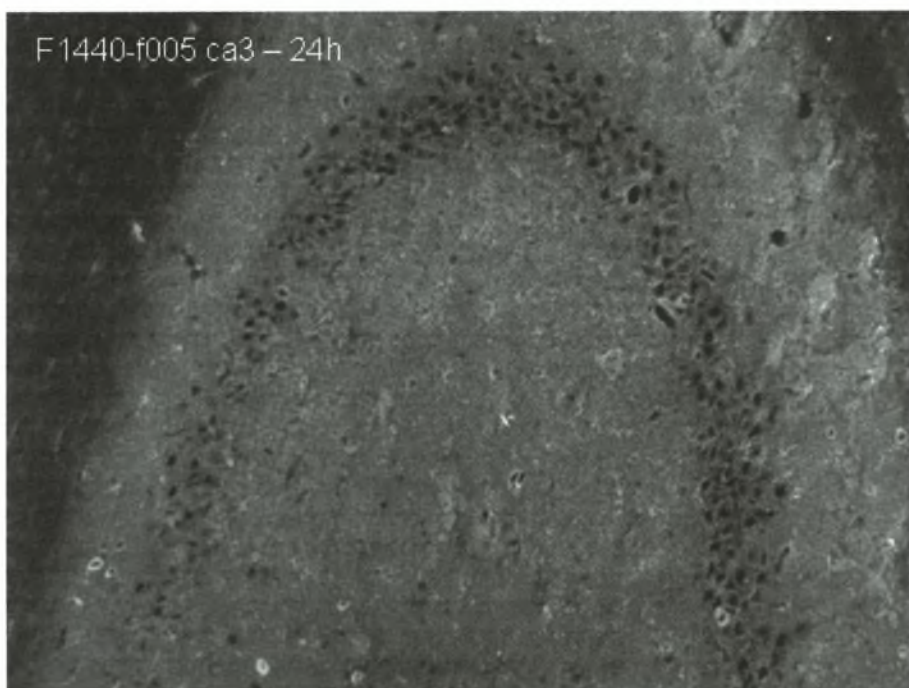
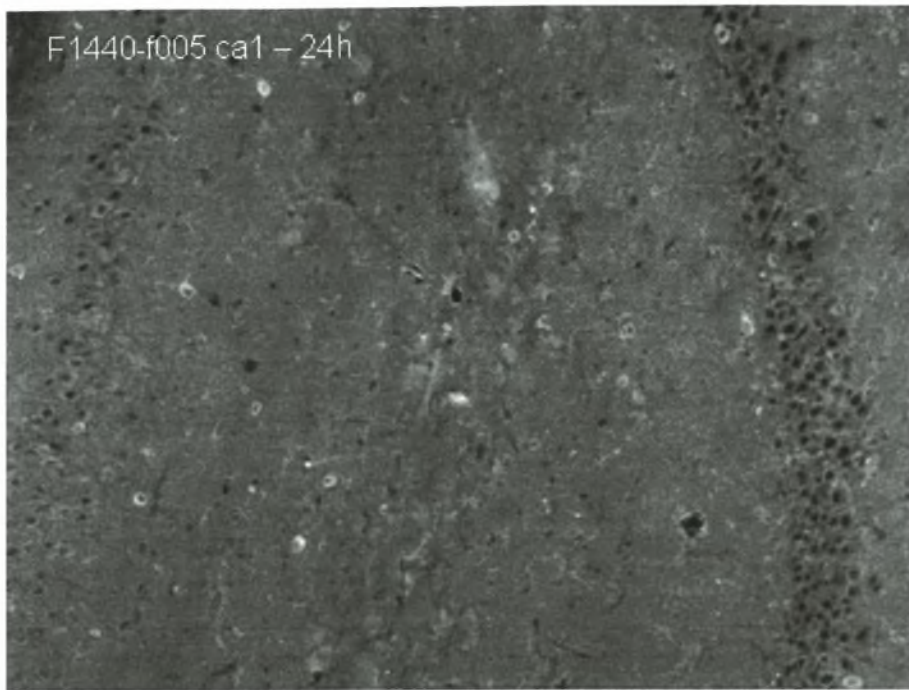
**Εικόνα 12. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του GABA στις υποπεριοχές του Ιπποκάμπου σε ζώα ελέγχου.**



**Εικόνα 13. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του GABA στις υποπεριοχές του Ιπποκάμπου 12 ώρες μετά τη χορήγηση φεντανύλης.**

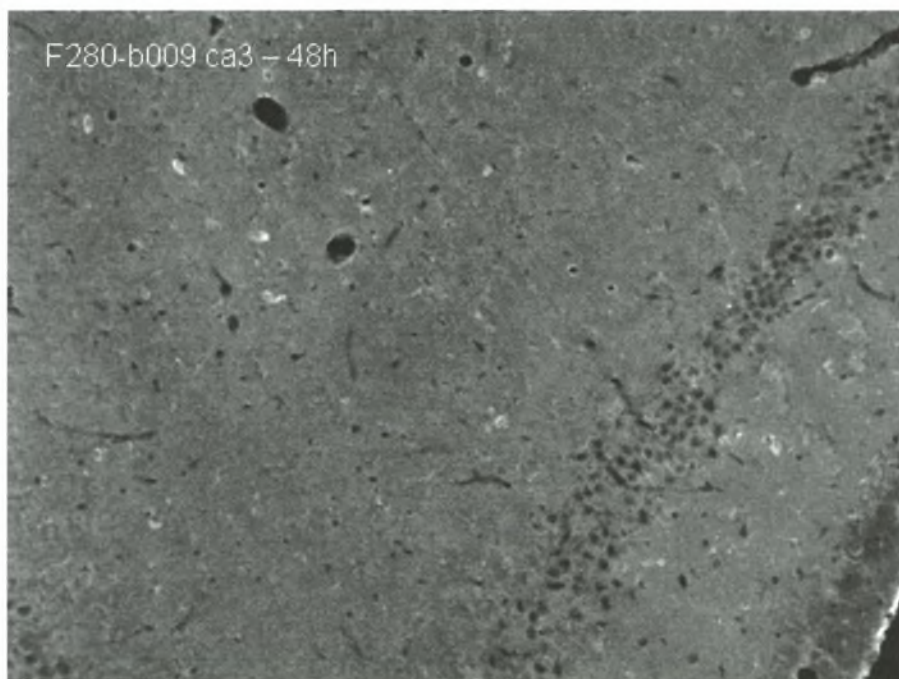
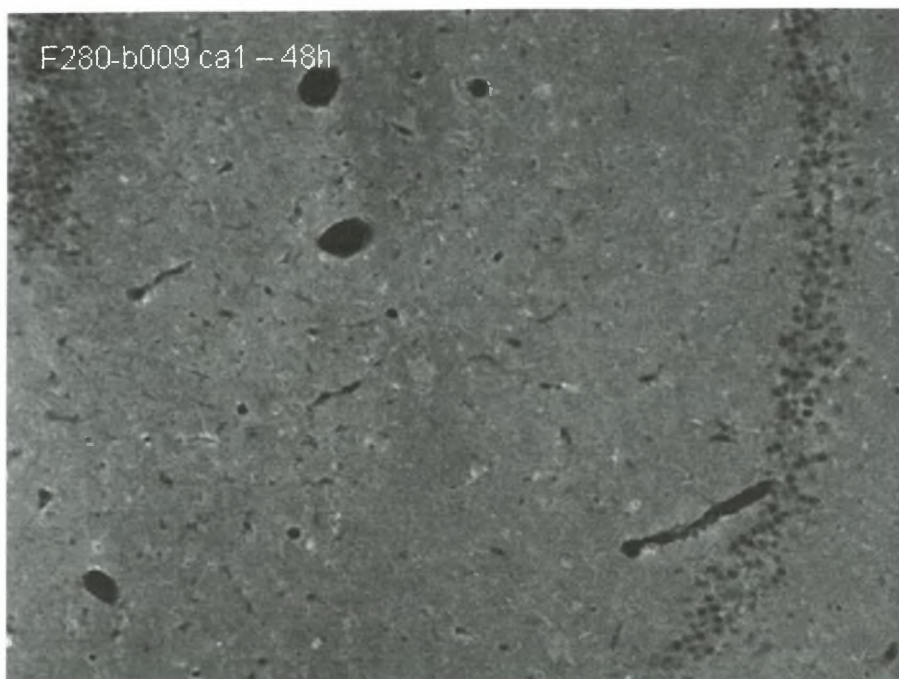


Εικόνα 14α. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του GABA στις υποπεριοχές του ιπποκάμπου 24 ώρες μετά τη χορήγηση φεντανύλης.

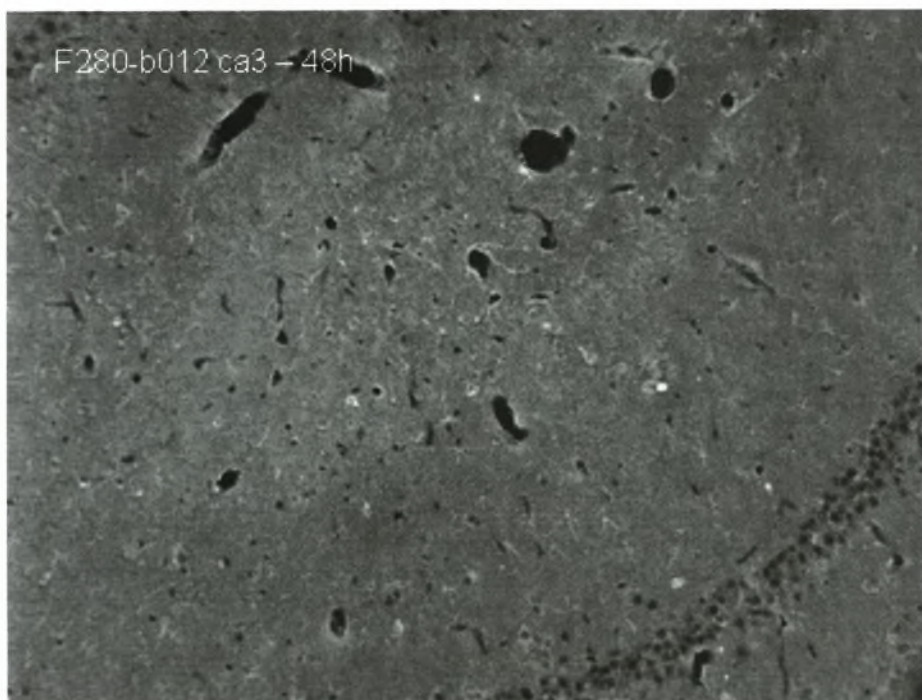
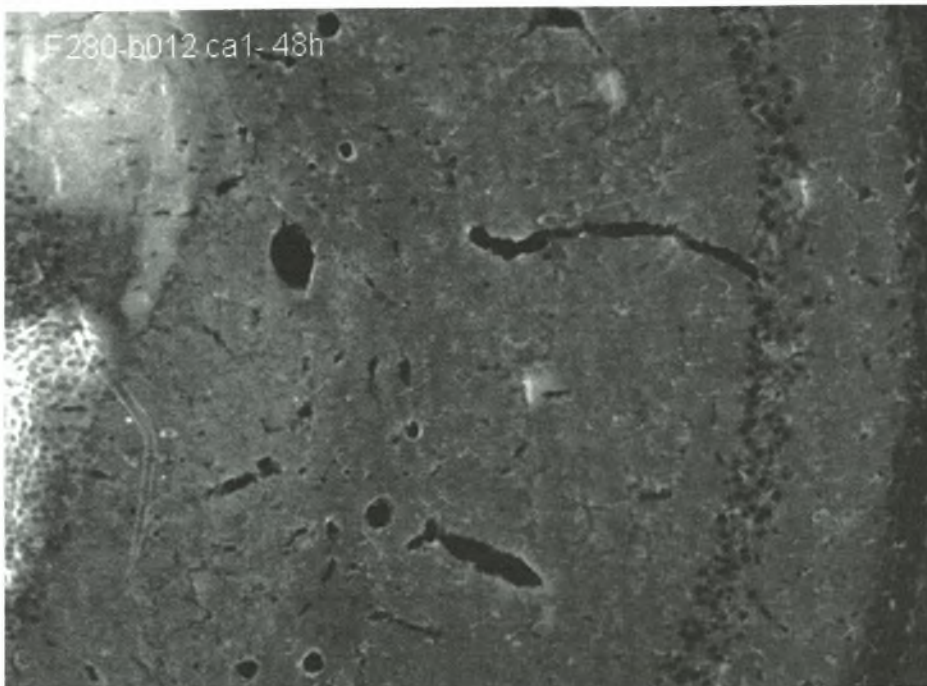


**Εικόνα 14β. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του GABA στις υποπεριοχές του ιπποκάμπου 24 ώρες μετά τη χορήγηση φεντανύλης.**

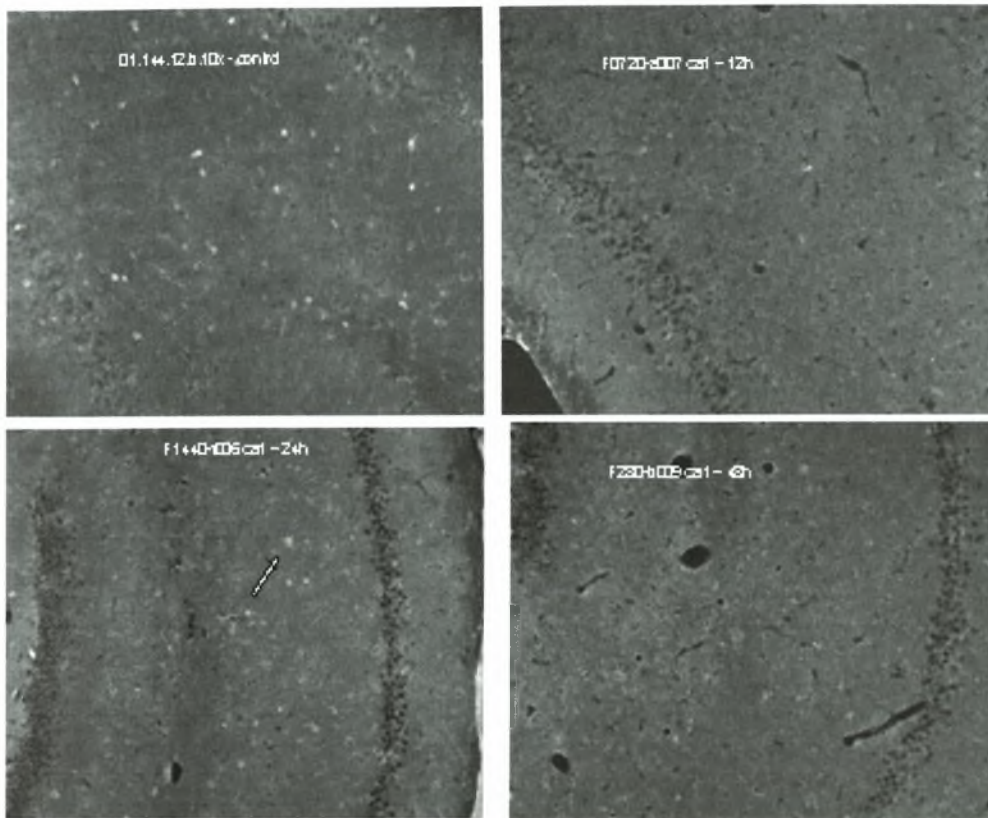




Εικόνα 15α. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του GABA στις υποπεριοχές του Ιπποκάμπου 48 ώρες μετά τη χορήγηση φεντανύλης.

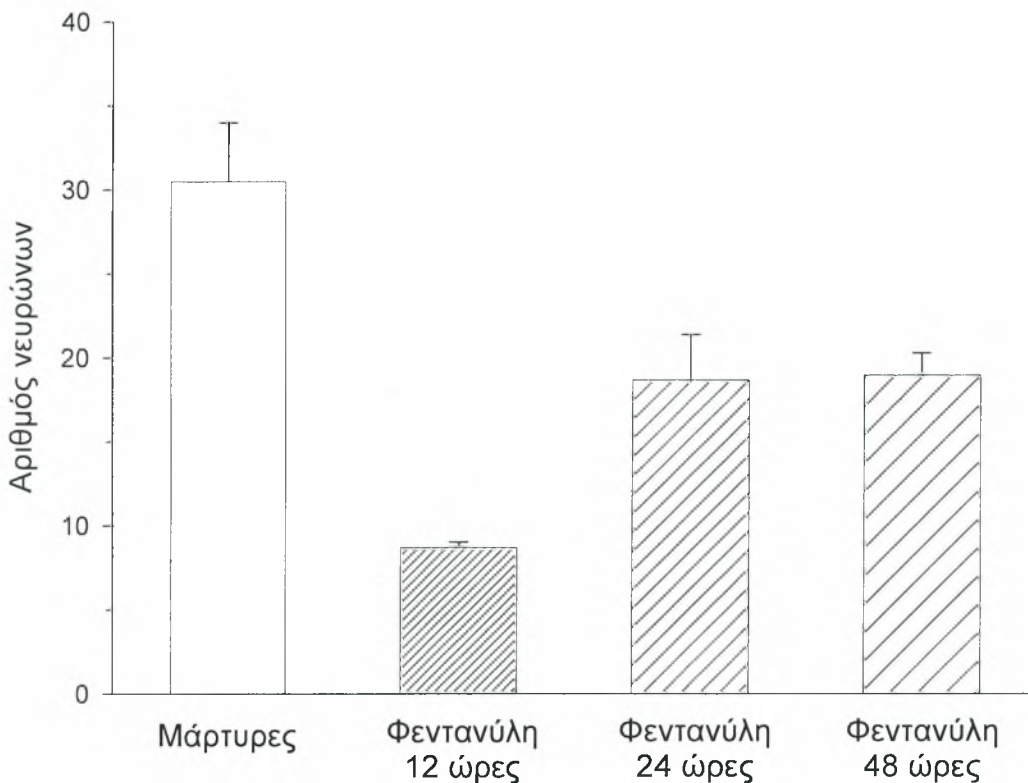


Εικόνα 15β. Ανοσοϊστοχημικός εντοπισμός του GABA στις υποπεριοχές του Ιπποκάμπου 48 ώρες μετά τη χορήγηση φεντανύλης.



Εικόνα 16. Σύνοψη του ανοσοϊστοχημικού εντοπισμού του GABA στις υποπεριοχές του ιπποκάμπου σε τομές πειραματοζώων μαρτύρων καθώς και σε τομές πειραματοζώων 12, 24 και 48 ώρες μετά τη χορήγηση φεντανύλης.

Στα ζώα ελέγχου, GABA εντοπίστηκε σε κυτταρικά σώματα και αποφύσεις (ενδο)νευρώνων σε όλες τις υποπεριοχές του ιπποκάμπου. Τα επίπεδα του GABA 12 ώρες μετά την χορήγηση φεντανύλης μειώθηκαν δραματικά. Στις 24 και 48 ώρες παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του GABA στις περιοχές όπου αντιστοιχούν νευράξονες και δενδρίτες των ενδονευρώνων σε σύγκριση με τομές από τα ζώα ελέγχου. Οι παρατηρήσεις αυτές ισχύουν για όλες τις υποπεριοχές του ιπποκάμπου, είναι όμως εντονότερη στα CA1, CA2 και CA3 πεδία, όπου το δίκτυο των αποφύσεων φαίνεται να είναι εντονότερο σε τομές από τα ζώα ελέγχου.



Εικόνα 17. Ιστόγραμμα αριθμού νευρώνων που καταμετρήθηκαν στην περιοχή CA1 σε τέσσερις ομάδες πειραματοζώων.

Όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα, παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των νευρώνων στην CA1 περιοχή του ιπποκάμπου 12 ώρες μετά τη χορήγηση φεντανύλης. Επανάκαμψη της μείωσης αυτής παρατηρήθηκε σε τομές ιπποκάμπου πειραματοζώων 24 ώρες μετά την χορήγηση φεντανύλης, ενώ στις 48 ώρες ο αριθμός των νευρώνων ανοσοθετικών στο GABA παρέμεινε στα ίδια επίπεδα με αυτά των 24 ωρών. Παρόλα αυτά, ο μικρός αριθμός των δεδομένων δεν επέτρεψε την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη για το γ-αμινοβουτυρικό οξύ κατέδειξε ελάττωση των επιπέδων τόσο στις αποφυάδες όσο και στα σώματα υποδηλώνοντας ελάττωση της απελευθέρωσης αυτού στους πυραμιδικούς νευρώνες. Συμπερασματικά, η οξεία *in vivo* χορήγηση φεντανύλης προκαλεί ελάττωση της νευρωνικής διαβίβασης γ-αμινοβουτυρικού οξέος που ανιχνεύεται 24 ώρες μετά. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν την αύξηση της διεγερσιμότητας του ιπποκάμπου μετά από χορήγηση φεντανύλης και παρέχουν πληροφορίες όσον αφορά πιθανούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στα αρχικά στάδια ανάπτυξης αντοχής στα οπιοειδή.

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 απευεαισθητοποίηση (ή εξάρτηση ή αποχή). Ωστόσο, η παρουσία απευεαισθητοποίησης 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» (Harris και συν., 2005).

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η μελέτη των αλλαγών που προκαλεί σε μοριακό επίπεδο η οξεία χορήγηση του οπιοειδούς φεντανύλη στον εγκέφαλο επίμυος και συγκεκριμένα στον ιππόκαμπο, ο οποίος ως γνωστόν εμπλέκεται άμεσα στην αποθήκευση πληροφοριών που σχετίζονται με την αντίληψη του πόνου (Wei και συν., 2000). Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε

σε δύο σημεία: α) στον εντοπισμό του GABA στα νευρικά κύτταρα του ιπποκάμπου και β) στην μελέτη της πιθανής δράσης της φεντανύλης στα επίπεδα έκφρασης του GABA στον ιππόκαμπο.

Το GABA εντοπίστηκε σε κυτταρικά σώματα και αποφύσεις ενδονευρώνων σε όλες τις υποπεριοχές του ιπποκάμπου. Ο αριθμός των κυττάρων ποικίλλει ανάλογα με την περιοχή, ενώ το δίκτυο των αποφύσεων φαίνεται να είναι εντονότερο στα CA1, CA2 και CA3 πεδία του ιπποκάμπου.

Τα επίπεδα του GABA 24 ώρες μετά τη χορήγηση φεντανύλης ελαττώνονται στις περιοχές που αντιστοιχούν νευράξονες και δενδρίτες των ενδονευρώνων σε σύγκριση με τα ζώα ελέγχου. Η παρατήρηση αυτή ισχύει για όλες τις υποπεριοχές του ιπποκάμπου, είναι όμως εντονότερη στα CA1, CA2 και CA3 πεδία, όπου το δίκτυο των αποφύσεων φαίνεται να είναι εντονότερο στα ζώα ελέγχου. Η απουσία GABA στις αποφύσεις των ενδονευρώνων υποδεικνύει μείωση της επίδρασης αυτών των νευρώνων στα πυραμιδικά κύτταρα.

Οι μοριακοί μηχανισμοί οι οποίοι συντελούν στις μεταβολές των επιπέδων του GABA στο κυτταρόπλασμα και τις αποφύσεις των ενδονευρώνων 24 ώρες μετά την οξεία ενεργοποίηση των μ οπιοειδικών υποδοχέων από φεντανύλη χρήζουν περαιτέρω μελέτης. Είναι απαραίτητο να ακολουθήσουν διπλές ανοσοϊστοχημικές μελέτες έναντι των μ οπιοειδικών υποδοχέων και του GABA.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Δημοσιεύσεις

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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
5. Cohen G.A., Doze V.A., Madison D.V., Opioid inhibition of GABA release from presynaptic terminals of rat hippocampal interneurons. *Neuron*. 9 (1992) 325-335
6. 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
7. 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
8. Freund T.F. and Buzsaki G. Interneurons of the hippocampus *Hippocampus*. 6 (1996) 427-429

9. Harris C.A., Gewirtz C.J., Acute opioid dependence: characterizing the early adaptations underlying drug withdrawal. *Review Psychopharmacology*, 178 (2005) 353-366
10. 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
11. Hortnagl H., Berger M.L., Sperk G. and Pifl C. Regional heterogeneity in the distribution of neurotransmitter markers in the rat hippocampus. *Neurosci*. 45 (1991) 261-272
12. 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
13. 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
14. Kandler K., Katz L.C., Neuronal coupling and uncoupling in the developing nervous system, *Curr. Opin. Neurobiol*. 5 (1995) 98-105
15. 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
16. Koshland DE Jr. The molecule of the year. *Science* 258 (1992) 1861
17. Laulin J.P., Larcher A., Celerier E., Le Moal M., Simonnet G., Long lasting increased pain sensitivity in rat following exposure to heroin for the first time. *Eur J Neurosci*. 10 (1998) 782-785
18. Laulin J.P., Celerier E., Larcher A., Le Moal M., Simonnet G., Opiate tolerance to daily heroin administration: an apparent phenomenon



associated with enhanced pain sensitivity. *Neuroscience* 89 (1999) 631-636

19. Madison D.V. and Nicoll R.A., Enkephalin hyperpolarizes interneurons in the rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)* 398 (1998) 123-130
20. Mao J., Opioid-induced abnormal pain sensitivity: implications in clinical opioid therapy. Topical review. *Pain* 100 (2002) 213-217
21. Risold P.Y., Swanson L.W. Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Res Rev.* 24(2-3) (1997) 115-95
22. Scoville W.B. and Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Psychiatry* 20 (1957) 11-21
23. Svoboda R. Kurt, Cathy E. Adams, Carl R. Lupica, Opioid receptor subtype expression defines morphologically distinct classes of hippocampal interneurons. *J Neurosci:* 19, 1 (1999) 85-95

### Βιβλία

1. *Color Atlas of Neuroscience: neuroanatomy and neurophysiology.* Greenstein B., Greenstein A., (1999). Thieme Publ.
2. *Understanding G protein Coupled Receptors and their role in the CNS.* Cesselin F., Edited by Menelas N. Pangalos, Ceri H. Davies. Oxford University Press (2002)
3. *Αναισθησιολογία.* Αργυρώ Ι. Φασουλάκη. Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης. Αθήνα (2005) 588-602
4. *Αναισθησιολογία. Επείγουσα και εντατική ιατρική Αντιμετώπιση του πόνου.* Γκιάλα Μ. Μαρία. University Studio Press. Θεσσαλονίκη (1998) 271-279
5. *Επίτομη Ανατομική του Ανθρώπου και Άτλας.* Αλέξανδρος Σάββας. Τόμος Δεύτερος. Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη. Θεσσαλονίκη (1989) 185-187

6. Εγχειρίδιο ανατομικής του ανθρώπου με έγχρωμο άτλαντα. Kahle W., Leonhardt H., Platzer W. Τόμος 3: Νευρικό σύστημα και αισθητήρια όργανα. Kahle Werner. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας. Αθήνα (1985)
7. Κλινική Αναισθησιολογία. G. Edward Morgan, Maged S. Mikhail. Τόμος Πρώτος. Δεύτερη Έκδοση. Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου. Αθήνα (2000) 390-406
8. Νευροεπιστήμη και συμπεριφορά. Kandel R. Eric, Schwartz H. James, Jessell M. Thomas. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. Ηράκλειο (1999)
9. Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα του Ανθρώπου, Σύνοψη και Άτλας. Nienwehuys R., Voogd J. Van Juijzen Chr. (1983) Μετάφραση Α. Καραμανλίδης. Εκδόσεις Κυριακίδη
10. Φαρμακολογία. Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman. Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης. Αθήνα (1998)

### Διαδικτυακοί 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/GABA\\_receptor](http://en.wikipedia.org/wiki/GABA_receptor)

[http://en.wikipedia.org/wiki/GABA\\_A\\_receptor](http://en.wikipedia.org/wiki/GABA_A_receptor)

[http://en.wikipedia.org/wiki/GABA\\_B\\_receptor](http://en.wikipedia.org/wiki/GABA_B_receptor)

[http://en.wikipedia.org/wiki/GABA\\_C\\_receptor](http://en.wikipedia.org/wiki/GABA_C_receptor)

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

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

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

<http://www.bris.ac.uk/Depts/Synaptic/info/pathway/hippocampal.htm>

[http://www.deadiversion.usdoj.gov/drugs\\_concern/fentanyl.htm](http://www.deadiversion.usdoj.gov/drugs_concern/fentanyl.htm)

<http://www.neurosci.pharm.utoledo.edu/MBC3320/GABA.htm#synthesis>

