

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Ν. ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΔΗΣ**

---

ΠΑΝΕΠ. ΕΤΟΣ 2006-07

Αριθμ. 1786

**ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΥΠΕΡΑΛΓΗΣΙΑΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ  
ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΟΠΙΟΕΙΔΩΝ ΣΕ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥΣ  
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΕΤΑΜΙΝΗΣ**

**ΕΙΡΗΝΗΣ ΑΣΟΥΧΙΔΟΥ**

ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΟΛΟΓΟΥ

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**ΛΑΡΙΣΑ 2007**

323 35

D



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

Αριθ. Εισ.: 7969/1  
Ημερ. Εισ.: 14-01-2010  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ  
615.323 35  
ΑΣΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083867



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Ν. ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΔΗΣ**

---

ΠΑΝΕΠ. ΕΤΟΣ 2006-07

Αριθμ. 1786

**ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΥΠΕΡΑΛΓΗΣΙΑΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ  
ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΟΠΙΟΕΙΔΩΝ ΣΕ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥΣ  
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΕΤΑΜΙΝΗΣ**

**ΕΙΡΗΝΗΣ ΑΣΟΥΧΙΔΟΥ**

ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΟΛΟΓΟΥ

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**ΛΑΡΙΣΑ 2007**

**Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**ΕΥΤΥΧΙΑ ΑΣΠΡΟΔΥΝΗ, ΑΝΑΠΛ.ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ  
ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΜΙΧΑΛΟΥΔΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΩΣΤΟΠΟΥΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

**Η ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**ΕΥΤΥΧΙΑ ΑΣΠΡΟΔΥΝΗ, ΑΝΑΠΛ.ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ  
ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΩΣΤΟΠΟΥΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΑΚΕΛΑΑΡΙΔΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΝΙΚΗΦΟΡΟΣ ΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΓΕΩΡΓΙΑ ΣΤΑΜΑΤΙΟΥ, ΕΠΙΚ.ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ  
ΑΝΝΑ ΒΑΣΙΛΑΚΗ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ  
ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΠΙΤΣΙΚΑΣ, ΕΠΙΚ.ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

---

«Η έγκρισις της Διδακτορικής Διατριβής υπό της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλεί αποδοχήν των γνωμών του συγγραφέως».

(Νόμος 5343/32, άρθρ. 202 § 2 και ν. 1268/82, άρθρο 50 §8)

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ**  
**ΚΩΝ/ΝΟΣ Ν. ΜΑΛΙΖΟΣ**



«'Αεί τι βούλου χρήσιμον  
προσμανθάνειν».

Σοφοκλής

Να θέλεις πάντοτε να  
προσθέτεις στις γνώσεις  
σου κάτι το χρήσιμο.





Στους γονείς μου,

στην αδελφή μου,

στον Πέτρο.



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η χρήση των οπιοειδών παραμένει η πιο συχνή μέθοδος για την αντιμετώπιση του περιεγχειρητικού και μετεγχειρητικού πόνου και αποτελεί απαραίτητο παράγοντα για την αντιμετώπιση του οξύ και χρόνιου πόνου, καρκινικό ή και μη. Η επιτυχής αντιμετώπιση τόσο του διεγχειρητικού όσο και του μετεγχειρητικού άλγους παίζει σημαντικό ρόλο στη γρήγορη αποκατάσταση των ασθενών.

Κλινικές μελέτες όμως σε ανθρώπους και πειραματόζωα οδήγησαν στην παρατήρηση ότι μετά από μακρόχρονη χορήγηση αγωνιστών των μ-υποδοχέων παρατηρείται μακροχρόνια υπεραλγησία, αύξηση της έντασης του άλγους, η οποία μπορεί να διαρκεί έως και μήνες. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε ότι όταν συνχορηγείται με τα οπιοειδή και κεταμίνη, ένας NMDA ανταγωνιστής, το φαινόμενο αυτό εκλείπει.

Η παρούσα μελέτη επιχειρεί να μελετήσει για πρώτη φορά, με ενδοκυττάρια καταγραφές σε πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής του υποκάμπου, τη δράση των οπιοειδών μετά από in vivo χορήγηση φεντανύλης (του πιο συχνά χρησιμοποιούμενου οπιοειδούς για την αντιμετώπιση του διεγχειρητικού άλγους). Επίσης, να ερευνήσει εάν οι μεταβολές που προκαλεί η φεντανύλη αναστρέφονται από την κεταμίνη.

Σε αυτήν την προσπάθεια είχα την τύχη να έχω τη βοήθεια πολλών ανθρώπων.

Θέλω να εκφράσω από καρδιάς τις ευχαριστίες μου στην Αναπλ.Καθηγήτρια Ευτυχία Ασπροδύνη, η οποία ως επιβλέπουσα της διδακτορικής διατριβής στάθηκε δίπλα μου επιστημονικά αλλά και με στήριξε ηθικά, στερώντας πολύτιμες ώρες από την οικογένειά της.

Θερμά ευχαριστώ το φίλο, συνεργάτη και Διδάκτορα, Ευάγγελο Κουβαρά ο οποίος συνέβαλλε σημαντικά στην υλοποίηση και αποπεράτωση αυτής της μελέτης.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Δρ.Γ.Γεωργιάδη, Διευθυντή του Β΄Αναισθησιολογικού Τμήματος του Γ.Ν. «Γ.Παπανικολάου», και όλους τους συναδέλφους μου, για την αμέριστη συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Ευχαριστώ τον Κ.Νάτση, Επ.Καθηγητή Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. για την ευγενική παραχώρηση φωτογραφιών από το προσωπικό του αρχείο.

Ευχαριστώ την οικογένεια μου, της οποίας η αγάπη με στήριζε και με εμπνύχωνε σε κάθε μου βήμα.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	9
---------------	---

### ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

<b>1. Μηχανισμός πόνου.....</b>	<b>15</b>
1.1. Αλγοϋποδοχείς.....	15
<b>2. Άλγος – Υπεραλγησία.....</b>	<b>22</b>
2.1. Μηχανισμός υπεραλγησίας.....	31
<b>3. Οπιοειδείς υποδοχείς.....</b>	<b>33</b>
3.1 Φεντανύλη.....	35
<b>4. NMDA υποδοχείς.....</b>	<b>38</b>
4.1. Ο ρόλος των NMDA υποδοχέων στη διαβίβαση του πόνου.....	40
4.2. Αλληλεπίδραση NMDA-οπιοειδών.....	40
4.3. Κεταμίνη .....	46
<b>5. Ιππόκαμπος .....</b>	<b>50</b>
5.1. Ιππόκαμπος και πόνος .....	50
5.2. Ανατομία ιπποκάμπου.....	53
5.2.1 Στοιβάδες του ιπποκάμπου.....	57
5.2.2. Ενδονευρώνες ιπποκάμπου.....	59
5.2.3 Συνδέσεις του ιπποκάμπου.....	63
5.3. Νευροχημεία ιπποκάμπου.....	66
5.3.1 Γλουταμινικό οξύ.....	66
5.3.2 γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA).....	67
5.4. Υποδοχείς αμινοξέων στον ιππόκαμπο.....	68
<b>6. Επίδραση των οπιοειδών στην CA1 περιοχή του ιπποκάμπου..</b>	<b>73</b>

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

<b>ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	77
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ</b>	
7.1. Πειραματόζωα.....	78
7.2. Φάρμακα.....	78
7.3. Μέθοδος.....	78
<b>8. Ηλεκτροφυσιολογία του ιππόκαμπου</b> .....	88
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	95
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	117
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	125
<b>SUMMARY</b> .....	126
<b>ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....	127
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	129

# **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**





# 1. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΠΟΝΟΥ

## 1.1 Αλγοϋποδοχείς

Ο πόνος (από το ρήμα πένομαι) στα ομηρικά χρόνια σήμαινε σκληρή δουλειά (εξ ου και επίπονος), τον καιρό του Ηρόδοτου σήμαινε δυσφορία και μόνο από τον Ιπποκράτη συνδέθηκε άμεσα με τη νόσο και τον τραυματισμό. Το άλγος αποτελεί φυσιολογική εκδήλωση της καθημερινής ζωής και λειτουργεί ως ένα ζωτικής σημασίας αμυντικός μηχανισμός. Σύμφωνα με την Παγκόσμια Οργάνωση για τη μελέτη του πόνου (International Association for the study of Pain), «ο πόνος είναι μια δυσάρεστη αισθητηριακή ή συναισθηματική διεργασία που συχνά σχετίζεται με πραγματική ή δυνητική ιστική καταστροφή» (Siddall and Cousins, 1997).

Όταν ένα βλαπτικό ερέθισμα απειλεί την ιστική ακεραιότητα είτε άμεσα είτε έμμεσα, προκαλούνται απαντήσεις τόσο από το αυτόνομο νευρικό σύστημα (π.χ. μεταβολές της αρτηριακής πίεσης και του καρδιακού ρυθμού), όσο και από ορισμένους ενδοκρινείς αδένες (π.χ. αύξηση της έκκρισης επινεφριδίων και της υπόφυσης) ενώ παράλληλα δημιουργείται και η υποκειμενική αίσθηση του πόνου (Sorkin and Wallace, 1999).

Ο ιστικός τραυματισμός συνοδεύεται από ενεργοποίηση των αλγοδεκτικών υποδοχέων (nociceptive receptors) του πόνου στις μικρής διαμέτρου αισθητηριακές νευρικές ίνες (προσαγωγί). Αυτές οι αισθητηριακές νευρικές ίνες του πόνου εντοπίζονται στο δέρμα όπου παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη πυκνότητα σε σχέση με κάθε άλλο τύπο αισθητικού υποδοχέα (Julien, 1994), τους μύες, τις αρθρώσεις και τα κοιλιακά σπλάχνα και ενεργοποιούνται από ποικίλα μηχανικά, θερμικά ή χημικά ερεθίσματα (Julien, 1994). Λόγω του ότι αυτές οι ίνες ενεργοποιούνται από επώδυνα ερεθίσματα, οι υποδοχείς τους καλούνται αλγοδεκτικοί ή υποδοχείς πόνου.

Πληροφορίες από το περιβάλλον μεταφέρονται στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) ενός οργανισμού δια μέσου υποδοχέων οι

οποίοι βρίσκονται στο δέρμα, και άλλους ιστούς, και είναι ευαίσθητοι σε ερεθίσματα όπως η θερμοκρασία, η αφή και ο πόνος. Ο πόνος ανιχνεύεται από εξειδικευμένους υποδοχείς και δεν είναι το αποτέλεσμα υπερδιέγερσης κάποιου άλλου τύπου υποδοχέα.

Οι υποδοχείς μετατρέπουν την ενέργεια ενός συγκεκριμένου ερεθίσματος σε δυναμικό ενεργείας. Οι αλγοϋποδοχείς είναι αμύελες απολήξεις νευρών. Ορισμένοι απαντούν σε συγκεκριμένο είδος βλαπτικών ερεθισμάτων όπως π.χ. θερμικά ή μηχανικά. Άλλοι πάλι είναι ευαίσθητοι σε περισσότερα είδη ερεθισμάτων π.χ. πολυτρόποι ή πολυπαραγοντικοί αλγοϋποδοχείς. Ουσιαστικά όλοι οι αλγοϋποδοχείς νευρώνονται από μικρής διαμέτρου εμμύελες νευρικές ίνες (Αδ) και από αμύελες (C) νευρικές ίνες.

Οι Αδ είναι μικρής διαμέτρου, εμμύελες νευρικές ίνες, οι οποίες διεγείρονται με ερεθίσματα μικρής έντασης και μεταφέρουν το ερέθισμα με μεγάλη ταχύτητα (5-25 m/sec). Οι C ίνες είναι αμύελες νευρικές, οι οποίες διεγείρονται με ερεθίσματα μεγάλης έντασης και μεταφέρουν το ερέθισμα με μικρή ταχύτητα (<2 m/sec). Οι ίνες C διεγείρονται/μεταφέρουν μηχανικά, θερμικά και χημικά, υψηλής έντασης ερεθίσματα (πολυπαραγοντικές), έχουν μεγάλο δεκτικό πεδίο και ευαισθητοποιούνται από επαναλαμβανόμενα ερεθίσματα.

Οι Αδ και C προσαγωγές αισθητικές ίνες δίνουν συνάψεις στα οπίσθια κέρατα του νωτιαίου μυελού. Στο επίπεδο αυτό δημιουργείται μια σειρά νωτιαίων αντανακλαστικών όπως είναι για παράδειγμα το αντανακλαστικό της απόσυρσης από επώδυνο ερέθισμα (withdrawal reflex), αλλά δεν γίνεται ενσυνείδητη αίσθηση του πόνου. Τα κέντρα αυτά είναι υπεύθυνα για την αντίληψη του πόνου και για το δυσάρεστο συναίσθημα που τον συνοδεύει.

Η δραστηριοποίηση των Αδ αλγοϋποδοχέων παράγει ένα γρήγορο οξύ πόνο (πρώτος πόνος) ενώ ο ερεθισμός των C αλγοϋποδοχέων έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας λιγότερο εστιασμένης καυστικής αίσθησης (δεύτερος πόνος) και διεγείρονται από ουσίες που παράγονται κατά την καταστροφή των ιστών.

Μόνο ο ερεθισμός ινών οι οποίες συνδέονται με αλγοϋποδοχείς είναι ικανές να προκαλέσουν πόνο. Οι απολήξεις των Αδ και των C ινών δεν περιβάλλονται από μυελίνη για ένα διάστημα που κυμαίνεται από 100 έως 400μm, ενώ στο χώρο των απολήξεων αυτών συνευρίσκονται επίσης τριχοειδή και μαστοκύτταρα. Ο ερεθισμός των συγκεκριμένων σχηματισμών μετά από μια ιστική βλάβη προκαλεί την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστικών ουσιών όπως η ουσία P και το γλουταμικό οξύ. Η ιστική βλάβη μπορεί επίσης να αυξήσει τοπικά και την συγκέντρωση μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέως (προσταγλαδίνες, λευκοτριένες). Οι προαναφερθείσες ουσίες μπορεί να ενεργοποιούν με άμεσο τρόπο άλλες ίνες C, είτε να προκαλέσουν την απελευθέρωση ουσιών από τα γειτονικά μαστοκύτταρα είτε τέλος να οδηγήσουν στην εξαγγείωση πλάσματος, με συνέπεια τη δημιουργία οιδήματος. Οι ουσίες που απελευθερώνονται από τα μαστοκύτταρα (π.χ. ισταμίνη, κυτταροκίνες) και τα αγγεία με τη σειρά τους ενεργοποιούν εκ νέου ή ευαισθητοποιούν τους αλγοϋποδοχείς. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι στην περιφερική ευαισθητοποίηση ενέχονται ακόμα και ουσίες που βρίσκονται στα αιμοπετάλια (σεροτονίνη). Οι χημικές ουσίες που διεγείρουν τους υποδοχείς μπορεί να είναι συστατικά που φυσιολογικά βρίσκονται στα κύτταρα όπως ιόντα  $K^+$  και ATP και τα οποία απελευθερώνονται με την καταστροφή των κυττάρων.

Στον πίνακα 1 παρατίθενται οι αλγογόνες ουσίες που εμπλέκονται στην ευαισθητοποίηση, καθώς και η πηγή προέλευσής τους. Ο συνδυασμός της δράσης όλων αυτών των παραγόντων προκαλεί την ενεργοποίηση και την προοδευτική εκπόλωση των κεντρομόλων νευρικών ινών. Κατά συνέπεια, οι αλγοϋποδοχείς χρησιμοποιούν τις παραγόμενες από άλλα κύτταρα ουσίες για να μετατρέψουν μια τρέχουσα ή επικείμενη ιστική βλάβη σε δυναμικό ενεργείας.

**Πίνακας 1.** Νευροδραστικές ουσίες που συμμετέχουν στην περιφερική ευαισθητοποίηση

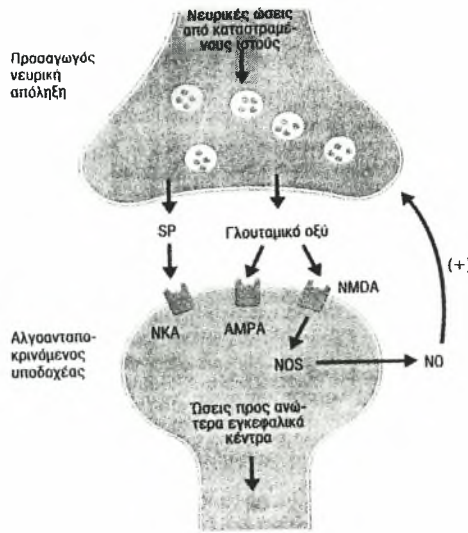
Ουσία	Προέλευση
Ουσία P	Νευρικές απολήξεις
Γλουταμικό οξύ	Νευρικές απολήξεις
Βραδυκίνηνη	Πλάσμα
Ισταμίνη	Αιμοπετάλια, μαστοκύτταρα
Πρωτόνια (χαμηλό pH)	Ισχαιμία, κατεστραμμένα κύτταρα
Προσταγλαδίνες	Αραχιδονικό οξύ (κατεστραμμένα κύτταρα)
Ιντερλευκίνες	Μαστοκύτταρα
TNF-a (tumor necrosis factor)	Μαστοκύτταρα

Ερεθισμός μικρής έντασης ο οποίος προξενεί περιορισμένη ιστική καταστροφή έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση παροδικού πόνου για τον οργανισμό και λειτουργεί ως φυσικό προειδοποιητικό σήμα. Αντιθέτως, ένα βλαπτικό ερέθισμα το οποίο συνοδεύεται από ιστική βλάβη ή μόλυνση δημιουργεί μία τοπική αντίδραση κατά την οποία απελευθερώνονται διάφορες χημικές ουσίες οι οποίες συμβάλλουν στην αύξηση της μεταγωγής του επώδυνου ερεθίσματος. Ερεθιστικά αμινοξέα όπως ασπαρτικό και γλουταμικό οξύ, καθώς και μία μεγάλη ποικιλία νευροπεπτιδίων στα οποία συμπεριλαμβάνονται η ουσία P, η χολοκυστοκίνηνη, το πεπτίδιο που σχετίζεται με το γονίδιο της καλσιτονίνης (CGRP, Calcitonin Gene Related Peptide), η γαλανίνη και η σωματοστατίνη περιέχονται σε αρκετές από τις C και τις λεπτές Αδ νευρικές ίνες. Πολύ συχνά μία και μόνο απόληξη μπορεί να περιέχει όλες αυτές τις ουσίες. Ως εκ τούτου, από τις τελικές απολήξεις των νευρικών ινών εκλύονται αλγογόνες ουσίες όπως βραδυκίνηνη, ακετυλοχολίνη, ιόντα  $H^+$  και  $K^+$ , προσταγλανδίνες, λευκοτριένια και η ουσία P (Birrell et al., 1991, Levine et

al., 1993, Cohen et al., 1990). Στη συνέχεια η ουσία P, η οποία απελευθερώνεται από νευρώνες σεροτονίνης (HT), προκαλεί αγγειοδιαστολή και επιδρά στα μαστοκύτταρα που εκκρίνουν ισταμίνη και στα αιμοπετάλια που εκκρίνουν σεροτονίνη (Simone et al., 1991, Rang et al., 1994, Capasso et al., 1975). Αυτές οι χημικές ουσίες ευαισθητοποιούν τους υποδοχείς με αποτέλεσμα το φαινόμενο της περιφερικής ευαισθητοποίησης. Ο τραυματισμός ιστού στην περιφέρεια είναι δυνατό να προκαλέσει απόκριση του νευρικού συστήματος σε δύο επίπεδα: ελάττωση του ουδού ενεργοποίησης σε βλαπτικά ερεθίσματα, (περιφερική ευαισθητοποίηση) και αύξηση της διεγερσιμότητας νευρώνων του νωτιαίου μυελού (κεντρική ευαισθητοποίηση). Στη συνέχεια χαμηλής έντασης ερεθίσματα τα οποία φυσιολογικά δε θα μπορούσαν να προκαλέσουν πόνο, τώρα γίνονται αντιληπτά ως επώδυνα. Αποτέλεσμα αυτών των αλλαγών που συμβαίνουν στην περιφέρεια είναι η αυξημένη απάντηση σε ερεθίσματα γύρω από την περιοχή του τραύματος, πρωτοπαθή υπεραλγησία (primary hyperalgesia), και η αυξημένη απόκριση σε ερεθίσματα που φυσιολογικά είναι αβλαβή (αλλοδυνία). Όλες οι παραπάνω ουσίες ευαισθητοποιούν γειτονικούς υποδοχείς πόνου, προκαλώντας δευτεροπαθή υπεραλγησία. Η χορήγηση αναστολέων της κυκλοξυγενάσης (COX), και συγκεκριμένα οι αναστολείς της COX2, μπορούν να επιβραδύνουν την ανάπτυξη φλεγμονής και να δράσουν προστατευτικά στην υπεραλγησία.

Τα κυτταρικά σώματα τόσο των Αδ όσο και των C ινών βρίσκονται μέσα στα νωτιαία γάγγλια από όπου εκφύονται οι νευρικές ίνες. Ίνες εισέρχονται με την οπίσθια αισθητική ρίζα στο οπίσθιο κέρασ του νωτιαίου μυελού για να συναφθούν τελικά με τους αλγοανταποκρινόμενους (nociresponsive) νευρώνες οι οποίοι εντοπίζονται στα επιφανειακά πέταλα I και II και σε μικρότερη έκταση στο πέταλο V (εικ.1). Διεγερτικά αμινοξέα όπως είναι το γλουταμικό οξύ και νευροκινίνες όπως η ουσία P και η νευροκινίνη A, δρουν ως νευροδιαβιβαστές στις συνάψεις μεταξύ των κεντρομόλων νευρικών απολήξεων και των νωτιαίων αλγοανταποκρινόμενων νευρώνων. Οι δομές των οπισθίων κεράτων του νωτιαίου μυελού δεν αποτελούν

απλούς αγωγούς μεταφοράς των εισερχομένων σημάτων, αλλά επιδέχονται τροποποιήσεις είτε με ανερχόμενους ή με κατερχόμενους μηχανισμούς.



**Εικ.1. Μηχανισμός της αντίληψης του άλγους.** Η ενεργοποίηση των αλγοποδοχέων σε κατεστραμμένους νοσούντες ή φλεγμαινόντες ιστούς προκαλείται από ένα ευρύ φάσμα αλγογόνων και υπεραλγογόνων χημικών διαμεσολαβητών που διεγείρουν Ad και C αισθητικά κεντρομόλα νείρα απολήγοντα στα επιφανειακά πέταλα (I και II) και το πέταλο V του νωτιαίου μυελού. Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) είναι ο παλινδρομος διαβιβαστής ο οποίος αυξάνει την απελευθέρωση ουσίας P και γλουταμινικού οξέος ώστε να επιτελεσθεί «φόρτιση» (wind up) (Julien, 1994).

Το επόμενο βήμα για την αντίληψη του πόνου είναι η μεταβίβαση του αλγογόνου σήματος στα ανώτερα εγκεφαλικά κέντρα. Η πληθώρα διεγερτικών και ανασταλτικών νευρικών σημάτων υποδεικνύει τον σπουδαίο ρόλο των νευρώνων αυτών στην αναμετάδοση πληροφοριών από τους αλγοϋποδοχείς των ιστών προς τον εγκέφαλο. Οι ανιούσες οδοί του άλγους πορεύονται διαμέσου των προσθιοπλάγιων και οπισθοπλάγιων δεμάτων 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 (Guyton, 1991). Μείζονα τμήματα του μεταιχμιακού συστήματος είναι η αμυγδαλή και ο ιππόκαμπος. Τα κέντρα αυτά είναι υπεύθυνα για την αντίληψη του πόνου και για το δυσάρεστο συναίσθημα που τον συνοδεύει.

## 2. ΑΛΓΟΣ – ΥΠΕΡΑΛΓΗΣΙΑ

Το άλγος έχει προστατευτικό ρόλο στη φύση, προειδοποιώντας για καταστροφές και προάγοντας τη θεραπεία της τραυματισμένης περιοχής. Παρόλα αυτά το μετεγχειρητικό άλγος μπορεί να είναι καταστροφικό γιατί αυξάνει την stress απάντηση των κυττάρων και την απάντηση του αυτόνομου, σωματικού και ενδοκρινικού συστήματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των πρωτεϊνών, τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, την πρόκληση ναυτίας και εμέτου, τη δημιουργία ειλεού και την κατάρριψη του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο ασθενής που υποβάλλεται σε μία επέμβαση, από την πιο μικρή και ελάχιστα επώδυνη, μέχρι την πιο μεγάλη και πολύ επώδυνη, είναι εκτεθειμένος στο άλγος. Η ικανοποιητική αντιμετώπισή του δεν είναι απαραίτητη μόνο για την μείωση της αντικειμενικής και υποκειμενικής αίσθησης του άλγους που έχει ο ασθενής. Η επιτυχής αντιμετώπιση τόσο του διεγχειρητικού όσο και του μετεγχειρητικού άλγους παίζει σημαντικό ρόλο:

1. Στην αποφυγή έκθεσης του οργανισμού σε κίνδυνο (άλγος σημαίνει stress και αυτό μεταφράζεται στον οργανισμό με αύξηση της διέγερσης του συμπαθητικού συστήματος: αύξηση της αρτηριακής πίεσης, ταχυκαρδία, αυξημένη έκκριση κατεχολαμινών από τα επινεφρίδια, ελευθέρωση οξειδωτικών ριζών, δυνητική ισχαιμία του μυοκαρδίου και μειωμένη αιματική ροή σε άλλους ιστούς).
2. Σε καλύτερες διεγχειρητικές συνθήκες, (χαμηλή αρτηριακή πίεση προσφέρει καλύτερο χειρουργικό πεδίο και λιγότερες απώλειες αίματος).
3. Στην καλύτερη μετεγχειρητική πορεία του ασθενούς. Το έντονο μετεγχειρητικό άλγος ελαττώνει τις αναπνευστικές κινήσεις, ιδίως μετά από λαπαροτομή ή θωρακοτομή και μειώνει την διατασιμότητα των πνευμόνων (ολική ζωτική χωρητικότητα), την ικανότητα για βήχα και βαθιά εισπνοή, τα οποία



οδηγούν σε υποξία μετά την επέμβαση. Η υποξία επηρεάζει αρνητικά και την πρόγνωση της ίδιας της επέμβασης, αφού υπάρχει μειωμένη αιματική ροή στους ιστούς και στα σημεία των αναστομώνσεων

4. Στη γρηγορότερη κινητοποίηση του ασθενούς και στην αποφυγή των μετεγχειρητικών επιπλοκών που σχετίζονται με την ακινητοποίησή του, π.χ. φλεβοθρόμβωση, πνευμονική εμβολή, ατελεκτασία πνευμόνων.

Για όλους τους παραπάνω λόγους χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη από τους αναισθησιολόγους τα οπιοειδή, φαρμακευτικές ουσίες με ισχυρή αναλγητική δράση, για την αντιμετώπιση του οξέως διεγχειρητικού και μετεγχειρητικού πόνου.

Παρατηρήθηκε ότι όταν η έναρξη της χορήγησης των αναλγητικών-οπιοειδών γίνεται πριν από το χειρουργικό ερέθισμα (preemptive analgesia) έχει καλύτερο διεγχειρητικό αποτέλεσμα το οποίο διαρκεί και άμεσα μετεγχειρητικά (Wall et al, 1988; Tverskoy et al, 1994). Ο σκοπός μιας τέτοιας θεραπείας είναι να αποφευχθεί και να προληφθεί η υπερδιέγερση του νωτιαίου μυελού και του κεντρικού νευρικού συστήματος (Woolf et al, 1993).

Παρά τη χορήγηση μεγάλων δόσεων οπιοειδών συστηματικώς ή/και επισκληριδώς ή/και υπαραχνοειδώς, πριν και κατά τη διάρκεια του χειρουργείου, η αντιμετώπιση του μετεγχειρητικού πόνου δεν είναι ικανοποιητική (Eisenach, 2000). Η μορφίνη και τα παράγωγα της είναι τα πιο ισχυρά αναλγητικά στους ανθρώπους, εν τούτοις ένας μεγάλος αριθμός κλινικών παρατηρήσεων σε ζώα και ανθρώπους αναφέρουν την εμφάνιση πόνου μετά από βραχεία ή χρόνια θεραπεία με οπιοειδή. Οι ασθενείς τις πρώτες μετεγχειρητικές ώρες εμφανίζουν άλγος παρά τα οπιοειδή που λαμβάνουν και οι απαιτήσεις σε οπιοειδή αυξάνονται με το πέρασμα των ωρών.

Άρχισε λοιπόν να ερευνάται κατά πόσο η ανάπτυξη της αντοχής στη δράση του φαρμάκου δεν είναι τίποτα άλλο από την εγκατάσταση της υπεραλγησίας μετά την έλευση της αναλγητικής ικανότητάς του. *Αντοχή είναι η μειωμένη απάντηση σε ένα φάρμακο μετά*

από συνεχή χορήγησή του (Jaffe, 1990). Παρατηρήθηκε ότι μετά από τη χορήγηση της φεντανύλης για αρκετές ημέρες, μειώθηκε η αναισθητική της ικανότητα και αυτό συσχετίστηκε με την ανάπτυξη του φαινομένου της αντοχής (Shafer, 1983). Παρόλο που είναι δύσκολο κατανοητό και αποδεκτό πως ένα φάρμακο έχει δύο αντίθετες δράσεις, ένας μεγάλος αριθμός μελετών σε ανθρώπους (Arner et al, 1988; Devulder et al, 1997; Ali et al, 1986) και σε ζώα (Laulin et al, 1998; Celerier et al, 2000; Li et al, 2001) προτείνει και αποδεικνύει ότι τα οπιοειδή προκαλούν όχι μόνο αναλγησία αλλά και υπεραλγησία.

Η πρώτη αναφορά για εμφάνιση υπεραλγησίας μετά από χορήγηση μορφίνης σε άνθρωπο έγινε από τον Rossbach το 1880 (Kayan, 1971). Περιέγραψε τις προοδευτικές αλλαγές μετά από χορήγηση επαναλαμβανόμενων δόσεων μορφίνης. Αναφέρει το φαινόμενο ως υπεραίσθησία που εμφανίζεται μετά την έλευση της αναλγητικής του δράσης. Ο Kayan (1971) παρατήρησε ότι οι αρουραίοι εμφάνισαν υπεραλγησία στις δύο ώρες μετά από χορήγηση μορφίνης και τελειώνει το άρθρο του γράφοντας: «πρέπει να σχεδιαστούν μελέτες που να περιγράφουν το φαινόμενο αυτό για να κατανοήσουμε την αναλγητική δράση της μορφίνης».

Τα αποτελέσματα της χορήγησης του remifentanyl (βραχείας διάρκειας οπιοειδές), μελετήθηκαν σε ανθρώπους και διαπιστώθηκε ότι τρεις ώρες μετά από την έναρξη της συνεχούς έγχυσης του remifentanyl, η αναλγητική του ικανότητα είχε μειωθεί στο ένα τρίτο της αρχικής (Vinik and Kissin, 1998). Μείωση της αναλγητικής ικανότητας του remifentanyl παρατηρήθηκε επίσης μετά από χορήγηση του σε ασθενείς οι οποίοι υποβλήθηκαν σε μεγάλη κοιλιακή επέμβαση (υστερεκτομή) (Guignard et al, 2000). Η εμφάνιση της αντοχής στο οπιοειδές αποδίδεται στο φαινόμενο της υπεραλγησίας (Eisenach, 2000). Σε υγιείς εθελοντές στους οποίους χορηγήθηκε remifentanyl παρατηρήθηκε, μετά τη διακοπή του, αύξηση της έκτασης της περιοχής της υπεραλγησίας (Angst et al, 2003; Koppert et al, 2003). Το μέγεθος της αντοχής είναι άσχετο με την ισχύ του οπιοειδούς που χρησιμοποιείται (Kissin et al, 1991), όμως η ταχύ-

τητα με την οποία αναπτύσσεται η ανοχή εξαρτάται από τα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου. Βραχείας διάρκειας οπιοειδή σχετίζονται με ταχύτερη εμφάνιση της ανοχής στη δράση του φαρμάκου. Η μείωση της ανοχής στον πόνο αμέσως μετά τη διακοπή της έγχυσης του remifentanyl επιβεβαιώνεται και σε πρόσφατη μελέτη (Luginbuhl et al, 2003).

Η Ασκητοπούλου (1985) διαπίστωσε ότι η φεντανύλη εμφάνισε ανοχή στην επίδρασή της στο καρδιαγγειακό σύστημα τρεις ώρες μετά τη χορήγησή της, χωρίς να έχει μειωθεί η συγκέντρωσή της στο πλάσμα. Τα πειράματα έγιναν σε σκύλους στους οποίους χορηγήθηκε φεντανύλη 100γ/Kg και μελετήθηκαν οι μεταβολές της μέσης αρτηριακής πίεσης και των καρδιακών σφύξεων. Όσο μεγαλύτερες δόσεις χρησιμοποιήθηκαν τόσο γρηγορότερα εμφανίστηκε η ανοχή στο οπιοειδές.

Μελέτες συνεχούς έγχυσης ενδοφλεβίως οπιοειδών σε σκύλους και αρουραίους έδειξε σημαντική μείωση της αναλγησίας μέσα σε 2-8 ώρες από την έναρξη της έγχυσης, χωρίς να μειωθεί η συγκέντρωση της μορφίνης στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) και στον εγκεφαλικό ιστό (Kissin et al, 1991). Η ανοχή των αρουραίων στο επώδυνο ερέθισμα μειώθηκε στο μισό στην 8<sup>η</sup> ώρα έγχυσης παρόλο που η συγκέντρωση της μορφίνης στο ENY ήταν μεγαλύτερη από το διπλάσιο της αρχικής. Συνεπώς η ανοχή (tolerance) που αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια της έγχυσης της μορφίνης δεν οφείλεται σε μείωση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στον εγκεφαλο.

Ο Laulin (1999) παρατήρησε ότι μία και μόνο δόση ηρωίνης σε αρουραίους προκάλεσε σταθερή αύξηση της ευαισθησίας στον πόνο. Αυτή η «υπερευαισθησία» προοδευτικά κάλυπτε την αναλγητική δράση της ηρωίνης, δίνοντας την εντύπωση της λιγότερης αναλγησίας, φαινομενικά δηλαδή την εικόνα της ανοχής στη δράση του φαρμάκου. Η χορήγηση μίας και μόνο δόσης ηρωίνης οδηγεί σε αύξηση της ευαισθησίας στον πόνο για μία περίοδο αρκετών ημερών (Laulin et al, 1998). Το αποτέλεσμα αυτό αυξάνεται με τη χορηγούμενη δόση. Ιδιαίτερης σημασίας είναι ότι η μείωση του οδού

του πόνου συμβαίνει απουσία επώδυνου ερεθίσματος. Στην ίδια μελέτη, προετοιμασία με MK-801 (NMDA antagonist) 30 min πριν από τη χορήγηση της ηρωίνης οδηγεί τον ουδό του πόνου σε παρόμοια επίπεδα με την ομάδα μαρτύρων. Συνεπώς η υπεραλγησία συνδέεται με την ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων και εικάζεται ότι οφείλεται σε έναν κοινό μηχανισμό του κεντρικού νευρικού συστήματος.

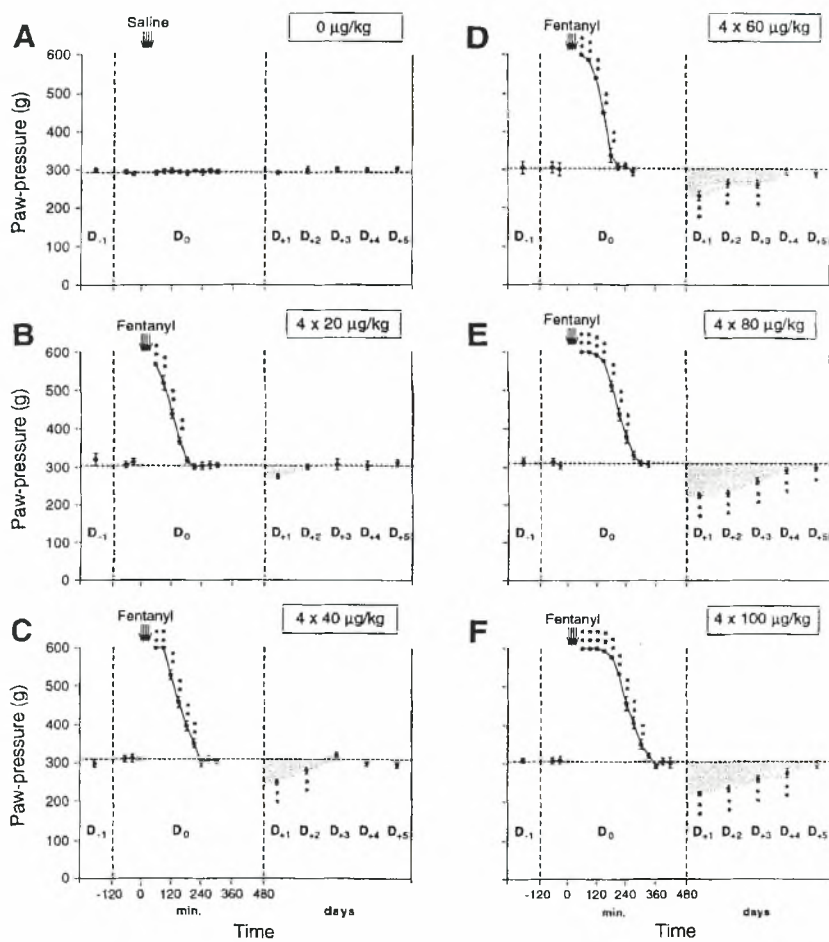
Η υπεραλγησία που προκαλεί η ηρωίνη μελετήθηκε επίσης εφαρμόζοντας δύο διαφορετικά μοντέλα χορήγησης της σε αρουραίους: συνεχή έγχυση και μία μόνο δόση (Celerier et al, 2001). Και στα δύο πρωτόκολλα χορήγησης εμφανίζεται αυξημένη ευαισθησία στον πόνο αρκετές ημέρες μετά τη διακοπή χορήγησής της. Μάλιστα όσο μεγαλύτερη ήταν η μείωση του ουδού του άλγους τόσο μεγαλύτερη ήταν η καθυστέρηση της επιστροφής του ουδού του πόνου στο βασικό επίπεδο.

Επιπλέον, έρευνες έχουν διαπιστώσει την ανάπτυξη υπεραλγησίας σε πειραματόζωα όχι μόνο κατά την απόσυρση, αλλά και κατά τη διάρκεια της έκθεσης του οργανισμού σε οπιοειδή (Mao et al., 1994; Vanderah et al., 2001). Κατά συνέπεια, τόσο η μακρόχρονη όσο και η οξεία χορήγηση οπιοειδών έχει ως αποτέλεσμα αφενός την ελάττωση της αναλγητικής δράσης τους, λόγω της απευαισθητοποίησης, και αφετέρου την ανάπτυξη ενός μηχανισμού υπεραλγησίας. Η ανάπτυξη αντοχής-υπεραλγησίας περιπλέκει τη χρήση των οπιοειδών για την αντιμετώπιση του πόνου.

Η Celerier (2000) δοκίμασε ένα πειραματικό μοντέλο πρόκλησης υπεραλγησίας σε αρουραίους. Το σημαντικό του πείραματος αυτού είναι ότι μελέτησε την υπεραλγησία που προκαλεί η φεντανύλη σε μη τραυματισμένα ζώα για αρκετές ημέρες μετά την διακοπή της χορήγησής της. Χορηγήθηκε φεντανύλη σε τέσσερις δόσεις (20, 40, 60, 80 και 100γ/kg υποδορίως με μεσοδιάστημα 15min και συνολική δόση 80, 160, 240, 320 και 400γ/kg αντιστοίχως). Την πρώτη ημέρα της χορήγησης της φεντανύλης (Do) κατέγραψε την αναλγητική του δράση. Την επομένη όμως (D+1) παρατήρησε ότι η

αντοχή στον πόνο των αρουραίων που έλαβαν φεντανύλη ήταν μειωμένη σε σχέση με την ομάδα μαρτύρων. Η αύξηση του οδού του πόνου στην ομάδα που έλαβε φεντανύλη διατηρήθηκε τις επόμενες επτά ημέρες. Μάλιστα όσο μεγαλύτερη ήταν η συνολική δόση που χορηγήθηκε τόσο μεγαλύτερη ήταν η προκαλούμενη υπεραλγησία (εικ.2). Το φαινόμενο της υπεραλγησίας δεν φαίνεται να οφείλεται στην παρουσία αλγογόνου ερεθίσματος, καθώς παρατηρήθηκε και σε ζώα στα οποία χορηγήθηκαν οπιοειδή αλλά δεν είχαν εκτεθεί σε αλγογόνο ερέθισμα (Laulin et al, 1998; Celerier et al, 2000).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η χορήγηση ανταγωνιστών των NMDA υποδοχέων MK-801 (Laulin et al, 1998) και κεταμίνης (Celerier et al, 2000) πριν από τη χορήγηση ηρωίνης και φεντανύλης αντίστοιχα, εμποδίζει την εμφάνιση υπεραλγησίας αφήνοντας ανεπηρέαστη την αναλγητική τους δράση. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της υπεραλγησίας.



**Εικ. 2.** Διάφορες δόσεις φεντανύλης όπως αξιολογήθηκαν με το *paw-pressure vocalization test*. Οι εγχύσεις φεντανύλης ή φυσιολογικού ορού έγιναν την ημέρα της δοκιμασίας (D<sub>0</sub>). Το επίπεδο του ουδού (*basal nociceptive threshold*) εκτιμήθηκε την προηγούμενη ημέρα της δοκιμασίας, πριν την οποιαδήποτε χορήγηση, τις ημέρες D<sub>-1</sub> και D<sub>0</sub>, 4-6 h μετά τη χορήγηση την ημέρα D<sub>0</sub> και στη συνέχεια καθημερινά για 5 ημέρες (D<sub>1-5</sub>). Για κάθε πείραμα η δόση της φεντανύλης ή του φυσιολογικού ορού ήταν (20, 40, 60, 80, and 100 γ/kg, υποδορίως, κάθε 15-min (βέλη), με συνολικές δόσεις 80,160, 240, 320, και 400γ/kg, αντίστοιχα. Η γκριζα περιοχή αντιπροσωπεύει τη μακρόχρονη (*long-lasting*) επίδραση της φεντανύλης **\*\*p < 0.01** (Dunnett test) συγκρινόμενη με τις τιμές ελέγχου (*basal nociceptive threshold*).

Η χορήγηση κεταμίνης σε πολύ μικρή δόση, η οποία από μόνη της δεν έχει καμία αναλγητική δράση, σε αρουραίους σε συνδιασμό με τη συνεχή έγχυση αλφεντανύλης (για 4 ώρες) εμπόδισε την εμφάνιση της υπεραλγησίας 23 ώρες μετά το τέλος έγχυσης της αλφεντανύλης (Kissin et al, 2000).

Πολλές κλινικές μελέτες έδειξαν την αποτελεσματικότητα της κεταμίνης, του μόνου κλινικά διαθέσιμου ανταγωνιστή των NMDA υποδοχέων, στην αντιμετώπιση του μετεγχειρητικού πόνου. Το 1999 ο Schmid δημοσίευσε μία αναδρομική μελέτη συγκεντρώνοντας όλες τις δημοσιεύσεις από το 1996 έως το 1998 για τη χρήση και την απόδοση υπαναισθητικών δόσεων κεταμίνης στη διαχείριση του μεταγχειρητικού άλγους. Το συμπέρασμα ήταν ότι «η προσθήκη υπαναισθητικών δόσεων κεταμίνης σε συνδυασμό με οπιοειδή βελτιώνει σημαντικά την ένταση του άλγους (pain score), μειώνει τις απαιτήσεις για αναλγητικά και την περιοχή της υπεραλγησίας γύρω από την τομή» (Schmid et al, 1999). Η προσθήκη υπαναισθητικών δόσεων κεταμίνης (0,5mg/kg) 30min πριν τη χειρουργική τομή μειώνει σημαντικά τη μηχανική υπεραλγησία γύρω από τη χειρουργική τομή ασθενών που υποβάλλονται σε επέμβαση αφαίρεσης αδενοκαρκινώματος του εντέρου (Kock et al, 2001) και τις απαιτήσεις σε οπιοειδή αναλγητικά μετεγχειρητικά. Η συγχορήγηση S-κεταμίνης (δεξιόστροφης κεταμίνης) και remifentanyl εμποδίζει την εμφάνιση υπεραλγησίας, η οποία παρατηρείται μετά την απόσυρση της έγχυσης του remifentanyl, ενισχύοντας την υπόθεση ότι τα οπιοειδή ενεργοποιούν τους NMDA υποδοχείς (Koppert, 2003). Η προσθήκη κεταμίνης στο σχήμα αναισθησίας ασθενών που υποβάλλονται σε κοιλιακή επέμβαση, σε συνδιασμό με το remifentanyl, διεγχειρητικά μειώνει τη συνολικά χορηγούμενη ποσότητα του remifentanyl, μετεγχειρητικά μειώνει κατά 33% τις ανάγκες σε οπιοειδή και παρατείνει το χρόνο μέχρι την πρώτη ζήτηση για μορφίνη. Συνεπώς η κεταμίνη εμποδίζει την εμφάνιση της υπεραλγησίας (ή αντοχής όπως αναφέρεται από τον Guignard) η οποία παρατηρείται στην ομάδα του remifentaniil (Guignard et al, 2002). Παρόμοιες είναι και οι παρατηρήσεις του Roytblat (1993) σε ασθενείς οι οποίοι υποβλή-

θηκαν σε χολοκυστεκτομή και έλαβαν επιπλέον κεταμίνη 15min πριν την τομή.

Η συγχορήγηση κεταμίνης και οπιοειδούς βελτιώνει σημαντικά την ανακούφιση του πόνου ασθενών με σοβαρή χολόλιθιαση, συγκριτικά με αυτούς που λαμβάνουν μόνο οπιοειδή. Μάλιστα η ανακούφιση από τον πόνο στην ομάδα της κεταμίνης διαρκεί 5 ημέρες μετά τη χορήγηση της κεταμίνης (Mitchell et al, 2002). Η προσθήκη μικρής δόσης κεταμίνης (0,15mg/kg) σε συνδυασμό με τα οπιοειδή μειώνει το μετεγχειρητικό άλγος ασθενών που υποβάλλονται σε αρθροσκοπική μηνισκεκτομή, μειώνει τις ανάγκες σε αναλγητικά και το χρόνο αποκατάστασης (Menigaux et al, 2001). Τα ίδια έχουν παρατηρηθεί και σε ασθενείς οι οποίοι υποβάλλονται σε μείζονα επέμβαση στο θώρακα ή στην άνω κοιλία (Chia et al, 1998).

Η υπεραλγησία χαρακτηρίζεται από αυξημένη απάντηση σε επώδυνα ερεθίσματα. Σημαντικό χαρακτηριστικό της υπεραλγησίας είναι ότι η μείωση του οδού του πόνου εξαπλώνεται από το σημείο τραυματισμού σε μη βλαμμένες περιοχές (Coderre et al, 1987). Η εξάπλωση της υπεραλγησίας είναι αποτέλεσμα της διέγερσης νευρώνων του νωτιαίου μυελού, προκαλώντας τη διευκόλυνση της διέγερσης γειτονικών νευρώνων. Η πρωτοπαθής υπεραλγησία (primary hyperalgesia) οφείλεται σε περιφερική ευαισθητοποίηση, η δευτεροπαθής όμως (secondary), η οποία εξαπλώνεται πέρα από το σημείο της βλάβης, οφείλεται σε κεντρικό μηχανισμό. Η ευαισθητοποίηση των οπισθίων κεράτων αποδεικνύεται επίσης από την αυξημένη διέγερση των μυϊκών αντανακλαστικών και την αυξημένη δραστηριότητα των φυγόκεντρων νευρώνων. Η αυξημένη δραστηριότητα των τελευταίων διατηρείται ακόμη και μετά τη χορήγηση τοπικών αναισθητικών, υποδεικνύοντας ότι η κεντρική και όχι η περιφερική δραστηριότητα προκαλεί και διατηρεί το φαινόμενο αυτό (Woolf, 1983). Με αυτόν τον τρόπο η υπεραλγησία εξαρτάται από την αύξηση της δραστηριότητας του νωτιαίου μυελού, η οποία παράγεται από τον τραυματισμό, αλλά δεν χρειάζεται συνεχές ερέθισμα για να διατηρηθεί.



Σε ασθενείς οι οποίοι υποβλήθηκαν σε νεφρεκτομή εξετάστηκε η παρουσία επώδυνων σημείων γύρω από τη χειρουργική τομή και η εξάπλωση της περιοχής εμφάνισης υπεραλγησίας (Stubhaug et al, 1997). Στην ομάδα της κεταμίνης ήταν πολύ μειωμένη η έκταση της περιοχής όπου εμφανίζονταν ανώμαλα επώδυνα ερεθίσματα. Η εξάπλωση του πόνου «wind up pain» εμφανιζόταν συχνότερα στην control ομάδα μετά την 3<sup>η</sup> ημέρα σε σύγκριση με την ομάδα της κεταμίνης. Η παρουσία μιας μεγάλης περιοχής υπεραλγησίας μετά από εφαρμογή μηχανικών επώδυνων ερεθισμάτων στην ομάδα ελέγχου οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η κεντρική ευαισθητοποίηση στο άλγος εμφανίζεται στην άμεση μετεγχειρητική φάση παρά την περιεγχειρητική κάλυψη με επαρκή ποσότητα οπιοειδών.

## 2.1 Μηχανισμός υπεραλγησίας

Έχει προταθεί ότι κατά την ανάπτυξη της αντοχής και της υπεραλγησίας ενέχεται ένας κοινός κυτταρικός μηχανισμός. Συγκεκριμένα θεωρείται ότι, η δέσμευση ενός εξωγενώς χορηγούμενου οπιοειδικού αγωνιστή, όπως η μορφίνη, σε ένα μετασυναπτικό μ-οπιοειδικό υποδοχέα προκαλεί μέσω της ενεργοποίησης G-πρωτεϊνών τη μετατόπιση/ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Η ενεργοποίηση της PKC προκαλεί:

α) αποσύνδεση των μ-οπιοειδικών υποδοχέων από τις G-πρωτεΐνες οι οποίες είναι συζευγμένες ή/και ρυθμίζουν της ενεργοποίηση διαύλων  $K^+$  με τους οποίους σχετίζονται οι οπιοειδικοί υποδοχείς (απευαισθητοποίηση -ανοχή).

β) άρση του αποκλεισμού του διαύλου NMDA από το  $Mg^{2+}$ , με συνέπεια την αυξημένη ενεργοποίηση των υποδοχέων τύπου NMDA και την εισροή ιόντων  $Ca^{2+}$  είτε μέσω των διαύλων NMDA είτε μέσω τασεοελεγχόμενων διαύλων ασβεστίου που ενεργοποιούνται λόγω της προκαλούμενης εκπόλωσης της μετασυναπτικής μεμβράνης (Chen and Huang, 1991). Η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου μετασυναπτικά προκαλεί την περαιτέρω ενεργοποίηση της PKC με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση περισσο-

τέρων NMDA υποδοχέων και νέα είσοδο ασβεστίου με επακόλουθη ενεργοποίηση της ασβέστιο-καλμοδουλίνης-εξαρτώμενης συνθετάσης της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου. Η συνεπαγόμενη παραγωγή NO συμβάλλει στην αύξηση της προσυναπτικής απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών και κατά συνέπεια στην παρατεταμένη αύξηση της συναπτικής αποτελεσματικότητας (υπερευασθησία -υπεραλγησία) (Mao et al., 1995).

### 3. ΟΠΙΟΕΙΔΕΙΣ ΥΠΟΛΟΧΕΙΣ

Η χρήση των οπιοειδών παραμένει η πιο συχνή μέθοδος για την αντιμετώπιση του περιεγχειρητικού και μετεγχειρητικού πόνου και αποτελεί το θεμέλιο για την αντιμετώπιση καταστάσεων που κυμαίνονται από τον οξύ έως τον χρόνιο πόνο, καρκινικό και μη, και χρησιμοποιούνται ως θεραπεία υποκατάστασης για την απεξάρτηση.

Με τον όρο οπιοειδή νοούνται όλες οι φυσικώς απαντώμενες ουσίες καθώς και τα συνθετικά και ημισυνθετικά παράγωγά τους, τα οποία προκαλούν αναλγησία μέσω της σύνδεσής τους με ειδικές πρωτεΐνες, τους υποδοχείς των οπιοειδών.

Από την πρώτη εμφάνισή του στη γη, ο άνθρωπος κατέβαλε προσπάθειες για να αντιμετωπίσει τον πόνο. Οι πρώτες αναφορές για χρήση αναλγητικών ναρκωτικών ουσιών γίνεται από τον Πλίνιο, ο οποίος περιγράφει τα μέσα που χρησιμοποιούσαν πριν από 5000 χρόνια οι Αιγύπτιοι για αναλγησία: «...χρησιμοποιούσαν τον λίθο της μένφιδος, του οποίου η σκόνη προκαλεί τοπική αναισθησία». Το 3000π.Χ οι Σουμέριοι απομόνωσαν το όπιο από την κάψουλα του καρπού. Ήδη το 2250 π.Χ. οι Βαβυλώνιοι χορηγούσαν κονιορτοποιημένη ινδική κάνναβη εντός μαστίχας για τη θεραπεία της οδονταλγίας. Οι αρχαίοι Έλληνες γνώριζαν τις ηρεμιστικές και αναλγητικές ιδιότητες του οπίου, το οποίο η Ωραία Ελένη αναμείγνυε με κρασί για να καταπολεμήσει τη μελαγχολία και να ανακουφίσει τον πόνο. Ο Ιπποκράτης υποστήριζε ότι η ανακούφιση από τον πόνο είναι θείο έργο και δίδασκε τους μαθητές του ότι το ευγενέστερο αντικείμενο των φροντίδων τους είναι η αναλγησία.

Τα οπιοειδή ασκούν τη δράση τους συνδεδεμένα με υποδοχείς που διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες: τους μ, τους δ, τους κ και τους ORL -1 (orphan receptor-like-1). Παρόλο που οι ORL-1 είναι ομόλογοι των παραδοσιακών υποδοχέων, η συγγένεια των οπιοειδών πεπτιδίων και των οπιούχων αλκαλοειδών με αυτούς είναι χαμηλή. Η ύπαρξη των σ και ε υποδοχέων σήμερα δεν υποστηρίζεται

και οι δράσεις που τους αποδίδονταν θεωρούνται ότι είναι έργο των άλλων υποδοχέων. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί τρεις οικογένειες ενδογενών πεπτιδίων οι οποίες δρουν ως αγωνιστές οπιοειδών αγωνιστών, οι εγκεφαλίνες, οι ενδορφίνες και οι δυνορφίνες. Το ενδογενές οπιοειδές σύστημα κατανέμεται ευρύτατα στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα και λειτουργεί ως νευροδιαβιβαστής, νευρορυθμιστής και σε ορισμένες περιπτώσεις ως νευροορμονικό σύστημα.

Οι οπιοειδείς υποδοχείς διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη λειτουργία, την κατανομή και τη συγγένεια για τα διάφορα οπιοειδή, ενδογενή και μη (πιν.2). Οι παραπάνω υποδοχείς διακρίνονται περαιτέρω σε υποκατηγορίες, με βάση τις διαφορετικές φαρμακολογικές ιδιότητες, στους  $\mu_1$  και  $\mu_2$ ,  $\delta_1$  και  $\delta_2$  και  $\kappa_{1-4}$  υποδοχείς (Yaksh, 1997).

Οι οπιοειδείς υποδοχείς ανήκουν σε μία κατηγορία υποδοχέων που είναι συζευγμένοι με G πρωτεΐνες και προκαλούν αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης και των τασεοεξαρτόμενων διαύλων ασβεστίου (Childers et al, 1993; Moises et al., 1994). Επιπρόσθετα, οι οπιοειδείς υποδοχείς ενεργοποιούν διαύλους καλίου που συνδέονται με G πρωτεΐνες ( $G_{irk}$ ) με αποτέλεσμα την υπερπόλωση νευρώνων σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ (Williams et al., 1982; Madison and Nicoll 1988). Όλες οι παραπάνω επιδράσεις που προκαλούνται από την ενεργοποίηση των οπιοειδών υποδοχέων έχουν ως αποτέλεσμα την αναστολή της νευρωνικής δραστηριότητας.

Στον εγκέφαλο μ-υποδοχείς εντοπίζονται σε προσυναπτικές και μετασυναπτικές θέσεις στο στέλεχος, το φλοιό, το θάλαμο, στο μεσεγκέφαλο, στην περί τον υδραγωγό φαιά ουσία, στον πυρήνα της μεγάλης ραφής και στον προμήκη όπου και συναπαρτίζουν ένα κατιόν ανασταλτικό σύστημα που τροποποιεί τη μετάδοση του πόνου στο νωτιαίο μυελό. Οι δ-υποδοχείς ανευρίσκονται σε μεγαλύτερη πυκνότητα στον οσφρητικό βολβό, το κερκοφόρο κέλυφος, τον υποθάλαμο και το νεοφλοιό (Yaksh, 1997).

*Πίνακας 2. Κλινικές δράσεις υποδοχέων οπιοειδών*

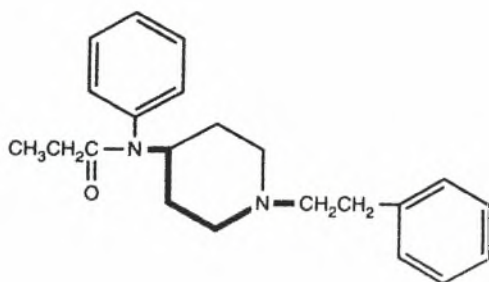
μ	κ	δ
Αναλγησία	Αναλγησία	Αναλγησία
Ευφορία	Μύση	Αναπνευστική καταστολή
Κατασταλτική δράση	Κατασταλτική δράση	Ψυχομιμητική δράση
Αναπνευστική καταστολή	δυσφορία	
Μύση		
Βραδυκαρδία		
Ναυτία, έμετος		
Υποθερμία		
Μυϊκή δυσκαμψία		
Κατακράτηση ούρων		
Φυσική εξάρτηση		
↓κινητικότητα		
γαστρεντερικού σωλήνα		

Στον ιπλόκαμπο οι οπιοειδείς υποδοχείς είναι κυρίως υποδοχείς τύπου μ και δ. Οι κ<sub>1</sub> οπιοειδικοί υποδοχείς δεν απαντώνται στα νευρικά κύτταρα του ιπποκάμπου, ενώ οι υποδοχείς τύπου κ<sub>2</sub> απαντώνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Unterwald et al., 1991).

### **3.1. Φεντανύλη (Fentanyl)**

Η φεντανύλη είναι ένα οπιοειδές που χρησιμοποιείται στην αναισθησία πάνω από 40 χρόνια. Η σύνθεσή της έγινε στο τέλος της δεκαετίας του '50 στην προσπάθεια δημιουργίας ενός αναλγητικού το οποίο θα συνδύαζε ισχυρή αναλγητική δράση και λιγότερες επιπλοκές σε σχέση με αυτές που εμφάνιζαν η μορφίνη και η

πεθιδίνη. Είναι αμιγής μ αγωνιστής, συνθετικό παράγωγο της φενυλπiperιδίνης και ο χημικός της τύπος είναι (εικ.3):



*Εικ.3. Ο χημικός τύπος της φεντανύλης.*

Είναι 80-100 φορές ισχυρότερη από την μορφίνη και έχει καθιερωθεί στην αντιμετώπιση του χειρουργικού πόνου διεγχειρητικά και μετεγχειρητικά. Δεν επηρεάζει σοβαρά την καρδιαγγειακή λειτουργία και δεν προκαλεί καταστολή της συσταλτικότητας του μυοκαρδίου καθώς δεν ευαισθητοποιεί την καρδιά στις κατεχολαμίνες. Προκαλεί βραδυκαρδία λόγω ερεθισμού του κεντρικού πυρήνα του πνευμονογαστρικού αλλά και λόγω αποκλεισμού της χρονότροπης δράσης του συμπαθητικού (Μπαλαμούτσος 2002). Η φεντανύλη, όπως και όλα τα οπιοειδή, καταστέλλει τον αερισμό και ιδιαίτερα την αναπνευστική συχνότητα. Αυξάνει τον ουδό άπνοιας και μειώνει την απάντηση στο υποξικό ερέθισμα (Morgan, 1992). Ελαττώνει την κατανάλωση οξυγόνου από τον εγκέφαλο, την εγκεφαλική αιματική ροή και την ενδοκράνια πίεση. Ο ερεθισμός της χημαιοευαίσθητης ζώνης είναι υπεύθυνος για την υψηλή συχνότητα ναυτίας και εμέτου. Καταστέλλει την απάντηση των ορμονών (κατεχολαμινών, κορτιζόλης, αντιδιουρητικής ορμόνης) στο stress.

Χορηγείται από όλες σχεδόν τις οδούς, ενδοφλέβια, ενδομυϊκά, υποδορίως, διαβλεννογόνια, per os. Συνδέεται με τις αλβουμίνες και την α<sub>1</sub>-οξυγλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος σε ποσοστό 80-85% σε pH 7,4. Το μη ιονισμένο και μη συνδεδεμένο με τις πρωτεΐ-

νες κλάσμα αποτελεί το ενεργό κλάσμα. Λόγω της υψηλής λιποδιαλυτότητας διέρχεται ταχύτατα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό με αποτέλεσμα την ταχύτετη έναρξη δράσης της και τη σύντομη διάρκειά της. Η μέγιστη δράση της φεντανύλης στο κεντρικό νευρικό σύστημα παρουσιάζεται 5-7 λεπτά μετά την ενδοφλέβια ένεσή της και ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι 260min (Gilman, 1990). Η φεντανύλη απομακρύνεται από το πλάσμα μέσω βιομετατροπής της στο ήπαρ, όπου υφίσταται N-απομεθυλίωση. Μεταβολίζεται σε νορφεντανύλη στο ήπαρ και στο έντερο γι'αυτό έχει μικρή βιοδιαθεσιμότητα από το στόμα. Ωστόσο μπορεί να χορηγηθεί επιτυχώς από το βλεννογόνο του στόματος. Η νορφεντανύλη έχει μικρή αναλγητική ισχύ και μόνο 6% της δόσης της φεντανύλης απεκκρίνεται αναλλοίωτη στα ούρα (Γκιάλα, 1998).

#### 4. NMDA ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

Οι υποδοχείς NMDA ανήκουν στους ιοντοτρόπους υποδοχείς, δηλαδή στους υποδοχείς που ελέγχουν άμεσα διαύλους ιόντων. Είναι ετερομερείς και σχηματίζονται από τη σύνδεση τεσσάρων πρωτεϊνικών υπομονάδων (Behe et al., 1995). Οι υπομονάδες που απαρτίζουν τον υποδοχέα NMDA προέρχονται από δύο, κυρίως, οικογένειες γονιδίων: την NMDAR1 και την NMDAR2 (Hollmann et al., 1994). Σχετικά πρόσφατα, ανακαλύφθηκε και μια τρίτη οικογένεια γονιδίων, η NMDAR3 (Dingledine et al., 1999). Οι οικογένειες NMDAR1 και NMDAR3 κωδικοποιούν τη σύνθεση μιας υπομονάδας του NMDA υποδοχέα της NR1 και NR3A, αντίστοιχα. Αντίθετα, η οικογένεια NMDAR2 που αποτελείται από τέσσερα διαφορετικά γονίδια κωδικοποιεί τη σύνθεση τεσσάρων διαφορετικών πρωτεϊνικών υπομονάδων, τις NR2A-2D (Hollmann and Heinemann, 1994). Η συμμετοχή της NR1 υπομονάδας στη δημιουργία των NMDA υποδοχέων είναι απαραίτητη για τη συγκρότηση λειτουργικών διαύλων. Οι NR2 πρωτεϊνικές υπομονάδες είναι ρυθμιστικές και συνδυαζόμενες χωριστά με τις NR1 υπομονάδες συγκροτούν διαύλους με διακριτές φυσιολογικές και φαρμακολογικές ιδιότητες (Mori and Mishina, 1995). Η συμμετοχή της NR3 υπομονάδας στο σχηματισμό των NMDA υποδοχέων έχει ως αποτέλεσμα τη συγκρότηση ενός διαύλου ελαττωμένης αγωγιμότητας και διαπερατότητας στο  $Ca^{2+}$  (Das et al., 1998). Σε διαφορετικές περιοχές του ΚΝΣ απαντώνται υποδοχείς NMDA με διαφορετική σύσταση υπομονάδων. Τα υψηλότερα επίπεδα υποδοχέων NMDA του εγκεφάλου έχουν ανιχνευθεί στον ιππόκαμπο και συγκεκριμένα στην περιοχή CA1 με σύσταση υπομονάδων δύο NR1 και δύο NR2. Επιπλέον, σε ενδονευρώνες της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου έχουν ανιχνευθεί υποδοχείς με σύσταση υπομονάδων δύο NR1 και δύο NR2C ή δύο NR2D (Monyer et al., 1994).

Η διέγερση των υποδοχέων NMDA προκαλεί αυξημένη εισροή ιόντων  $Ca^{2+}$  η οποία ενεργοποιεί έναν αριθμό δεύτερων και τρί-



των αγγελιοφόρων. Συγκεκριμένα, η αύξηση του ενδοκυττάρου  $Ca^{2+}$  έχει ως αποτέλεσμα την μετατόπιση/ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης (PKC) (Alkon and Rasmussen, 1988) η οποία, δια μέσου φωσφορυλίωσης, προκαλεί άρση του αποκλεισμού του διαύλου NMDA από το  $Mg^{2+}$  με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή του. Αποτέλεσμα αυτού είναι η αυξημένη εισροή  $Ca^{2+}$  δια μέσου είτε των διαύλων NMDA είτε τασεοελεγχόμενων διαύλων  $Ca^{2+}$  που ενεργοποιούνται λόγω της προκαλούμενης εκπόλωσης της μετασυναπτικής μεμβράνης. Η αύξηση του ενδοκυττάρου  $Ca^{2+}$  προκαλεί επίσης την ενεργοποίηση ενός ασβεστιο-καλμοδουλίνης εξαρτώμενου ενζύμου, συνθετάση της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (NOS). Το ένζυμο αυτό ρυθμίζει τη σύνθεση της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου ( $NO^{\cdot}$ ) η οποία μπορεί να διαχέεται ελεύθερα διαμέσου της μεμβράνης του κυττάρου και να δρά στον προσυναπτικό νευρώνα. Η  $NO^{\cdot}$  είναι ένα ρυθμιστικό μόριο με μεγάλη λιποδιαλυτικότητα και ικανότητα διάχυσης. Η παλίνδρομη κίνησή του στις τελικές νευρικές απολήξεις έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της απελευθέρωσης γλουταμινικού οξέος. Με αυτόν τον τρόπο η αρχική απελευθέρωση ακόμα και ενός μικρού ποσού γλουταμινικού οξέος είναι ικανή να πυροδοτήσει την έκλυση ολοένα και μεγαλύτερων ποσοτήτων του ίδιου διαβιβαστή ενισχύοντας την εκπόλωση του αλγοανταποκρινόμενου νευρώνα και τελικά ολοκληρώνοντας τη διαδικασία «φόρτισης». Διακοπή του παραπάνω κύκλου με τη χορήγηση σε πειραματόζωα αναστολέων της NOS (αναστολέας της συνθετάσης της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου), όπως είναι ο μεθυλεστέρας της L-N-νιτρο-αργινίνης, μπορεί να αποφέρει ανακούφιση από το άλγος. Η  $NO^{\cdot}$  διεγείρει τη γουανυλική κυκλάση η οποία προκαλεί τη σύνθεση του κυκλικού GMP (cGMP). Το αυξημένο cGMP στον προσυναπτικό νευρώνα αυξάνει την έκκριση κυστιδίων που περιέχουν νευροδιαβιβαστές με αποτέλεσμα την αυξημένη δραστηριότητα του μετασυναπτικού νευρώνα (O'Dell et al., 1991, Arancio et al., 1995). Επιπρόσθετα, η  $NO^{\cdot}$  μπορεί να δράσει έμμεσα αυξάνοντας την απελευθέρωση  $Ca^{2+}$ , μετασυναπτικά, από ενδοκυττάρια αποθήκες ευαίσθητες σε ρυανοδίνη (ryanodine) (Willmott et al., 1996), αλλά και να αυξήσει την αγωγιμότητα

τητα υποδοχέων AMPA διαμέσου της φωσφορυλίωσης που προκαλεί η ενεργοποίηση της CaM K II.

#### **4.1 Ο ρόλος των υποδοχέων NMDA στη διαβίβαση του πόνου**

Οι NMDA υποδοχείς παίζουν σημαντικό ρόλο σε μακροπρόθεσμες προσαρμοστικές μεταβολές συμμετέχοντας σε διαδικασίες σχετικά με τη μάθηση και τη μνήμη, όπως η νευρωνική πλαστικότητα (synaptic plasticity) π.χ. η μακρόχρονη ενδυνάμωση (long-term potentiation, LTP) και η καταστολή (long-term depression, LTD) (Malenka and Nicoll, 1993).

Όσον αφορά τον ιππόκαμπο, χορήγηση ανταγωνιστών των υποδοχέων NMDA (AP5) στη περιοχή της οδοντωτής έλικας, πριν από την πρόκληση πόνου με τη δοκιμασία της ένεσης φορμαλίνης, έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή αναλγησίας (McKenna and Melzack, 2001). Σημειώνεται ότι η συγκεκριμένη δοκιμασία χρησιμοποιείται ως μοντέλο για τη μελέτη του μετεγχειρητικού πόνου. Η επίδραση της *in vivo* χορήγησης οπιοειδικών αγωνιστών στην έκφραση, λειτουργία και μετασυναπτική αποτελεσματικότητα των NMDA υποδοχέων στη CA1 περιοχή του ιπποκάμπου παραμένει ανεξερεύνητη και αποτελεί αντικείμενο έρευνας αυτής της μελέτης.

#### **4.2. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των NMDA και των οπιοειδικών υποδοχέων στη διαδικασία μεταβίβασης του πόνου**

Έχει αναφερθεί ότι η χρόνια χορήγηση μορφίνης προκαλεί προς τα κάτω (down regulation) ρύθμιση της σύνδεσης του [<sup>3</sup>H]MK-801 στο μέσο εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό (Bhargava et al, 1995). Ακόμα, επαναλαμβανόμενη έκθεση στη μορφίνη συνοδεύεται από αύξηση του επιπέδου του mRNA της NR1 υπομονάδος στον ιππόκαμπο (Le Greves et al, 1998), και της NR1 πρωτεΐνης στην περιοχή του κοιλιακού καλυπτρικού δερματίου του αρουραίου

(Fitzerald et al, 1996). Στα ενδοκυττάρια γεγονότα που ακολουθούν την ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων σημεία κλειδιά αποτελούν: α) η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού  $Ca^{++}$ , β) η συνεπακόλουθη ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) και γ) η παραγωγή της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (NO) (Alkon et al, 1988 ; Nishizuka, 1989; Mao et al., 1995). Στη συνέχεια θα συζητηθεί η συνεισφορά ενδοκυττάρων γεγονότων, που έπονται της ενεργοποίησης των NMDA υποδοχέων, στους μηχανισμούς φαινομένων οι οποίοι σχετίζονται με την ενεργοποίηση των υποδοχέων οπιοειδών (Εικ.4).

#### **4.2.1 Διάλυλοι ασβεστίου**

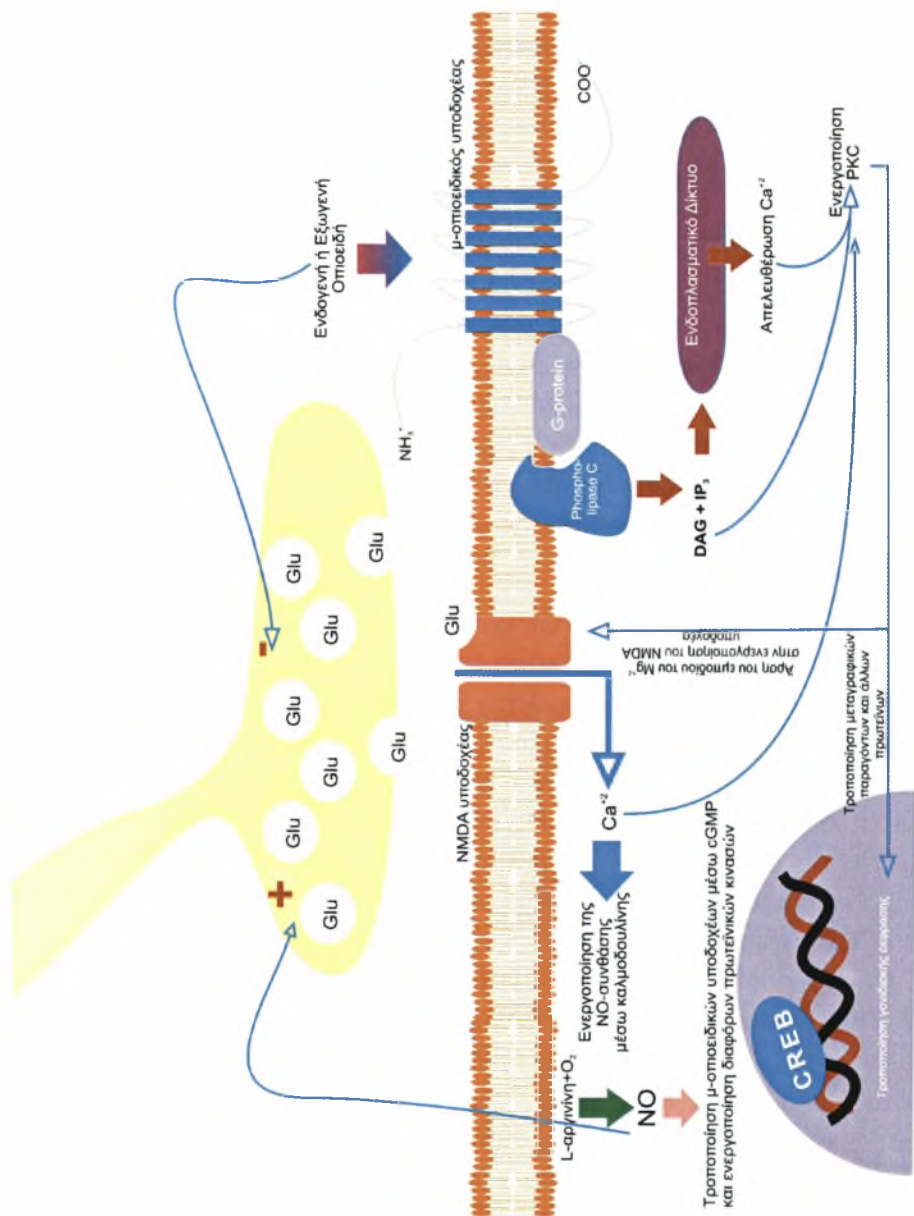
Ένας μεγάλος αριθμός πρόσφατων δημοσιεύσεων υποδεικνύει την τροποποίηση της λειτουργίας των διαύλων  $Ca^{++}$  από τη δράση των οπιοειδών (Nomura et al., 1994, Wilding et al., 1995, Vlaskovska et al., 1997). Ο μ-οπιοειδικός αγωνιστής DAMGO αναστέλλει τη δραστηριότητα διαύλων  $Ca^{2+}$  υψηλού- αλλά όχι χαμηλού-οδού σε παρασκευάσματα νευρώνων γαγγλίων της οπίσθιας μοίρας του νωτιαίου μυελού (DRG) (Nomura et al., 1997). Η αναστολή αυτή από το DAMGO διαμεσολαβείτε από υποδοχείς που σχετίζονται με τις G-πρωτεΐνες, γεγονός που υποδηλώνει τη δέσμευση του DAMGO στους μ-οπιοειδικούς υποδοχείς. Επιπλέον, η αναστολή αυτή της δραστηριότητας διαύλων  $Ca^{2+}$  από το DAMGO καταργείται μετά από προεπάση για 18 ώρες με το DAMGO, υποδεικνύοντας την ανάπτυξη ανοχής (Nomura et al., 1997). Παρόμοια αποτελέσματα αναστολής της δραστηριότητας διαύλων  $Ca^{2+}$  παρατηρούνται σε DRG νευρώνες αρουραίου μετά από χορήγηση μορφίνης (Wilding et al., 1995).

Σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες στις οποίες διαπιστώθηκε ότι η πρωτεϊνική κινάση C εμπλέκεται στην παραπάνω διαδικασία, μελέτη των Wilding et al, (1995) υποστηρίζει ότι μόνο οι διάλυλοι  $Ca^{2+}$  κοντά στους οπιοειδικούς υποδοχείς επηρεάζονται από τη μορφίνη, υποδηλώνοντας την έλλειψη εμπλοκής συστημάτων

δευτέρων μηνυμάτων στην όλη διαδικασία. Ένα περιοριστικό στοιχείο στη συγκεκριμένη μελέτη είναι ότι δεν επιτεύχθηκε σύζευξη των διαύλων  $Ca^{2+}$  με τους NMDA υποδοχείς και έτσι δεν είναι ξεκάθαρο εάν η δραστηριότητα των διαύλων  $Ca^{2+}$  σχετίζεται άμεσα με την ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων. Παρόλα αυτά, η αναστολή των διαύλων  $Ca^{2+}$  από τα οπιοειδή αντανακλά τον ρόλο των οπιοειδικών υποδοχέων στη εισροή  $Ca^{2+}$  στα κύτταρα, μια διαδικασία η οποία ως γνωστό ελέγχει τα ενδοκυττάρια γεγονότα που ακολουθούν την ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων.

#### 4.2.2 Πρωτεϊνική κινάση C (PKC)

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών συνηγορούν υπέρ της σημασίας των πρωτεϊνικών κινασών, και κυρίως της πρωτεϊνικής κινάσης C, στην ανάπτυξη αντοχής στα οπιοειδή αναλγητικά (Narita et al., 1994, 1995, 1996; Bilsky et al., 1996; Mao et al., 1994, 1995; Mayer et al., 1995). Έχει αποδειχθεί ότι η αντοχή στην μορφίνη, τη βουτορφανόλη, το DAMGO και το DELT II μπορεί να αποφευχθεί με συγχορήγηση αναστολέων της PKC [H7 για τη μορφίνη και τη βουτορφανόλη (Narita et al., 1994; Bilsky et al., 1996) GM1 για τη μορφίνη (Mao et al., 1994, 1995; Mayer et al., 1995) και καλφοστίνη C για το DAMGO και το DELT II (Narita et al., 1995, 1996)]. Αντίθετα, η αναστολή της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) δεν φαίνεται να επηρεάζει την αντοχή στα DAMGO και DELT II. Επιπλέον στοιχείο σχετικά με την εμπλοκή της PKC στην ανοχή στο DELT II αποτελεί το γεγονός ότι χορήγηση του ενεργοποιητή της PKC, PDBu, προκαλεί μείωση της αναλγητικής δράσης του DELT II η οποία μπορεί να ανατραπεί από την καλφοστίνη C, ενώ το PDBu από μόνο του δεν έχει καμία δράση στο ουδό ερεθισμού στο τεστ τινάγματος της ουράς (tail-flick test, Narita et al., 1996).



**Εικ. 4.** Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των NMDA και των οπιοειδικών υποδοχέων στη διαδικασία μεταβίβασης του πόνου

Έχει διαπιστωθεί επίσης, ότι τα μεμβρανικά επίπεδα της PKC αυξάνουν κατά την ανάπτυξη ανοτοχής στη μορφίνη στις υποστοιβάδες I και II του οπίσθιου κέρατος του νωτιαίου μυελού ενώ μειώνονται μετά από χορήγηση GM1 (Mayer et al., 1995). Τα αποτελέσματα αυτά έχουν επιβεβαιωθεί με πρόσφατες ανοσοϊστοχημικές μελέτες στις οποίες διαπιστώθηκε ότι τα μεμβρανικά επίπεδα της γ ισομορφής (PKCγ) είναι αυτά που αυξάνουν στις υποστοιβάδες I και II του οπίσθιου κέρατος του νωτιαίου μυελού μετά την ανάπτυξη ανοτοχής στη μορφίνη ενώ η εμφάνιση μεμβρανικής ανοσοδραστικότητας για την PKCγ παρεμποδίζεται με την χορήγηση MK-801 (Mao et al., 1995). Σύμφωνα με μια άλλη μελέτη, η κυτταροπλασματική και όχι η μεμβρανική PKC είναι αυτή που αυξάνει στη γέφυρα και το νωτιαίο μυελό μετά από χρόνια χορήγηση μορφίνης (Narita et al., 1994) αν και η συγγένεια δέσμευσης του PDBu σε μεμβρανική PKC αυξάνει στον εγκέφαλο σε παρόμοιες καταστάσεις (Narita et al., 1994).

Επιβεβαίωση των κυτταρικών μοντέλων ανοτοχής στη μορφίνη στα οποία υποδεικνύεται η εμπλοκή της PKC (Mao et al., 1998; Mayer et al., 1995) αποτελεί η μελέτη του Mestek (1995). Στη μελέτη αυτή, ο ανθρώπινος μ-οπιοειδικός υποδοχέας και ένας διάυλος  $K^+$  ο οποίος ενεργοποιείται από υποδοχείς που σχετίζονται με τις G-πρωτεΐνες εκφράστηκαν ταυτόχρονα σε ωοκύτταρα *Xenopus*. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η απευαισθητοποίηση των μ υποδοχέων μετά από επαναλαμβανόμενη χορήγηση μορφίνης επιτεύχθηκε τόσο από την  $Ca^{2+}$ /καλμοδουλίνη εξαρτώμενη κινάση όσο και από την PKC. Ενδιαφέρον τέλος παρουσιάζει μια επιπλέον μελέτη, η οποία δείχνει ότι ενεργοποίηση της PKC μειώνει τα επίπεδα του mRNA των μ-οπιοειδικών υποδοχέων σε ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος, υποδεικνύοντας ότι η PKC εμπλέκεται επιπλέον στη ρύθμιση των επιπέδων των μ-οπιοειδικών υποδοχέων (Gies et al., 1998). Η λειτουργική σημασία των αποτελεσμάτων αυτών στο φαινόμενο της ανοτοχής στα οπιοειδή χρίει επιπλέον μελέτης.

Σε ότι αφορά τα φαινόμενα της υπεραλγησίας και της αλλοδυνίας, σε μια πρόσφατη μελέτη ο Celerier (2004) διερεύνησε την δράση της PKCγ στις πρώιμες και καθυστερημένες απαντήσεις στην χορήγηση φεντανύλης με τη χρήση ποντικών με έλλειμμα PKCγ (PKCγ knock-outs). Από τις μελέτες αυτές διαπιστώθηκε ότι, σε φυσιολογικά ποντίκια, η αναλγητική δράση της φεντανύλη ακολουθείται από εμφάνιση παρατεταμένης υπεραλγησίας και αλλοδυνίας, ενώ η εκ των υστέρων χορήγηση ναλοξόνης αυξάνει τα επίπεδα της υπεραλγησίας και της αλλοδυνίας. Αντίθετα, στα ζώα με έλλειμμα PKCγ, παρατηρείται αύξηση της αναλγητικής δράσης της φεντανύλη καθώς επίσης και αποτροπή της εμφάνισης των φαινομένων της υπεραλγησίας και της αλλοδυνίας. Η μελέτη αυτή αποτελεί μια ακόμα επιβεβαίωση του ρόλου της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKCγ) υποδεικνύοντας την ως ένα στοιχείο κλειδί της ενεργοποίησης από τους οπιοειδικούς υποδοχείς συστημάτων ενίσχυσης της αντίληψης του πόνου που αντισταθμίζουν την αναλγητική δράση των οπιοειδών.

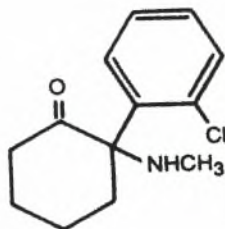
#### ***4.2.3 Ελεύθερη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου (NO)***

Έχει διαπιστωθεί ότι η ταυτόχρονη χορήγηση μορφίνης και NG-νιτρο-L-αργινίνης [L-NOARG, αναστολέας της συνθετάσης της ελεύθερης ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου (NOS)] παρεμποδίζει την ανάπτυξη ανοχής στις αναλγητικές δράσεις της μορφίνης (Kolesnikov et al., 1993; Elliott et al., 1994). Σε μια από αυτές τις μελέτες, μια και μόνο δόση L-NOARG ήταν αρκετή για να καθυστερήσει την ανάπτυξη ανοχής στη μορφίνη για αρκετές ημέρες (Kolesnikov et al., 1993). Όπως ακριβώς η επαναλαμβανόμενη χορήγηση του ανταγωνιστή των NMDA υποδοχέων LY274614 αναστρέφει την ανοχή στη μορφίνη, έτσι και η συνδυασμένη χρήση L-NOARG και μορφίνης αναστρέφει την εδραιωμένη ανοχή στη μορφίνη σε ένα χρονικό διάστημα 5 ημερών παρά την συνεχιζόμενη χορήγηση μορφίνης (Kolesnikov et al., 1993).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, η αντοχή και η εξάρτηση που προκαλεί ο μ-οπιοειδικός αγωνιστής DAMGO διαμεσολαβούνται κατά διαφορετικό τρόπο από την NO<sup>•</sup> και την PKC. Η ενδοδερμική χορήγηση DAMGO προκαλεί αντοχή και εξάρτηση στις περιφερικές αναλγητικές δράσεις του DAMGO σε πειράματα μηχανικής υπεραλγησίας με χρήση προσταγλανδίνης E<sub>2</sub> (Aley et al., 1997). Επαναλαμβανόμενη χορήγηση του DAMGO και αναστολέων της PKC αναστέλλει την από την ναλοξόνη επιταχυνόμενη υπεραλγησία που προκαλείται μετά από στέρηση του DAMGO χωρίς να επηρεάσει την ανάπτυξη ανοχής στο DAMGO. Αντίθετα, επαναλαμβανόμενη χορήγηση του αναστολέα της NO<sup>•</sup>, N-μεθυλ-L-αργινίνη, παρεμποδίζει την ανάπτυξη αντοχής χωρίς να επηρεάζει την ανάπτυξη εξάρτησης. Η επαναλαμβανόμενη χορήγηση ενεργοποιητών της PKC και προδρόμων της NO<sup>•</sup>, απουσία DAMGO, μιμούνται τις καταστάσεις εξάρτησης και αντοχής, αντίστοιχα, υποδεικνύοντας την παρουσία ενδοκυτταρικού διαχωρισμού των φαινομένων της εξάρτησης και της αντοχής (Aley et al., 1997).

### 4.3 Κεταμίνη (Ketamine)

Η κεταμίνη είναι μία αμινοκυκλοεξαμίνη, παράγωγο της φαινυλοκυκλιδίνης (εικ.5). Αλληλεπιδρά με τη θέση σύνδεσης της φαινυλοκυκλιδίνης, οδηγώντας σε σημαντική αναστολή της δραστηριότητας των NMDA υποδοχέων. Αυτό συμβαίνει μόνο όταν ο διάυλος είναι ήδη ανοικτός (Arendt-Nielsen et al, 1995).



*Εικ.5. Ο χημικός τύπος της κεταμίνης.*



Η κεταμίνη παρασκευάστηκε σε μία προσπάθεια αναζήτησης του ιδανικού αναισθητικού, εκείνου δηλαδή που θα αναισθητοποιούσε τον ασθενή αλλά θα διατηρούσε ακέραια την αναπνευστική λειτουργία. Παρασκευάστηκε από τον Steven το 1963 και εγκρίθηκε για κλινική χρήση το 1970 (Schmit, 1999). Εισήλθε στην κλινική πράξη σαν πολλά υποσχόμενη νέα αναισθητική ουσία (Μπαλαμούτσος 2002). Από τότε που ο Domino, Chidiff και ο Corssen ανέφεραν την πρώτη κλινική χρήση της κεταμίνης, πριν 40 χρόνια (Hirota, 1996), έχουν γίνει πολλές κλινικές και εργαστηριακές έρευνες για να κατανοηθεί ο μηχανισμός δράσης της και να αποφασισθεί η κατάλληλη χρήση αυτού του ασυνήθιστου αναισθητικού παράγοντα. Η κεταμίνη προκαλεί ένα μοναδικό είδος αναισθησίας που χαρακτηρίζεται ως «διαχωριστική αναισθησία» και είναι αποτέλεσμα του διαχωρισμού του θαλάμου από το μεταϊχμιακό σύστημα. Το μοναδικό αυτό είδος αναισθησίας που προκαλεί η κεταμίνη μοιάζει με καταληψία, κατά την οποία τα μάτια παραμένουν ανοικτά και το βλέμμα χαρακτηρίζεται από βραδύ νυσταγμό. Ο τόνος των σκελετικών μυών αυξάνει, η αναλγησία είναι βαθιά και αφορά το σωματικό πόνο περισσότερο παρά τον σπλαχνικό (Stoelting and Miller, 1991). Οι ασθενείς είναι αναισθητοποιημένοι και μεταναισθητικά δεν ανακαλούν τα γεγονότα του περιβάλλοντος χώρου.

Η κεταμίνη διεγείρει το συμπαθητικό νευρικό σύστημα, αυξάνοντας τον καρδιακό ρυθμό, την αρτηριακή πίεση, την καρδιακή παροχή και την πίεση στην πνευμονική αρτηρία (Morgan and Mikhail, 1992). Η επίδραση στο κυκλοφορικό αποδίδεται σε διευκόλυνση της διόδου του  $Ca^{2+}$  δια των μεμβρανών των μυοκαρδιακών ιών και των ιών του ερεθισματογωγού δεματίου (Μπαλαμούτσος 2002) και στην αναστολή της επαναπρόσληψης της νοραδρεναλίνης (Stoelting and Miller, 1991). Η κεταμίνη αυξάνει την αιμάτωση του εγκεφάλου διότι διαστέλλει έντονα τα εγκεφαλικά αγγεία. Αυξάνει επίσης τις ανάγκες οξυγόνου για το μεταβολισμό του εγκεφάλου. Η χορήγηση της κεταμίνης διευκολύνει τη διατήρηση ελεύθερου αεραγωγού, επειδή αυξάνει τον τόνο των σκελετικών μυών, ενώ τα

λαρυγγικά αντανακλαστικά καταστέλλονται μόνο ελαφρά. Έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στη θεραπεία του status asthmaticus (Sarma, 1992). Η σπασμολυτική και η αντιφλεγμονώδης δράση της, μπορεί να ενέχεται στην αποτελεσματικότητά της στην αντιμετώπιση του άσθματος.

Κύριο μειονέκτημα της κλινικής χρήσης της κεταμίνης, στο οποίο οφείλεται και ο μεγάλος περιορισμός στη χρήση της, είναι οι αντιδράσεις που παρατηρούνται κατά την αφύπνιση του αρρώστου, όπως εφιάλτες και παραισθήσεις, οι οποίες μπορεί να θέσουν σε κίνδυνο τον ασθενή.

Η κεταμίνη αντίθετα με άλλους αναισθητικούς παράγοντες δεν αλληλεπιδρά με τους GABA<sub>A</sub> υποδοχείς αλλά κυρίως με τους NMDA υποδοχείς, τους υποδοχείς οπιοειδών (επιδρά με τους  $\mu$ ,  $\kappa$  και  $\delta$  υποδοχείς), τους μουσκαρινικούς, νικοτινικούς, τους μοναμινεργικούς υποδοχείς, τους voltage sensitive διαύλους Ca<sup>2+</sup> (Hirota, 1996), ενώ αναστέλλει περιφερικά τους διαύλους Na<sup>+</sup> του ΚΝΣ. Η κεταμίνη εκλεκτικά αναστέλλει τους NMDA υποδοχείς με δύο ευδιάκριτους μηχανισμούς: μειώνει τη συχνότητα του ανοίγματος των διαύλων με έναν αλλοστερικό μηχανισμό και εμποδίζει το άνοιγμα του διαύλου συνδεδεμένη στη θέση της φαινοκυκλιδίνης με αυτόν τον τρόπο μειώνει τον χρόνο που είναι ανοιχτός ο διάυλος. Επιπλέον η κεταμίνη ενισχύει την δράση των εισπνεομένων αναισθητικών στους NMDA υποδοχείς (Hemmings and Hopkins, 2005).

Η κεταμίνη χορηγείται ενδοφλεβίως, ενδομυϊκά και από το στόμα. Η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα επιτυγχάνεται σε 10-15 λεπτά μετά την ενδομυϊκή ένεση. Είναι λιποδιαλυτή και δεσμεύεται σε μικρό βαθμό με τις πρωτεΐνες. Αυτά τα χαρακτηριστικά σε συνδυασμό με την αύξηση της εγκεφαλικής αιματικής ροής και της καρδιακής παροχής που προκαλεί η κεταμίνη, οδηγούν σε ταχεία πρόσληψη από τον εγκέφαλο και την ανακατανομή της (χρόνος ημιζωής κατανομής 10-15 λεπτά). Μεταβολίζεται στο ήπαρ και απεκκρίνεται από τους νεφρούς (Morgan, 1992).

Η κεταμίνη έχει δύο οπτικά ισομερή το αριστερόστροφο και το δεξιόστροφο. Στην κλινική πράξη είναι διαθέσιμο το ρακεμικό μίγμα που αποτελείται από ίσα μέρη των δύο ισομερών. Έχει αποδειχθεί *in vivo* ότι η S(+) κεταμίνη έχει 2-3 φορές πιο ισχυρή αναλγητική δράση, προκαλεί σπανιότερα ανεπιθύμητες ενέργειες (Hirota, 1996; Schmid, 1999) και έχει περίπου τέσσερις φορές μεγαλύτερη συγγένεια για τους NMDA υποδοχείς από την R(-) κεταμίνη (Oye et al, 1992; Hemmings and Hopkins, 2005). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το ρακεμικό μείγμα κεταμίνης καθώς είναι το μόνο το οποίο είναι εγκεκριμένο για χορήγηση στους ανθρώπους.

## 5. ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΣ

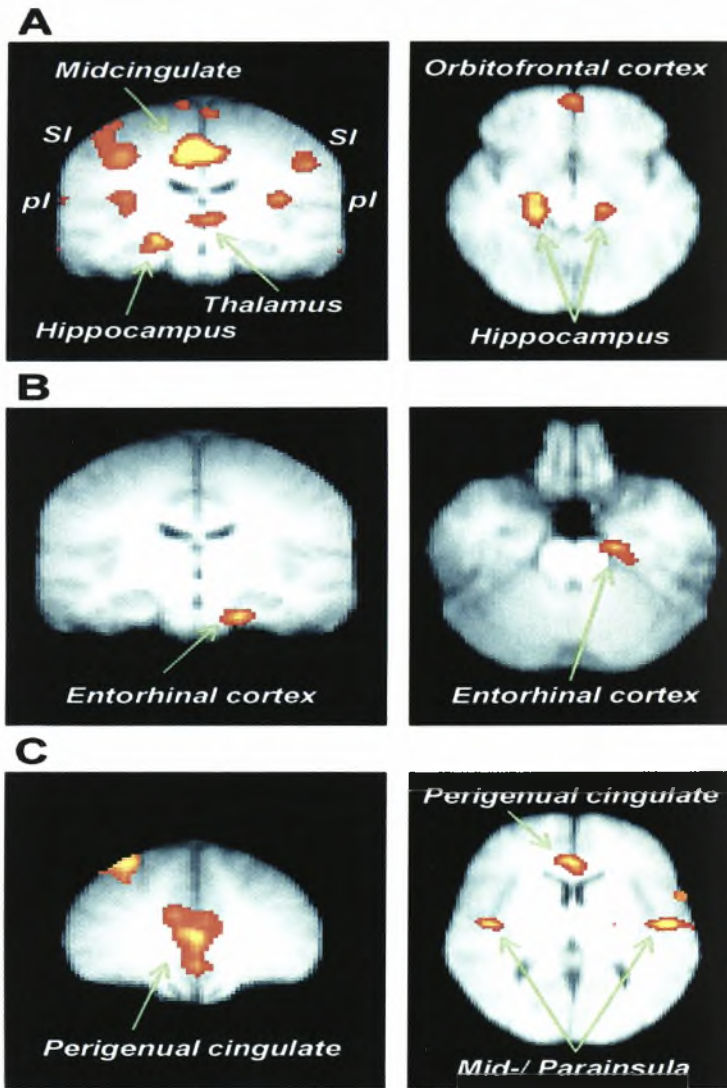
### 5.1. Ιππόκαμπος και Πόνος

Ο ιππόκαμπος είναι μια περιοχή του εγκεφάλου που έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης επιστημονικής έρευνας για δύο λόγους. Πρώτον, η ξεκάθαρα οριοθετημένη στοιβαδωτή δομή του διευκολύνει ιδιαίτερα τη μελέτη των ιδιοτήτων των νευρώνων των διαφόρων στοιβάδων, καθώς και της συνολικής λειτουργικής συμπεριφοράς του νευρωνικού δικτύου του ιπποκάμπου. Η πυραμιδική στοιβάδα του ιπποκάμπου περιέχει διεγερτικούς πυραμιδικούς νευρώνες, οι οποίοι αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων του ιπποκάμπου. Σε όλες τις στοιβάδες του ιπποκάμπου υπάρχουν ενδονευρώνες, μία ιδιαίτερα ανομοιογενής ομάδα ανασταλτικών νευρώνων, που εκλύουν γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), και αποτελούν το 10-20% των νευρώνων του ιπποκάμπου. Ο δεύτερος λόγος για το ενδιαφέρον για τον ιππόκαμπο είναι ότι από τη δεκαετία του 1950 και μετά, με αφορμή δημοσίευση των Scoville και Milner το 1957, αναφορικά με το περιστατικό του ασθενούς H.M, ο οποίος υποβλήθηκε σε εγχείρηση αφαίρεσης του ιπποκάμπου σχηματισμού και των περιβαλλόντων ιστών, αναγνωρίστηκε ο σημαντικός ρόλος του ιπποκάμπου σε κάποιες μορφές μνήμης και μάθησης. Επιπλέον, θεωρείται σημαντική η συμμετοχή του ιπποκάμπου σε παθολογικές καταστάσεις όπως στην πρόκληση επιληπτικών κρίσεων, στην εμφάνιση σχιζοφρένειας και της νόσου του Parkinson, καθώς έχει τη χαμηλότερη ουδό πρόκλησης επιληπτικών σπασμών από όλες τις εγκεφαλικές δομές (Johnston and Amaral, 1997).

Ο ιππόκαμπος αποτελεί μέρος του μεταιχμιακού συστήματος και φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη συναισθηματική επεξεργασία πληροφοριών του πόνου. Μελέτες από περιπτώσεις ασθενών που είχαν υποστεί αφαίρεση του ιπποκάμπου ή βλάβη των σημαντικότερων προσαγωγών και απαγωγών νευρικών οδών του ιπποκάμπου, κατέδειξαν σημαντική εξασθένιση της αντίληψης του πόνου (Hebben et al., 1985). Ωστόσο, λίγες πληροφορίες υπάρχουν

μέχρι στιγμής όσον αφορά τους μηχανισμούς του πρόσθιου εγκεφάλου του ανθρώπου (μέρος του οποίου αποτελεί ο ιπποκάμπειος σχηματισμός) με τους οποίους τα συναισθήματα μπορούν να συμβάλουν στην ενίσχυση της ευαισθησίας στον πόνο (Ploghaus et al., 2001).

Σημαντικές μελέτες απέδειξαν ότι η αντίληψη του πόνου σχετίζεται άμεσα με τον ιπποκάμπο. Ο κύριος όγκος των πληροφοριών σχετικά με το θέμα προέρχεται από μελέτες σε πειραματόζωα με τη χρήση μεγάλου αριθμού διαφορετικών πειραματικών προσεγγίσεων όπως: *in vitro* εξωκυττάριας (Zheng and Khanna, 1999) και ενδοκυττάριας καταγραφές (Wei et al., 2000), *in vivo* καταγραφή ηλεκτροεγκεφαλογραφήματος ιπποκάμπου (Archer and Roth, 1997), μελέτες χρησιμοποιώντας *in vivo* μικροδιάλυση (Ceccarelli et al., 1999), μελέτες έκφρασης γονιδίων (Pearse et al., 2001), μελέτες με τη χρήση της μεθόδου του λειτουργικού μαγνητικού συντονισμού (Derbyshire et al., 1997, Peyron et al., 1999). Για παράδειγμα, παρατηρήθηκε ότι, ηλεκτρική διέγερση του ραχιαίου ιπποκάμπου προκαλεί αλλαγή της αντίληψης του πόνου (Prado and Roberts, 1985). Επιπλέον, η χορήγηση του τοπικού αναισθητικού λιδοκαΐνη στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπειου σχηματισμού αρουραίων βρέθηκε ότι προκαλεί ελάττωση της αίσθησης του πόνου (McKenna and Melzack, 1992). Ο ασθενής H.M. ο οποίος υποβλήθηκε σε εγχείρηση αφαίρεσης του ιπποκάμπειου σχηματισμού παρουσίασε εξασθένιση της αντίληψης του πόνου (Ploghaus et al., 2001). Κατά τη διάρκεια ενός επώδυνου ερεθίσματος ο ιπποκάμπος αυξάνει την αντίληψη της έντασης του αλγηνού ερεθίσματος με αποτέλεσμα αυτό να γίνεται αντιληπτό ως ερέθισμα μεγαλύτερης έντασης (θεωρία McNaughton and Gray, 2000). Με τη βοήθεια της functional MRI, απεικονίστηκε η δραστηριότητα του εγκεφάλου κατά τη διάρκεια εφαρμογής επώδυνων (αυξημένης θερμοκρασίας) ερεθισμάτων και βρέθηκε αυξημένο σήμα στον ιπποκάμπο (Ploghaus et al., 2001) (εικ.6).



**Εικ.6.** *Functional Magnetic Resonance Imaging-fMRI του εγκεφάλου. Απεικονίζεται η ενεργοποίηση περιοχών του εγκεφάλου μετά από εφαρμογή ερεθίσματος υψηλής θερμοκρασίας, ανάμεσά τους και ο ιππόκαμπος (Α).*

Τέλος, δεδομένου του κεντρικού ρόλου του ραχιαίου ιπποκάμπου σε διαδικασίες μνήμης και μάθησης είναι πιθανό ότι η ενεργοποίηση της δραστηριότητας ενδονευρώνων του ραχιαίου ιπποκάμπου μετά από εφαρμογή αλγογόνου ερεθίσματος να αντανακλά την ανάπτυξη ενός μηχανισμού χωρικής μνήμης-μάθησης στα πειραματόζωα, προκειμένου να αναγνωρίζουν και να αποφεύγουν το επώδυνο ερέθισμα. Θετική ένδειξη πάνω στο θέμα αποτελεί η σχετικά πρόσφατη ανακάλυψη και μελέτη ενός πεπτιδίου, της ορφανίνης FQ. Η ορφανίνη FQ συνδεόμενη με τον υποδοχέα ORL1 ρυθμίζει την εκδήλωση υπεραλγησίας (Meunier 1997) ενώ παράλληλα μέσω της σύνδεσης του υποδοχέα ORL1 με διαύλους  $K^+$  προκαλεί στον ιππόκαμπο αναστολή του φαινομένου της μακροχρόνιας ενδυνάμωσης (Long-term potentiation-LTP) η οποία θεωρείται κυτταρικό ανάλογο της μνήμης (Ikeda et al., 1997; Yu et al., 1997)

## 5.2. Ανατομία του Ιππόκαμπου

Ο ιππόκαμπος ή ιπποκάμπειος σχηματισμός είναι μία δομή με σχήμα 'C' η οποία αποτελεί μέρος του έσω τοιχώματος του εγκεφαλικού ημισφαιρίου. Το όνομά του προέρχεται από τον ιππόκαμπο, το θαλάσσιο άλογο με το οποίο προσομοιάζει σε μετωπιαία διατομή.

Ο ιππόκαμπος αποτελεί μέρος του επιχείλιου ή μεταιχμιακού συστήματος. Παρόλο που βρίσκεται κάτω από τον εγκεφαλικό φλοιό δεν είναι πράγματι μία υποφλοιώδης δομή, αλλά ένας αναδιπλούμενος αρχαιοφλοιός πολύ πιο παλιός και πρωτογενής από τον περιβάλλοντα νεοφλοιό (Nieuwenhuys et al, 1996). Παριστάνει ένα έπαρμα μήκους 5cm το οποίο προβάλλει στο κάτω τοίχωμα του κροταφικού κέρατος της πλάγιας κοιλίας. Το πρόσθιο άκρο του, που ονομάζεται πόδας του ιπποκάμπου (ras hippocampus), είναι ογκώδες και εμφανίζει 3-4 επάρματα, τα δακτυλιοειδή επάρματα. Το οπίσθιο άκρο του βαθμιαία λεπτύνεται για να μεταπέσει τελικά στο φαιό ταινίδιο (Gray's anatomy 1995, 2004). Η κάτω επιφάνεια του ιπποκάμπου έρχεται σε σχέση με την ιπποκάμπεια έλικα, της οποίας το αντίστοιχο τμήμα καλείται για το λόγο αυτό υπόθεμα του ιππο-

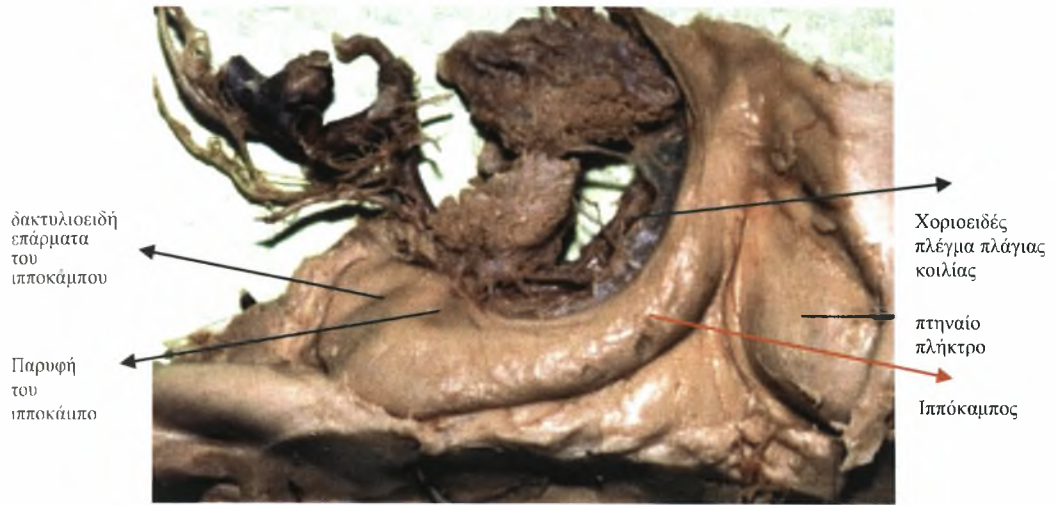
κάμπου. Βρίσκεται βαθιά στην έσω επιφάνεια του κροταφικού λοβού, καλυπτόμενος κατά μεγάλο μέρος από την παραιπποκάμπεια έλικα. (εικ.6,7).

Διακρίνεται μορφολογικά σε τρεις μοίρες: την προσυνδεσμική, την υπερσυνδεσμική και την οπισθοδεσμική. Οι δύο πρώτες μοίρες είναι σχετικώς μικρές υποτυπώδεις δομές, ενώ ο οπισθοδεσμικός ιππόκαμπος είναι καλά ανεπτυγμένος και αντιπροσωπεύει την κύρια ιπποκάμπια μοίρα του ιπποκάμπου. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα ονόματα των τριών μοιρών αναφέρονται σε σχέση με το μεσολόβιο.

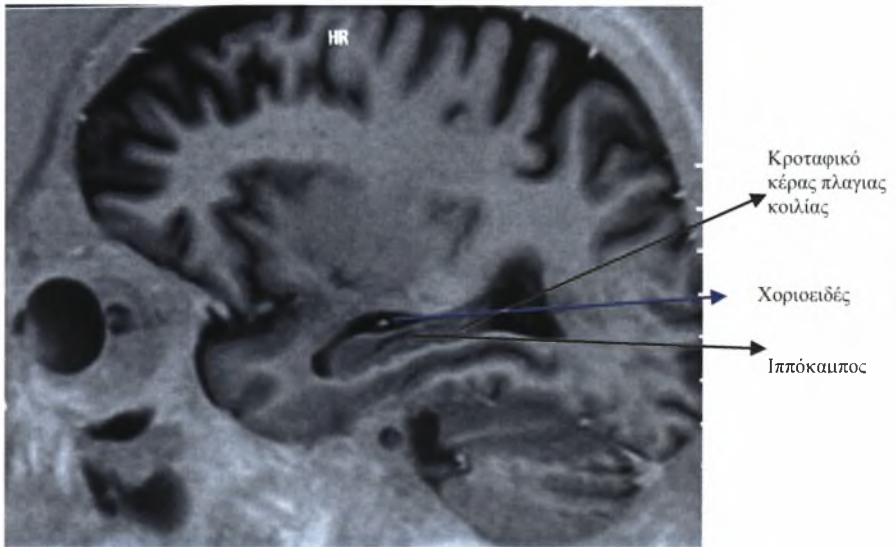
Ο οπισθοσυνδεσμικός ιππόκαμπος διαφοροποιείται σε τρεις δομές με επιμήκη διάταξη, την οδοντωτή έλικα (*dentate gyrus*), το Αμμώνιο κέρασ (*Cornu Ammon, CA*) και το υπόθεμα του ιπποκάμπου (*subiculum*). Η οδοντωτή έλικα είναι μορφολογικά το εσώτερο τμήμα του φλοιού. Προς τα έξω συνεχίζεται με το Αμμώνιο κέρασ, το οποίο με τη σειρά του συνεχίζεται με το υπόθεμα του ιπποκάμπου. Λόγω της πτύχωσης του ιπποκάμπου, η οδοντωτή ταινία βρίσκεται πάνω από την αύλακα του ιπποκάμπου και το υπόθεμα κάτω από την αύλακα αυτή. Η οδοντωτή ταινία περιέχει μία κοκκιώδη στοιβάδα με μικρούς νευρώνες, ενώ μεγάλα πυραμιδικά κύτταρα επικρατούν στο Αμμώνιο κέρασ και στο υπόθεμα του ιπποκάμπου.

Το κορυφαίο τμήμα του σχηματισμού είναι γνωστό ως ραχιαίος ιππόκαμπος και εξαιτίας της συγγένειάς του με το διάφραγμα (*septum*) ονομάζεται διαφραγματικός πόλος (*septal pole*). Το κάτω άκρο ονομάζεται κοιλιακός πόλος (*temporal pole*).





**Εικ.6.** Ιππόκαμπος ανθρώπινου εγκεφάλου. (Αρχείο Κ.Νάτση. Ανατομείο Ιατρικής Σχολής ΑΠΘ).



**Εικ.7.** Μαγνητική τομογραφία ανθρώπινου εγκεφάλου, οβελιαία τομή. (Αρχείο Κ.Νάτση).

Η εσωτερική δομή του ιπποκάμπου παραμένει η ίδια καθ' όλο το μήκος και αποτελείται από μία αναδίπλωση του εξελιγμένου παλαιού και περισσότερο απλού (με λιγότερα στρώματα κυττάρων) αρχαιοφλοιού. Σε κάθετη διατομή προς τον διαμήκη άξονά του (κοιλιακός-ραχιαίος), η εσωτερική του δομή αποκαλύπτεται σαν δύο συναρμοσμένα 'C' το ένα ανάστροφα σε σχέση με το άλλο, καθένα με τη δική του κύρια κυτταρική στοιβάδα. Το ένα 'C' αποτελεί το Κέρας του Αμμωνίου, συχνά αναφερόμενο και σαν κύριος ιπποκάμπος. Η κύρια κυτταρική στοιβάδα του Αμμωνίου Κέρατος είναι η στοιβάδα των πυραμιδικών κυττάρων. Το άλλο 'C' του ιπποκάμπου σχηματισμού σχηματίζεται από την οδοντωτή έλικα (το όνομά της προέρχεται από τα οδοντώματα της επιφάνειάς της) και είναι μορφολογικά το εσωτερικό τμήμα του φλοιού. Η κύρια στοιβάδα της οδοντωτής έλικας είναι η στοιβάδα των κοκκιωδών κυττάρων. Η οδοντωτή έλικα αν και θεωρείται μέρος του ιπποκάμπου βρέθηκε ότι διαφέρει ως προς την αρχιτεκτονική των κυττάρων της. Εντούτοις, μερικές φορές η πύλη της οδοντωτής έλικας, η περιοχή δηλαδή που βρίσκεται εσωτερικά του 'C', και αποτελείται από κοκκιώδη κύτταρα, αναφέρεται και σαν CA4 περιοχή.

Τα περισσότερα τμήματα του φλοιού του ιπποκάμπου είναι δυνατόν να διαιρεθούν με βάση τόσο την κυτταρική αρχιτεκτονική τους, όσο και με τις συνδέσεις τους. Συνοπτικά, είναι δυνατόν να αναφερθεί ότι στο Αμμώνιο κέρας διακρίνονται τέσσερα διαφορετικά πεδία τα οποία χαρακτηρίζονται σαν CA1-CA4. Το πεδίο CA1 είναι εξαιρετικά ανεπτυγμένο στον άνθρωπο (Nieuwenhuys et al, 1997).

Η περιοχή CA1 συνορεύει με το υπόθεμα του ιπποκάμπου. Ουσιαστικά αποτελεί την μεταβατική ζώνη μεταξύ του Αμμωνίου κέρατος και του παρακείμενου ρινικού φλοιού. Το υπόθεμα χαρακτηρίζεται από μεγάλα πυραμιδικά κύτταρα, σε χαλαρή διάταξη και με τελείως διαφορετική νευροφυσιολογική συμπεριφορά από κύτταρα της πυραμιδικής στοιβάδας (Baldoni et al 1993).

Στη ραχιαία επιφάνεια του ιπποκάμπου, προς την επιφάνεια του κροταφικού λοβού, υπάρχει μία πλατιά μυέλινη ταινία, η πα-

ρυφή του ιπποκάμπου, η οποία μεταβαίνει κάτω από το μεσολόβιο στην ψαλίδα και τοξοειδώς πορευόμενη καταλήγει στα μαστία.

### **5.2.1. Στοιβάδες του ιπποκάμπου**

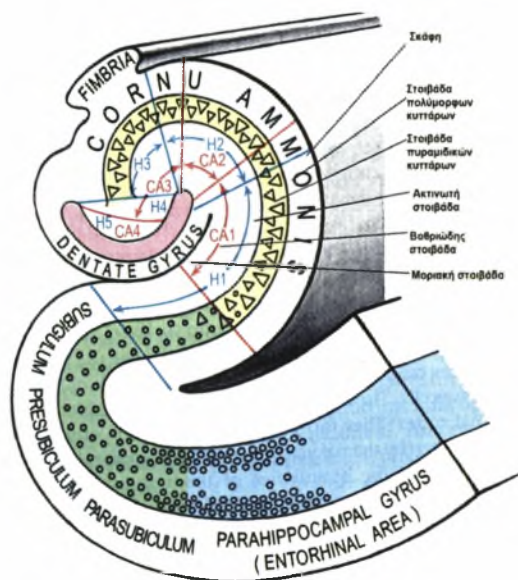
Στο Αμμώνιο κέρασ (του ανθρώπινου εγκεφάλου) διακρίνονται, με κατεύθυνση από την επιφάνεια προς τα μέσα, οι εξής στοιβάδες (Baldoni et al 1993) (εικ.8).

- Το επένδυμα (ependyma)
- Η σκάφη (alveus). Είναι μία λευκή στοιβάδα αποτελούμενη από ίνες προσαγωγές και απαγωγές από και προς τον ιπποκάμπο. Οι απαγωγές αποτελούνται από τους άξονες των πυραμιδικών κυττάρων και του υποθέματος και συγκλίνουν στην παρυφή της ψαλίδας, δίνοντας παράλληλα και μικρές παράπλευρες ίνες που επανεισέρχονται στον ιπποκάμπο. Οι απαγωγές ίνες είναι συνήθως συνδεσμικές ομοτοπικές ή προέρχονται από διαφορετικές περιοχές του ετερόπλευρου ιπποκάμπου.
- Η στοιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (stratum oriens). Αποτελείται κυρίως από τους βασικούς δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων και περιέχει ενδονευρώνες. Διασχίζεται από προσαγωγές και απαγωγές ίνες.
- Η πυραμιδική στοιβάδα (stratum pyramidale). Αποτελείται από τα πυραμιδικά κύτταρα, νευρικά κύτταρα μεσαίου και μεγάλου μεγέθους, των οποίων η βάση είναι προσανατολισμένη προς τη στοιβάδα των πολύμορφων κυττάρων ενώ η κορυφή είναι προσανατολισμένη προς την ακτινωτή στοιβάδα. Οι κορυφαίοι δενδρίτες των κυττάρων αυτών διασχίζουν την ακτινωτή στοιβάδα για να καταλήξουν στην βοθριώδη-μοριακή στοιβάδα. Οι άξονες των πυραμιδικών κυττάρων κατευθύνονται προς την σκάφη και συνεχίζουν στην ψαλίδα.
- Η διάφανη στοιβάδα (stratum lucidum). Στη στοιβάδα αυτή οι βρυώδεις ίνες προβάλλουν στους εγγύς δενδρίτες των πυραμιδικών νευρώνων. Η διάφανη στοιβάδα δεν είναι πολύ εμφα-

νής στον άνθρωπο όσο σε άλλα πρωτεύοντα. Επίσης δεν είναι παρούσα στα πεδία CA1 και CA2.

- Η ακτινωτή στοιβάδα (stratum radiatum). Αποτελείται από κορυφαίους δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων, από τους εγγύς δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων και από ενδονευρώνες.
- Η βοθριώδης-μοριακή στοιβάδα (stratum lacunosum- moleculare). Σχηματίζεται από τους άπω δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων και από τους ενδονευρώνες.

Στη στοιβάδα των πολύμορφων κυττάρων και στην ακτινωτή στοιβάδα, κύτταρα των πεδίων CA2 και CA3 προσλαμβάνουν συνεργικές συνδέσεις από άλλα κεφαλοουραία επίπεδα του ιπποκάμπου. Οι προβολές από τα πυραμιδικά κύτταρα των πεδίων CA2 και CA3 στο πεδίο CA1 ονομάζονται παράπλευροι του Schaffer (Schaffer collaterals), και καταλήγουν κυρίως στην ακτινωτή στοιβάδα αλλά και στη στοιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (Williams et al, 1995) (εικ.8).



**Εικ.8.** Οι στοιβάδες του ιπποκάμπειου σχηματισμού (Gray's anatomy, 1995).

### 5.2.2. *Ενδονευρώνες ιπποκάμπου.*

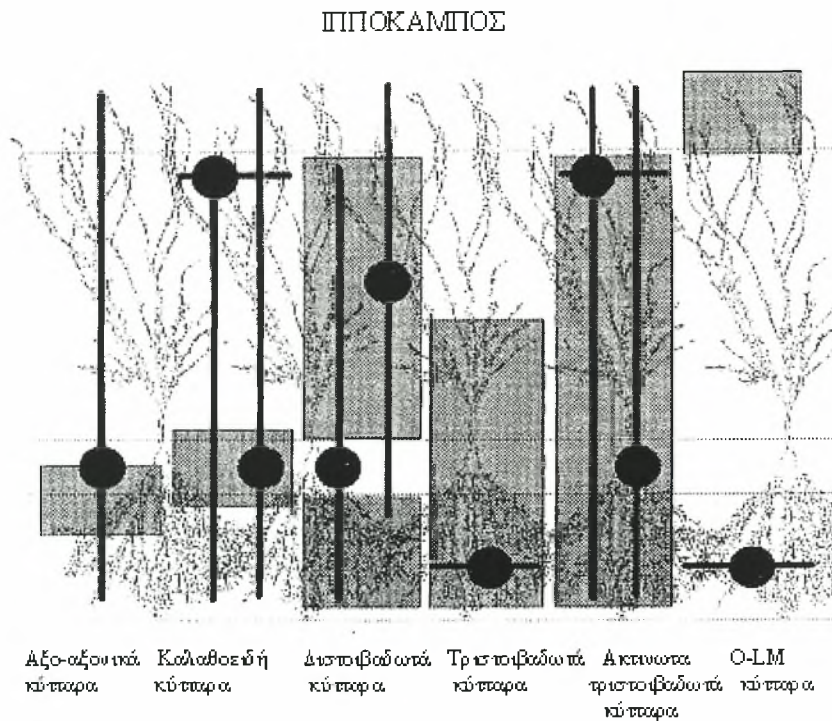
Οι ενδονευρώνες είναι νευρικά κύτταρα που συνθέτουν και απελευθερώνουν γ-αμινοβουτυρικό οξύ ως νευροδιαβιβαστή προκαλώντας υπερπόλωση της μετασυναπτικής μεμβράνης. Το αξονικό τους δίκτυο περιορίζεται τοπικά και η δενδριτική τους κατασκευή στερείται ακανθών. Ωστόσο, με τη χρησιμοποίηση νέων μεθόδων ηλεκτροφυσιολογικής καταγραφής σήμανσης και χρώσης ανιχνεύθηκαν ενδονευρώνες που δε φέρουν τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά. Εντούτοις, οι ενδονευρώνες του ιπποκάμπου, με ελάχιστες εξαιρέσεις, εμφανίζουν τα κλασικά χαρακτηριστικά των ενδονευρώνων (εικ.9).

Η κυριότερη κατηγορία ενδονευρώνων της οδοντωτής έλικας είναι τα καλαθοφόρα κύτταρα των οποίων τα κυτταρικά σώματα εντοπίζονται στο όριο μεταξύ της κοκκιώδους και πολυμορφικής στοιβάδας και νευρώνουν τα κοκκιώδη κύτταρα. Υπάρχουν τουλάχιστον πέντε τύποι καλαθοφόρων κυττάρων. Ίσως τα πιο ενδιαφέροντα είναι τα αξο-αξονικά κύτταρα που εντοπίζονται στη πολυμορφική στοιβάδα και νευρώνουν τη ζώνη εκκίνησης των αξόνων κοκκιωδών κυττάρων.

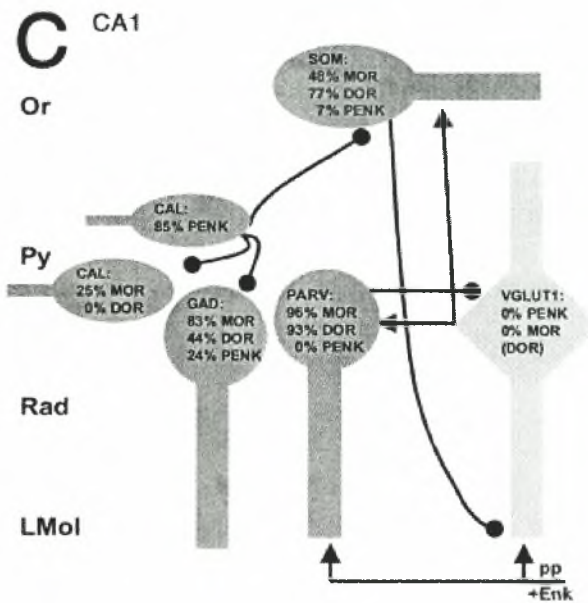
Οι ενδονευρώνες του ιπποκάμπου με τα κυτταρικά σώματά τους μέσα ή κοντά στα πυραμιδικά κύτταρα κατατάσσονται σε τρεις ομάδες: τα αξο-αξονικά, τα καλαθοειδή και τα διστοιβαδωτά κύτταρα. Τα καλαθοειδή κύτταρα εντοπίζονται στην πυραμιδική στοιβάδα και σχηματίζουν πολλαπλές συνάψεις στα σώματα των πυραμιδικών κυττάρων, τα αξο-αξονικά κύτταρα βρίσκονται στα όρια της πυραμιδικής στοιβάδας και νευρώνουν τη ζώνη εκκίνησης των αξόνων πυραμιδικών κυττάρων και τα διστοιβαδωτά κύτταρα συνάπτονται τόσο σε κορυφαίους όσο και σε βασικούς δενδρίτες των πυραμιδικών κυττάρων. Οι δενδρίτες των ενδονευρώνων και των τριών κατηγοριών διακλαδίζονται τόσο στην ακτινωτή όσο και στην στοιβάδα των πολύμορφων κυττάρων (Freund and Buzzaki, 1996).

Βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι, οι οπιοειδείς υποδοχείς απαντώνται μόνο σε ενδονευρώνες του ιπποκάμπου (Drake et al., 1999;

Stumm et al, 2004) (εικ.10). 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 ιπποκάμπου. Κατά συνέπεια, το τελικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των οπιοειδών υποδοχέων στον ιππόκαμπο είναι η αύξηση της δραστηριότητας των πυραμιδικών νευρώνων (Madisson and Nicoll 1988).



**Εικ.9.** Τοπογραφική κατανομή των ενδονευρώνων του ιπποκάμπου. Β.Σ : Βοθριώδη Στοιβάδα, Α.Σ : Ακτινωτή Στοιβάδα, Π.Σ : Πυραμιδική Στοιβάδα, Σ.Π.Κ: Στοιβάδα Πολυμόρφων Κυττάρων (Freund and Buzzaki, 1996).



**Εικ.10.** Κατανομή των μ- και δ- οπιοειδών υποδοχέων στους πληθυσμούς κυττάρων της CA1 περιοχής του ιπποκάμου (Stumm et al., *J. Comp. Neurol.* 469: 107-118, 2004).

Σε ότι αφορά τη CA1 περιοχή του ιπποκάμου έχουν βρεθεί ενδονευρώνες που εκφράζουν τόσο μ όσο και δ οπιοειδείς υποδοχείς. Μάλιστα, είναι δυνατή η κατηγοριοποίηση των ενδονευρώνων αυτών ανάλογα με τον υποτύπο του υποδοχέα που εκφράζουν, λαμβάνοντας βέβαια υπόψιν τη στοιβάδα εντοπισμού των νευρώνων αυτών και το σημείο του εκάστοτε πυραμιδικού κυττάρου στο οποίο συνάπτονται (Svoboda et al, 1999). Έτσι, έχει διαπιστωθεί ότι, οι ενδονευρώνες που εκφράζουν μ-οπιοειδείς υποδοχείς είναι ως επί το πλείστο νευρώνες οι οποίοι συνάπτονται στην περισωματική περιοχή των πυραμιδικών κυττάρων ενώ αντίθετα, οι ενδονευρώνες οι οποίοι εκφράζουν δ-οπιοειδείς υποδοχείς συνάπτονται σε απομακρυσμένους δενδρίτες των πυραμιδικών νευρώνων (Svoboda et al, 1999). Το παραπάνω εύρημα, έχει ιδιαίτερη σημασία δεδομένου των διαφορετικών λειτουργικών συνεπειών που έχει η αναστολή των

πυραμιδικών νευρώνων σε διαφορετικά σημεία τους. Συγκεκριμένα, η αναστολή στην περισωματική περιοχή η οποία εκδηλώνεται, είτε ως αναστολή της εξαρτώμενης από ιόντα νατρίου παραγωγής δυναμικών ενέργειας (Miles et al, 1996), είτε ως ενεργοποίηση εισερχόμενων στο κύτταρο κατιονικών αγωγιμοτήτων (Cobb et al, 1995), έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της πιθανότητας εκφόρτισης των πυραμιδικών νευρώνων και την πρόκληση συγχρονισμένων περιοδικών εκφορτίσεων αντίστοιχα. Αντίθετα, αναστολή σε δενδρίτες των πυραμιδικών νευρώνων έχει ως αποτέλεσμα τη δραστική μείωση του εύρους των εισερχόμενων διεγερτικών μετασυναπτικών δυναμικών (EPSPs) και την μείωση της πρόκλησης ασβέστιο-εξαρτώμενων δυναμικών ενέργειας με αποτέλεσμα τη ρύθμιση των εισερχόμενων από άλλες περιοχές του εγκεφάλου πληροφοριών, κυρίως του ενδορρινικού φλοιού (Miles et al, 1996). Κατά συνέπεια, ενεργοποίηση  $\mu$  και όχι  $\delta$ -οπιοειδικών υποδοχέων προκαλεί διακοπή της περιοδικής εκφόρτισης νευρώνων με συχνότητα 20-80 Hz, καθώς και αύξηση του αριθμού των προκαλούμενων δυναμικών ενεργείας ενώ, ενεργοποίηση  $\delta$ -οπιοειδών υποδοχέων έχει ως αποτέλεσμα την ενδυνάμωση της εισερχόμενης πληροφορίας (Miles et al, 1996, Whittington et al, 1998; Svoboda et al, 1999). Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι, ενεργοποίηση των  $\mu$ -οπιοειδικών υποδοχέων στον ιππόκαμπο προκαλεί την εμφάνιση επιληπτογενούς δραστηριότητας, ενώ ενεργοποίηση  $\delta$ -υποδοχέων προκαλεί μικρής μόνο κλίμακας αύξηση της διεγερσιμότητας (Whimpey et al, 1989; Lupica and Dunwiddie, 1991). Οι παρατηρήσεις αυτές, τουλάχιστον σε ότι αφορά τους  $\mu$  οπιοειδείς υποδοχείς, έχουν επιβεβαιωθεί κλινικά από το γεγονός ότι χορήγηση φεντανύλης, κατά τη διάρκεια χειρουργικών επεμβάσεων προκαλεί την εμφάνιση επιληπτοειδούς ηλεκτροεγκεφαλικής δραστηριότητας η οποία προέρχεται από δομές του μεταχιακού συστήματος (Villiger et al, 1983; Cervantes et al, 1996).

Η αυξημένη νευρωνική δραστηριότητα που παρατηρείται στη CA1 περιοχή του ιπποκάμπου μετά από την ενεργοποίηση των οπιοειδικών υποδοχέων υποδεικνύεται κυρίως από *in vitro* μελέτες σε τομές του ιπποκάμπου μετά από έκλυση του ιστού με αγωνιστές



των οπιοειδικών υποδοχέων. Η επίδραση της *in vivo* χορήγησης οπιοειδικών αγωνιστών στη δραστηριότητα των νευρώνων της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου παραμένει ανεξερεύνητη και αποτελεί έναν από τους κύριους στόχους αυτής της μελέτης.

### **5.2.3. Συνδέσεις του ιπποκάμπου**

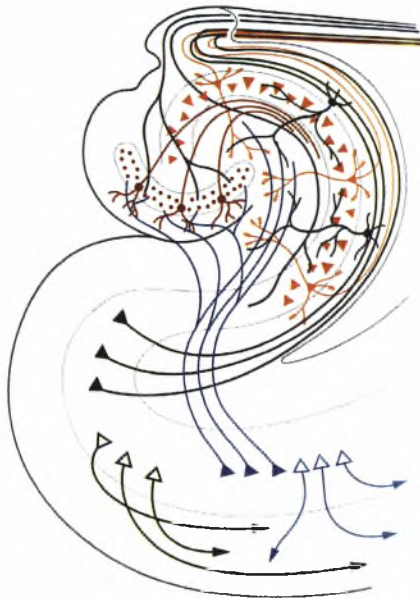
Μετά από τομή του ιπποκάμπου, ως προς τον ραχιαίο-κοιλιακό άξονα, εύκολα διακρίνεται ένα σύνολο από τρία συνδεδεμένα μονοπάτια γνωστό ως «τρισυναπτικό κύκλωμα» (εικ.11) (Swanson, 1981; 1982). Η κύρια ροή των πληροφοριών στον ιππόκαμπο θεωρείται ότι πραγματοποιείται με το τρισυναπτικό κύκλωμα. Οι ίνες που προορίζονται για την οδοντωτή έλικα προέρχονται από όλα τα τμήματα της ενδορρινικής περιοχής και συγκροτούν τη διατιτραίνουσα οδό. Οι ίνες της μεγάλης αυτής δεσμίδας δεν απολήγουν αποκλειστικά στην οδοντωτή έλικα αλλά πορεύονται και προς άλλες μοίρες του ιπποκάμπου σχηματισμού. Οι νευράξονες των κοκκιωδών κυττάρων της οδοντωτής έλικας οι οποίοι συγκροτούν το ιπποκάμπιο σύστημα βρυωδών ινών, απολήγουν ακολουθώντας τοπογραφική οργάνωση, στα πυραμδικά κύτταρα του πεδίου CA3. Οι κύριες ενδοιπποκάμπειες ίνες του πεδίου CA3 οι οποίες πορεύονται προς το πεδίο CA1 αποτελούν τη γνωστή παράπλευρη οδό του Schaffer (Nieuwenhuys et al, 1996). Στη συνέχεια, το CA1 πεδίο προβάλλει έντονα στο υπόθεμα και έτσι κλείνει το κύκλωμα καταλήγοντας πάλι στον ενδορρινικό φλοιό (Swanson, 1982).

Ο ιππόκαμπος δέχεται προσαγωγές ίνες οι οποίες εκπορεύονται από:

1. Διάφορες περιοχές του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων: Οι περισσότερες ίνες απολήγουν στην έκφυση της διατιτραίνουσας οδού. Άλλες ίνες πραγματοποιούν συνάψεις στην περιρρινική και στην ενδορρινική περιοχή και άλλες παρακάμπτουν τον ενδορρινικό φλοιό και απολήγουν απ'ευθείας στο φλοιό του υποθέματος του ιπποκάμπου. (Nieuwenhuys et al, 1997).

2. Την αμυγδαλή: Ο ιππόκαμπος και ο ενδορρινικός φλοιός δέχονται σημαντικό αριθμό ιών από την αμυγδαλή κυρίως από τους έξω και από τους βασικούς αμυγδαλικούς πυρήνες, αλλά και από τον έσω αμυγδαλικό πυρήνα (Nieuwenhuys et al, 1996).

3. Τον έσω πυρήνα του διαφράγματος: Οι ίνες αυτές καταλήγουν στην οδοντωτή έλικα και στην παρακείμενη περιοχή του ιπποκάμπου.



**Εικ.11. Νευρωνική οργάνωση και συνδέσεις της οδοντωτής έλικας, του ιπποκάμπου, του υποθέματος και της παραιπποκάμπειας έλικας.** Τα κυτταρικά σώματα, οι δενδρίτες και οι νευράξονες των πυραμιδικών κυττάρων του Αμμωνίου κέρατος είναι κίτρινα. Οι άξονές τους σχηματίζουν τις απαγωγές ίνες προς τη σκάφη και την παρυφή. Προσαγωγές ίνες προς το Αμμώνιο κέρατος και την παρυφή είναι μωβ, προσαγωγές από τον ενδορρινικό φλοιό διά του διατρητικού μονοπατιού είναι μπλε. Τα καλαθοφόρα κύτταρα είναι μαύρα. Οι νευρώνες της οδοντωτής έλικας και οι άξονές τους οι οποίοι σχηματίζουν τις βρυώδεις ίνες του ιπποκάμπου είναι ερυθρές. Οι απαγωγές ίνες του υποθέματος προς την ψαλίδα διά της σκάφης είναι πράσινες (Gray's anatomy, 2004).

4. Τον θάλαμο: Ο ιππόκαμπος δέχεται ίνες από τους πρόσθιους πυρήνες και το σύμπλεγμα των πυρήνων της μέσης γραμμής του θαλάμου. Οι ίνες των προσθίων πυρήνων του θαλάμου απολήγουν στο υπόθεμα, αποτελώντας μέρος ενός κυκλώματος που χαρακτηρίζει τον ιππόκαμπο και ονομάζεται κύκλωμα Perez. Οι ίνες των θαλαμικών πυρήνων της μέσης γραμμής απολήγουν στον ενδορρινικό φλοιό του υποθέματος και στην CA1 περιοχή του ιπποκάμπου.

5. Την υπερμαστική περιοχή: Μέσω της ψαλίδας φτάνει στον ιππόκαμπο ένας σημαντικός αριθμός ινών. Οι περισσότερες από τις ίνες αυτές απολήγουν στην οδοντωτή έλικα και στο πεδίο CA3 του ιπποκάμπου.

6. Τους μεσεγκεφαλικούς πυρήνες της ραφής.

Οι απαγωγές ίνες του ιπποκάμπου ταξινομούνται ως εξής (Nieuwenhuys et al, 1997):

1. Ίνες του Αμμωνίου κέρατος: Οι ίνες αυτές προβάλλουν στον έξω πυρήνα του διαφράγματος και είναι πιθανώς γλουταμινεργικές.

2. Ίνες του υποθέματος του ιπποκάμπου για την προσυνδεσμική ψαλίδα: Καταλήγουν στον έξω πυρήνα του διαφράγματος, στον επικλινή πυρήνα, στον προσυνδεσμικό ιππόκαμπο και στην έσω μοίρα του μετωπιαίου φλοιού.

3. Ίνες του υποθέματος του ιπποκάμπου για την μετασυνδεσμική ψαλίδα: Εκφύονται από το υπόθεμα του ιπποκάμπου και καταλήγουν στα μαστία, ενώ μερικές διανέμονται στον πρόσθιο πυρήνα του θαλάμου και στην περιοχή του κοιλιακού έσω πυρήνα του υποθαλάμου. Η μετασυνδεσμική ψαλίδα περιέχει αποκλειστικά ίνες που εκπορεύονται από το υπόθεμα του ιπποκάμπου, με μόνη εξαίρεση μερικές ίνες που προβάλλουν στον ιππόκαμπο.

4. Μη ψαλιδικές ίνες: Προβάλλουν στον ενδορρινικό φλοιό, στην αμυγδαλή και σε περιοχές του γειτονικού έσω κροταφικού φλοιού.

### **5.3. Νευροχημεία του Ιπποκάμπου**

Η μετάδοση σημάτων μεταξύ των νευρώνων του ιπποκάμπου επιτυγχάνεται μέσω χημικών συνάψεων. Κατά τη χημική συναπτική διαβίβαση απελευθερώνεται από τον προσυναπτικό νευρώνα ένας νευροδιαβιβαστής ο οποίος στη συνέχεια διαχέεται στη συναπτική σχισμή και προσδένεται σε υποδοχείς της μετασυναπτικής μεμβράνης. Χαρακτηριστικό είναι ότι ο υποδοχέας και όχι ο διαβιβαστής είναι εκείνος που καθορίζει το κατά πόσον η συναπτική απόκριση είναι διεγερτική ή ανασταλτική (Kandel, 1999).

Διάφορα αμινοξέα έχουν αναγνωρισθεί ως υποψήφιοι νευροδιαβιβαστές στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Με βάση νευροφυσιολογικές μελέτες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τα διεγερτικά και τα ανασταλτικά. Τα κυριότερα διεγερτικά αμινοξέα είναι το γλουταμινικό και το ασπαργινικό οξύ (ασπαρτικό οξύ) ενώ τα κυριότερα ανασταλτικά αμινοξέα είναι το γάμμα αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και η γλυκίνη.

#### **5.3.1. Γλουταμινικό οξύ**

Το γλουταμινικό οξύ αποτελεί τον κύριο διεγερτικό νευροδιαβιβαστή στο κεντρικό νευρικό σύστημα, όπου συναντάται σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Συντίθεται μέσω διαφόρων βιοχημικών αντιδράσεων. Τα περισσότερα μόρια γλουταμινικού οξέος στον εγκέφαλο προέρχονται από το φυσιολογικό οξειδωτικό μεταβολισμό της γλυκόζης. Μπορεί όμως να συντεθεί και κατευθείαν από τη γλουταμίνη με τη δράση του ενζύμου φωσφορική γλουταμινάση. Η γλουταμίνη συντίθεται στα νευρογλοιακά κύτταρα και μεταφέρεται στις απολήξεις των νευρώνων όπου μετατρέπεται σε γλουταμινικό οξύ από τη γλουταμινάση. Το αμινοξύ αποθηκεύεται σε συναπτικά κυστίδια από τα οποία απελευθερώνεται παρουσία ασβεστίου όταν η εκπόλωση φτάσει στη νευρική απόληξη.

Το γλουταμινικό οξύ είναι ο κύριος νευροδιαβιβαστής στα τρία μονοπάτια του ιπποκάμπου σχηματισμού:

1. Στο διατρητικό μονοπάτι το οποίο προέρχεται από τον ενδορρινικό φλοιό και καταλήγει κυρίως στην οδοντωτή έλικα.
2. Στις βρυώδεις ίνες που πορεύονται από την οδοντωτή έλικα προς τη CA3 περιοχή.
3. Στις παράπλευρες ίνες του Schaffer των πυραμιδικών κυττάρων της CA3 που καταλήγουν στα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 (Williams et al, 1995).

### 5.3.2. *γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA)*

Το GABA αναγνωρίστηκε στο νευρικό σύστημα το 1950 ως πιθανός νευροδιαβιβαστής. Σήμερα είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι το GABA αποτελεί τον κύριο ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή στο νευρικό σύστημα των θηλαστικών. GABAεργικοί νευρώνες εντοπίζονται στις εν τω βάθει περιοχές της οδοντωτής έλικας, ενώ η υψηλότερη συγκέντρωση των GABAεργικών υποδοχέων εντοπίζεται στη μοριακή στοιβάδα της οδοντωτής έλικας. Στον ιππόκαμπο GABAεργικά κύτταρα εντοπίζονται κυρίως στη στοιβάδα των πολύμορφων κυττάρων, αλλά και στην πυραμιδική και στην ακτινωτή στοιβάδα (Williams et al, 1995). Το GABA δρα σε δύο υποδοχείς, τον GABA<sub>A</sub> και τον GABA<sub>B</sub>. Ο υποδοχέας GABA<sub>A</sub> είναι ένας ιοντοτρόπος υποδοχέας, ο οποίος ελέγχει έναν διάυλο Cl<sup>-</sup>. Ο υποδοχέας GABA<sub>B</sub> είναι μεταβολοτρόπος και ενεργοποιεί έναν «καταρράκτη» δεύτερου αγγελιοφόρου, ο οποίος τελικά ενεργοποιεί έναν διάυλο K<sup>+</sup>. Το GABA προκαλεί την εμφάνιση προς τα έξω ρευμάτων χλωρίου, διαμέσου συναπτικών διαύλων (Kandel, 1999).

Το GABA συντίθεται με μία απλή αντίδραση από το γλουταμινικό οξύ και αποθηκεύεται σε κυστίδια. Η απελευθέρωση ρυθμίζεται από αυτοϋποδοχείς που βρίσκονται στην προσυναπτική μεμβράνη και ανήκουν στους GABA<sub>B</sub> υποδοχείς. Οι GABAεργικοί νευρώνες εντοπίζονται στο εν τω βάθει τμήμα της στοιβάδας των καλαθοφόρων κυττάρων. Η υψηλότερη συγκέντρωση των GABAεργικών

υποδοχέων βρίσκεται στη μοριώδη στοιβάδα της οδοντωτής έλικας (Williams et al, 2004).

#### **5.4. Υποδοχείς αμινοξέων στον ιπόκαμπο**

Στον ιπόκαμπο εντοπίζεται ένας μεγάλος αριθμός υποδοχέων, οι οποίοι ποικίλλουν μεταξύ τους τόσο αριθμητικά όσο και ποιοτικά. Οι δύο κύριες κατηγορίες υποδοχέων αμινοξέων που συναντώνται στον ιπόκαμπο είναι: α) οι υποδοχείς του γλουταμινικού οξέως και β) οι υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέως.

##### ***A. Υποδοχείς του γλουταμινικού οξέως***

Οι υποδοχείς γλουταμινικού χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τους υποδοχείς που ελέγχουν άμεσα διαύλους ιόντων (ιοντοτρόποι υποδοχείς) και τους υποδοχείς που ελέγχουν τους διαύλους έμμεσα, με τη βοήθεια δεύτερων αγγελιοφόρων (μεταβολοτρόποι υποδοχείς) (Kandel, 1999).

Οι ιοντοτρόποι υποδοχείς γλουταμινικού ταξινομούνται περαιτέρω σε δύο μεγάλες υποομάδες, τους υποδοχείς NMDA και τους υποδοχείς μη NMDA, ανάλογα με τους αγωνιστές που τους ενεργοποιούν και τους ανταγωνιστές που αναστέλλουν τη δράση τους.

##### **NMDA υποδοχείς**

Οι υποδοχείς NMDA ενεργοποιούνται από το ανάλογο αμινοξέος NMDA και η δράση τους αναστέλλεται από τη φαρμακευτική ουσία 2-αμινο-5-φωσφονοβαλερικό οξύ (APV). Η δράση του υποδοχέα αναστέλλεται επίσης από την ψευδαισθησιογόνο φαρμακευτική ουσία φαινοκυκλιδίνη (PCP, γνωστή και ως «αγγελόσκονη») καθώς επίσης και από το MK801. Οι δύο αυτές ουσίες προσδέονται σε μία θέση η οποία βρίσκεται στο εσωτερικό του ανοιχτού πόρου του διαύλου. Οι NMDA υποδοχείς κατανέμονται ευρύτατα στο

κεντρικό νευρικό σύστημα, ιδιαίτερα στον ιππόκαμπο, στα βασικά γάγγλια, στο έξω διάφραγμα και στο φλοιό.

Ο υποδοχέας NMDA και ο διάυλος του έχουν τέσσερις χαρακτηριστικές ιδιότητες:

1. Ο υποδοχέας ελέγχει έναν διάυλο κατιόντων μεγάλης αγωγιμότητας, ο οποίος είναι διαπερατός από τα  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  και  $\text{K}^+$ .
2. Η είσοδος  $\text{Ca}^{2+}$  διά μέσου του διαύλου που ενεργοποιείται από το NMDA θεωρείται ότι ενεργοποιεί ασβεστιοεξαρτώμενους «καταρράκτες» δεύτερου αγγελιοφόρου. Οι «καταρράκτες» αυτοί έχουν σημασία για την εκκίνηση βιοχημικών μεταβολών οι οποίοι συμβάλλουν σε ορισμένες μορφές συναπτικής μεταβολής μακράς διάρκειας.
3. Ο διάυλος λειτουργεί μόνο παρουσία γλυκίνης.
4. Ο διάυλος είναι μοναδικός μέχρι τώρα, ανάμεσα στους διαύλους που ελέγχονται από διαβιβαστές, διότι ελέγχεται ταυτόχρονα από το γλουταμινικό οξύ και από την τάση του ρεύματος.

Στο δυναμικό ηρεμίας (-65mV), το στόμιο του διαύλου NMDA φράσσεται από ένα  $\text{Mg}^{2+}$  του εξωκυττάριου χώρου, με αποτέλεσμα να μην συμβάλλει σχεδόν καθόλου στο φυσιολογικό συναπτικό δυναμικό. Όταν όμως η μεμβράνη εκπολώνεται, παρουσία γλουταμινικού, το  $\text{Mg}^{2+}$  εκτινάσσεται από το στόμιο του διαύλου με ηλεκτροστατική απώθηση, επιτρέποντας την είσοδο  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Na}^+$ . Έτσι η ροή ρεύματος διά μέσου του διαύλου είναι μέγιστη όταν υπάρχει γλουταμινικό οξύ και όταν ταυτόχρονα το κύτταρο έχει εκπολωθεί.

Στα περισσότερα κύτταρα που έχουν υποδοχείς γλουταμινικού NMDA και μη-NMDA, η παρουσία  $\text{Mg}^{2+}$  στο εσωτερικό του διαύλου που ενεργοποιείται από το NMDA εμποδίζει τον διάυλο αυτό να συνεισφέρει σημαντικά στο μετασυναπτικό διεγερτικό δυναμικό (EPSP). Έτσι, το EPSP που παράγεται στο επίπεδο ηρεμίας εξαρτά-

ται κυρίως από την ενεργοποίηση των μη- NMDA υποδοχέων. Ωστόσο, καθώς αυξάνεται η εκπόλωση του νευρώνα, το  $Mg^{2+}$  εκβάλλεται από το στόμιο των διαύλων NMDA. Κατά συνέπεια ανοίγουν περισσότεροι διάυλοι NMDA και περισσότερο ρεύμα διαρρέει τους διαύλους αυτούς.

Οι διάυλοι που ενεργοποιούνται από το NMDA έχουν άλλη μία χαρακτηριστική ιδιότητα: ανοίγουν και κλείνουν με μεγάλη βραδύτητα παρουσία γλουταμινικού, με αποτέλεσμα να προκαλούν μία χαρακτηριστική ύστερη φάση στο EPSP. Η ύστερη φάση του EPSP η οποία εξαρτάται από το NMDA είναι μικρή έπειτα από ένα μόνο προσυναπτικό δυναμικό ενεργείας. Ωστόσο όταν ο προσυναπτικός νευρώνας εκπολώνεται επανειλημμένως, έτσι ώστε το EPSP να προστίθεται και να εκπολώνουν το μετασυναπτικό κύτταρο κατά 20mV ή και περισσότερο, ο υποδοχέας NMDA εκβάλλει το  $Mg^{2+}$  και δημιουργεί ένα πολύ ισχυρό ρεύμα. Πολύ πιο σημαντικό είναι το γεγονός ότι το ρεύμα αυτό, το οποίο ενεργοποιείται από το NMDA φέρεται σε μεγάλο βαθμό από το  $Ca^{2+}$ . Έτσι η ενεργοποίηση του υποδοχέα NMDA, μέσω επανειλημμένων ερεθισμών οδηγεί στην ενεργοποίηση ασβεστιοεξαρτώμενων ενζύμων και κινασών δεύτερου αγγελιοφόρου στο μετασυναπτικό κύτταρο.

### **μη-NMDA υποδοχείς**

Οι μη- NMDA υποδοχείς ενεργοποιούνται από τις φαρμακευτικές ουσίες α-αμινο-3-υδροξυ-5-μεθυλο-ισοξαζολο-προπιονικό οξύ (AMPA), καϊνικό οξύ και κισκαλικό οξύ, ενώ η δράση τους αναστέλλεται από την 6-κυανο-7-νιτροκινοξαλινο-2,3-διόνη (CNQX). Οι υποδοχείς AMPA κατανέμονται επίσης ευρύτατα στο νευρικό σύστημα, στις ίδιες περιοχές με τους NMDA υποδοχείς. Η παλαιότερη ονομασία τους ήταν υποδοχείς κισκαλικού οξέος. Πρόκειται για ιοντοτρόπους υποδοχείς οι οποίοι ελέγχουν διαύλους νατρίου. Έτσι εμπλέκονται στην ανάπτυξη ιδιαίτερα ταχέων εκπολώσεων όταν συνδεθεί με αυτούς γλουταμινικό οξύ. Οι υποδοχείς του καϊνικού ανιχνεύονται σε περιοχές που δεν υπάρχουν NMDA υποδοχείς, όπως τα μαστία και ορισμένες εν τω βάθει στοιβάδες του φλοιού.



Βρίσκονται επίσης στον ιππόκαμπο, όχι όμως στις ίδιες περιοχές με τους NMDA. Οι υποδοχείς μη-NMDA ελέγχουν έναν διάυλο κατιόντων μικρής σχετικά αγωγιμότητας ο οποίος είναι διαπερατός τόσο από τα  $\text{Na}^+$  όσο και από τα  $\text{K}^+$ , ενώ οι περισσότεροι υποδοχείς μη-NMDA δεν είναι διαπερατοί από τα  $\text{Ca}^{2+}$ . Στο φυσιολογικό δυναμικό ηρεμίας οι υποδοχείς μη-NMDA δημιουργούν την κυρίαρχη συνιστώσα του EPSP στους νευρώνες.

### **Μεταβολοτρόποι υποδοχείς**

Οι μεταβολοτρόποι υποδοχείς γλουταμινικού ενεργοποιούνται από το 1-αμινοκυκλοπεντανο-1,3-δικαρβοξυλικό οξύ (ACPD) (Kandel, 1999). Διαθέτουν επτά διαμεμβρανικές περιοχές και η διέγερση τους ενεργοποιεί συστήματα μεταγωγής σήματος, ιδιαίτερα της φωσφολιπάσης C. Παρ'όλα αυτά η διέγερσή τους προκαλεί βραδείες αλλαγές της ιοντικής αγωγιμότητας, που προφανώς πρέπει να είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης C. Εντοπίζονται σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, ιδιαίτερα στους οσφρητικούς βολβούς, στον ιππόκαμπο, στην ωχρά σφαίρα, στο θάλαμο, στη μέλαινα ουσία, στα άνω διδύμια και στην παρεγκεφαλίδα.

### **B. Υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέως**

Το GABA ασκεί τις επιδράσεις του μέσω δύο υποδοχέων: τους  $\text{GABA}_A$  και  $\text{GABA}_B$  υποδοχείς. Οι  $\text{GABA}_A$  αποτελούνται από πέντε υποομάδες πρωτεϊνών, οι οποίες σχηματίζουν ένα σύμπλοκο. Το σύμπλοκο έχει μία ειδική θέση δέσμευσης για το GABA. Στις υπόλοιπες τέσσερις δεσμεύονται τα βαρβιτουρικά, οι βενζοδιαζεπίνες, η πικροτοξίνη και ορισμένα στεροειδή. Η μικουκουλίνη αναστέλλει συναγωνιστικά τον υποδοχέα  $\text{GABA}_A$  ενώ η πικροτοξίνη αναστέλλει τον υποδοχέα μη συναγωνιστικά εμποδίζοντας τη ροή ιόντων χλωρίου διαμέσου του ιοντικού διαύλου. Οι  $\text{GABA}_B$  υποδοχείς αναστέλλονται από την ουσία CGP 35348, η οποία δρα ως ανταγωνιστής στον υποδοχέα και από την φακλοφαίνη.

**Πιν.3.** Οι κυριότεροι υποδοχείς του ιπποκάμπτου και οι ουσίες οι οποίες τους διεγείρουν και τους αναστέλλουν.

Υποδοχείς	Διέγερση	Αναστολή
NMDA	1. γλουταμινικό οξύ 2. NMDA	1. κεταμίνη 2. PCP (φαينوκυκλιδίνη) 3. MK801 4. APV(2-αμινο-5-φωσφονοβαλερικό οξύ)
Μη-NMDA	1. AMPA 2. καϊνικό οξύ 3. κισκαλικό οξύ 4. γλουταμινικό οξύ	1. CNQX(6-κυανο-7-νιτροκινοξαλινο-2,3-διόνη) 2. NBQX 3. Κινουρινικό οξύ
Μεταβολοτρόποι	1. γλουταμινικό οξύ ACPD (1-αμινοκυκλοπεντανο-1,3-δικαρβοξυλικό οξύ)	1. MCPG 2. LY341495 3. LY366457
GABA <sub>A</sub>	1. GABA <sub>A</sub> 2. βενζοδιαζεπίνες 3. βαρβιτουρικά 4. muscimol 5. στεροειδή	1. μπικουκουλίνη 2. πικροτοξίνη
GABA <sub>B</sub>	1. βακλοφαίνη 2. GABA <sub>B</sub>	1. CGP35348 2. φακλοφαίνη 3. CGP55845 4. CGP64213

## 6. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΠΙΟΕΙΔΩΝ ΣΤΗΝ CA1 ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ

Οι αλλαγές που εμφανίζονται στα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 μετά από την *in vitro* χορήγηση οπιοειδών είναι ήδη γνωστά με τη μέθοδο των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων καταγραφών.

Εξωκυττάρια καταγραφές από πυραμιδικά κύτταρα της CA1 μετά από ηλεκτρική διάγερση των Schaffer collateral έχουν δείξει ότι οι νευρώνες αυτοί παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία στο ηλεκτρικό ερέθισμα (Henderson, 1983). Τα οπιοειδή δηλαδή μειώνουν την ένταση του ερεθίσματος που απαιτείται για να προκληθεί συναπτική απάντηση (Chavkin, 1988).

Ενδοκυττάρια καταγραφές στα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 έχουν δείξει ότι τα οπιοειδή δεν μεταβάλλουν τις εγγενής ιδιότητες της μεμβράνης (Chavkin, 1988) ούτε το δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης (resting membrane potential) (Siggins and Zieglansberger, 1981), προτείνοντας ότι τα οπιοειδή δρουν προσυναπτικά. Ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές από ενδονευρώνες της CA1 έδειξαν ότι τα οπιοειδή δρουν άμεσα, προκαλώντας υπερπόλωση της μεμβράνης και αύξηση της διεγερσιμότητας των πυραμιδικών νευρώνων (Henderson, 1983). Όταν τα οπιοειδή εφαρμόζονται κατευθείαν επάνω στην τομή του ιπποκάμπου προκαλούν αμέσως υπερπόλωση των ενδονευρώνων αυξάνοντας την αγωγιμότητα του καλίου, διεγείρουν τους οπιοειδείς υποδοχείς, οι οποίοι βρίσκονται αποκλειστικά στους ενδονευρώνες και όχι στους πυραμιδικούς νευρώνες, με αποτέλεσμα την αναστολή των ενδονευρώνων. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται δυσαναστολή και έχει ως επακόλουθο την αυξημένη διεγερσιμότητα της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου. Τα οπιοειδή, μέσω της δράσης τους στους ενδονευρώνες, μειώνουν το μετασυναπτικό ανασταλτικό δυναμικό (IPSP) των πυραμιδικών νευρώνων (Henderson, 1983; Chavkin, 1988). Ενδοκυττάρια καταγραφές πυραμιδικών νευρώνων της CA1 έδειξαν ότι μειώνεται τόσο το fast-IPSP (GABA<sub>A</sub>) όσο και το slow-IPSP (GABA<sub>B</sub>) (Swearingen &

Chavkin, 1989). Η αύξηση της διεγερσιμότητας των πυραμιδικών κυττάρων της CA1 πιθανόν οφείλεται σε αναστολή της δράσης των GABA στα πυραμιδικά κύτταρα της CA1 (Zieglansberger, 1979; Madison and Nicoll, 1988) το οποίο μπορεί να μετρηθεί υπολογίζοντας το πλάτος του IPSP (Nicoll and Madison, 1984)

Χορήγηση φεντανύλης *in vitro* σε ποντίκια έδειξε με τη βοήθεια δοκιμασιών συμπεριφοράς (formalin test, tail-pressure test, Von frey test) ότι τα οπιοειδή, μέσω της ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης Cγ (PKCγ), καταλύουν την φωσφορυλίωση των NMDA υποδοχέων, με αποτέλεσμα τη διέγερση των NMDA υποδοχέων μέσω της αύξησης του γλουταμικού (Celierier et al, 2004).

Συμπερασματικά, στην περιοχή CA1 του ιπποκάμπου, μ-υποδοχείς εντοπίζονται στους ενδονευρώνες (Chavkin, 1988), οι οποίοι μετά από χορήγηση *in vitro* οπιοειδών παρουσιάζουν αυξημένη αγωγιμότητα του καλίου. Η υπερπόλωση αυτή ελαττώνει την απελευθέρωση GABA και αυτό προκαλεί αυξημένη διεγερσιμότητα των πυραμιδικών νευρώνων της CA1. Η μείωση της αναστολής των πυραμιδικών νευρώνων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του μετασυναπτικού διεγερτικού δυναμικού-EPSP και τη μείωση του μετασυναπτικού ανασταλτικού δυναμικού-IPSP (Siggins and Zieglansberger, 1981; Dingledine, 1981; Henderson, 1983).

# **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι:

1. να ερευνηθεί η επίδραση της in vivo χορήγηση φεντανύλης, ενός ευρέως χρησιμοποιούμενου οπιοειδούς στη χειρουργική αναισθησία, στη νευρωνική δραστηριότητα των κυττάρων στη CA1 περιοχή του ιπποκάμπου σε in vitro παρασκεύασμα του ιπποκάμπου και

2. εάν οι μεταβολές που προκαλεί η φεντανύλη αναστρέφονται από την κεταμίνη-NMDA ανταγωνιστή.

## **ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΣ**

### **7.1. Πειραματόζωα**

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί, νεαροί, λευκοί αρουραίοι της ράτσας Wistar βάρους 200-400gr. Τα πειραματόζωα στεγάζονταν ανά τρία μέσα σε κλωβούς σε χώρο με σταθερή θερμοκρασία  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  και εναλλαγή φωτός-σκότους κάθε 12 ώρες. Τα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό.

### **7.2. Φάρμακα**

Τα φάρμακα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, η κιτρική φεντανύλη και η υδροχλωρική κεταμίνη, χορηγήθηκαν από τη Αναισθησιολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Fentanyl/Janssen, Κεταμίνη/ΙΦΕΤ) Η φεντανύλη και η κεταμίνη διαλύθηκαν σε φυσιολογικό ορό ( $\text{NaCl}$  0,9%) και χορηγήθηκαν υποδορίως (1ml/kg, 80γ/kg και 10mg/kg αντιστοίχως) σε ισόποσες δόσεις. Τα ζώα της ομάδας αναφοράς έλαβαν ισόποσες δόσεις ενέσεων φυσιολογικού ορού. Τα φάρμακα ενέθηκαν υποδορίως στον αυχένα μη αναισθητοποιημένων ζώων.

### **7.3. Μέθοδος**

Μετά την άφιξή τους στο εργαστήριο, τα πειραματόζωα αφήνονταν να εξοικειωθούν με το χώρο εγκατάστασής τους για μία τουλάχιστον εβδομάδα για να αποφευχθεί το stress το οποίο μπορεί να επηρέαζε τις μετρήσεις. Όλα τα πειράματα ξεκινούσαν την ίδια ώρα, στις 11.00 π.μ. Την πρώτη ημέρα του πειράματος (Day-1) το πειραματόζωο μεταφέρθηκε από το χώρο εγκατάστασης στο χώρο του εργαστηρίου, όπου επίσης επικρατούσαν αυστηρά καθορισμένες οι ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και εναλλαγής φωτός-σκότους.



Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν τυχαία σε τρεις ομάδες:

**ομάδα 1:** πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε μόνο φυσιολογικός ορός (ομάδα ελέγχου), τέσσερις φορές, κάθε 15min υποδορίως και φυσιολογικός ορός 30min πριν την χορήγηση της πρώτης δόσης του φυσιολογικού ορού,

**ομάδα 2:** πειραματόζωα στα οποία ενέθηκε φεντανύλη 80γ/kg τέσσερις φορές κάθε 15min (συνολική δόση: 320γ/kg) (Celerier, 2000) και φυσιολογικός ορός 30min πριν την χορήγηση της πρώτης δόσης της φεντανύλης (fentanyl-treated),

**ομάδα 3:** πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε κεταμίνη 10mg/kg υποδορίως (Yamamura, 1990) 30min πριν την χορήγηση της πρώτης δόσης της φεντανύλης (ketamine-treated).

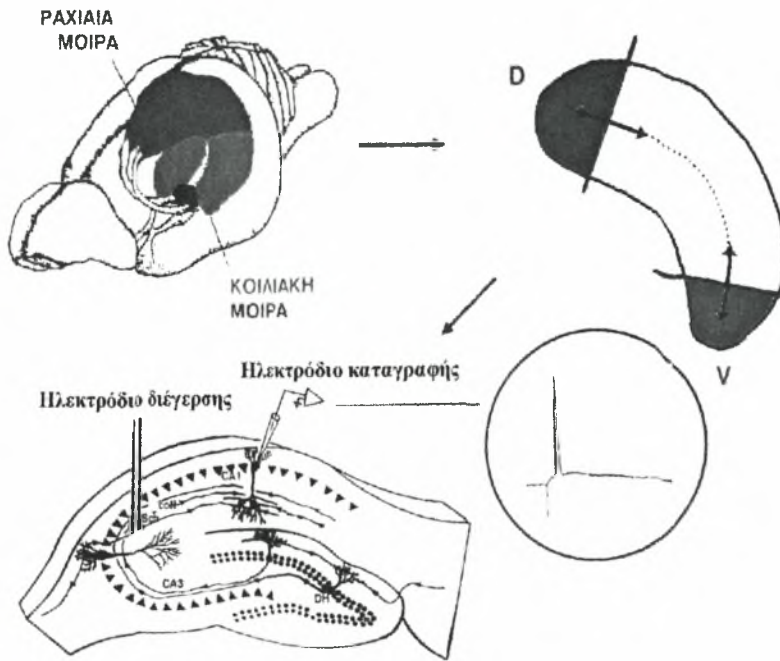
Εφαρμόστηκε ο παραπάνω τρόπος χορήγησης της φεντανύλης γιατί σκοπός ήταν να διατηρηθεί μία σχετικά σταθερή συγκέντρωση φεντανύλης στο πλάσμα του αίματος και η τοποθέτηση καθετήρα συνεχούς έγχυσης φαρμάκου σε μη αναισθητοποιημένο πειραματόζωο είναι δύσκολη και διότι το παραπάνω σχήμα χορήγησης της φεντανύλης είναι παρόμοιο με αυτό που εφαρμόζεται διεγχειρητικά. Στην ομάδα αναφοράς χορηγήθηκε υποδορίως ισόποση δόση φυσιολογικού ορού.

Μετά τη χορήγηση φαρμάκων ή/και φυσιολογικού ορού το πειραματόζωο παρέμενε στο χώρο του εργαστηρίου για συνεχή παρακολούθηση.

### ***Προετοιμασία των τομών του εγκεφάλου***

Την επόμενη ημέρα (Day+0) το πειραματόζωο αναισθητοποιείται με χορήγηση αιθέρα, θυσιάζεται με αποκεφαλισμό και λίγο πριν σταματήσει να αναπνέει, διανοίγεται το κρανίο και αποκαλύπτεται ο εγκέφαλος του ζώου. Μετά την αφαίρεση των μηνίγγων ο εγκέφαλος ανασηκώνεται, με τη χρήση ειδικού εργαλείου, από την

κοιλιακή πλευρά του μετωπιαίου λοβού και αφού αποκοπούν τα υποκείμενα οπτικά νεύρα, αφαιρείται από το κρανίο και τοποθετείται σε κρύο τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (TENY) σύστασης (σε mM) : 124 NaCl; 4 KCl; 2 MgSO<sub>4</sub>; 2 CaCl; 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 26 NaHCO<sub>3</sub>; 10 γλυκόζη σε pH 7.4, που συνεχώς οξυγονώνεται με μείγμα αερίου σύστασης 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>. Μετά τον αποχωρισμό του ιπποκάμπειου σχηματισμού και των δύο ημισφαιρίων από τις περιβάλλουσες δομές, τοποθετείται επιμηκυσμένος στη έδρα μικροτόμου (McIlwain tissue chopper) όπου λαμβάνονται εγκάρσιες τομές από τη ραχιαία μοίρα, πάχους 500 μm. Οι τομές, με τη βοήθεια πιπέτου μεταφέρονται στο λουτρό καταγραφής όπου εναποτίθενται σε ειδικό φίλτρο χαρτιού προκειμένου να συγκρατούνται οι τομές στη βάση του λουτρού κατά τη διάρκεια του πειράματος. Οι τομές επωάζονται σε ατμόσφαιρα κορεσμένη σε O<sub>2</sub> και θερμοκρασία 33°C για τουλάχιστον 1h, ενώ παράλληλα διαβρέχονται συνεχώς από οξυγονωμένο TENY. Η διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω πραγματοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα, περίπου πέντε λεπτών, προκειμένου να διασφαλισθεί η βιωσιμότητα του ιστού.



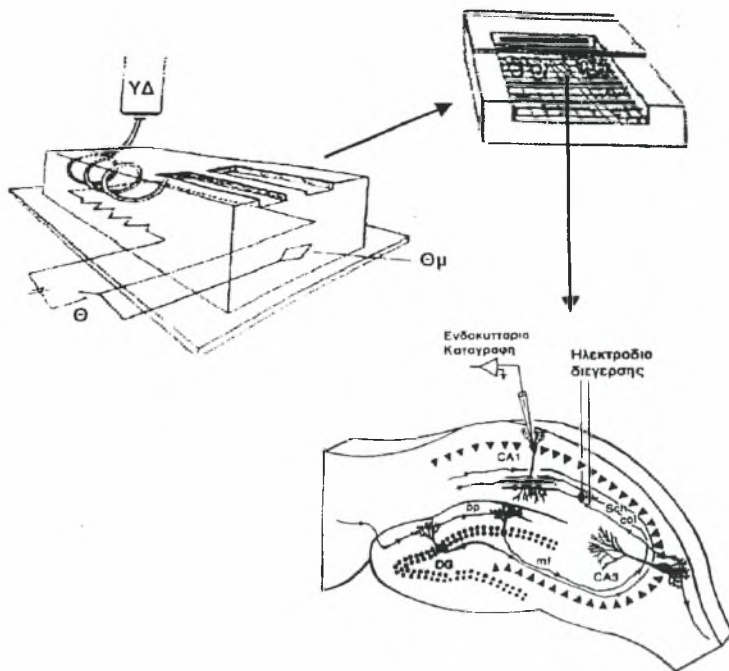
*Εικ.13. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου λήψης λεπτών τομών ραχιαίας μοίρας του ιπποκάμπου και της τοποθέτησης του καταγραφικού μικροηλεκτροδίου εντός της πυραμιδικής στοιβάδας και του ηλεκτροδίου διέγερσης στην περιοχή της παράπλευρης οδού Shaffer.*

### **Θάλαμος καταγραφής**

Το λουτρό καταγραφής αποτελείται από την έδρα στην οποία τοποθετούνται οι τομές του ιστού και από τον εσωτερικό θάλαμο. Ο εσωτερικός θάλαμος γεμίζεται με απιονισμένο νερό που διατηρείται, κατά τη διάρκεια του πειράματος, σε σταθερή θερμοκρασία  $33^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό τοποθετείται σε ειδική γυάλινη φιάλη χωρητικότητας 500 ml, οξυγονώνεται συνεχώς και τροφοδοτεί κατά τη διάρκεια του πειράματος τις τομές του ιστού που είναι τοποθετημένες στην έδρα του λουτρού καταγραφής. Τα σωληνάρια,

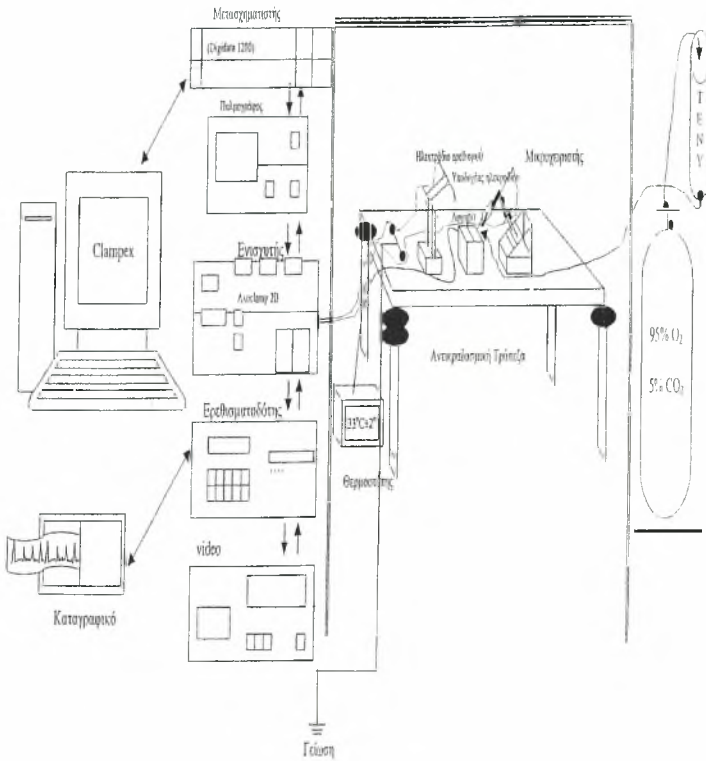
μέσω των οποίων τροφοδοτούνται οι τομές στο λουτρό καταγραφής με T.E.N.Y, εισέρχονται προηγουμένως στον εσωτερικό θάλαμο του λουτρού με αποτέλεσμα το εγκεφαλονωτιαίο υγρό προτού αρχίσει να διαβρέχει τον ιστό να αποκτά την ίδια θερμοκρασία με αυτή του περιβάλλοντος υγρού ( $33^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Επιπλέον, το νερό στον εσωτερικό θάλαμο οξυγονώνεται συνεχώς προκειμένου με την παραγωγή υδρατμών να δημιουργείται κορεσμένη σε οξυγόνο ατμόσφαιρα πάνω από την έδρα όπου τοποθετούνται οι τομές του ιπποκάμπου (εικ 14).

Η τοποθέτηση των μικροπιπετών στη CA1 περιοχή των τομών του ιπποκάμπου γίνεται με τη βοήθεια μικροχειριστών (Narishige Japan, μοντέλο M-P1), στερεοσκοπίου Nikon (μοντέλο SMZ-U/UW10/A/24) και πηγή φωτισμού με τεχνολογία οπτικών ινών για την παραγωγή ψυχρού φωτισμού (Nikon Optical Fiber Light Source). Όλο το σύστημα καταγραφής βρίσκεται τοποθετημένο πάνω σε ειδική αντικραδασμική τράπεζα για να γίνεται όσο το δυνατόν καλύτερη απόσβεση κραδασμών από τον περιβάλλοντα χώρο. Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι όλα τα πειράματα πραγματοποιούνται σε χώρο που περιβάλλεται από κλωβό Faraday για να αποκλείεται ο ηλεκτρικός θορύβος που μπορεί να επηρεάσει τις μετρήσεις κατά τη διάρκεια των καταγραφών. Για τον ίδιο λόγο όλα τα ηλεκτρονικά μηχανήματα που χρησιμοποιούνται συνδέονται με γείωση (εικ.15).



**Εικ.14.** Ηλεκτροφυσιολογία του ιπποκάμπου *in vitro*. Υδατόλουτρο διπλής φάσης φιλοξενεί τις λεπτές τομές διαποτιζόμενες με θερμαινόμενο TENV υδροστατικά φερόμενο από βάλινο δοχείο (ΥΔ= Υδατόλουτρο, Θ=θερμοστάτης, Θμ=θερμόμετρο). Στη συγκεκριμένη τομή το καταγραφικό ηλεκτρόδιο είναι τοποθετημένο στον πυραμιδικό νευρώνα της CA1 στοιβάδας του ιπποκάμπου και το ηλεκτρόδιο διέγερσης είναι τοποθετημένο στην περιοχή των παράπλευρων Shaffer για τη συναπτική καταγραφή.

### Κλωβός Faraday



*Εικ.15. Σύστημα καταγραφής ανάλυσης δεδομένων*

### **Ενδοκυττάρειες καταγραφές**

Οι ηλεκτροφυσιολογικές ενδοκυττάρειες καταγραφές πραγματοποιούνται με γυάλινες μικροπιπέτες οι οποίες περιέχουν διάλυμα 2M οξείκου καλίου αντίστασης 80-120 MΩ. Για την κατασκευή των μικροπιπετών-μικροηλεκτροδίων χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα τριχοειδή 1,2 mm, που εσωτερικά φέρουν μικροϊνες, και ειδικός εξολκέας (Brown – flaming μοντέλο P-97 Sutter Instruments California). Η αντίσταση των ηλεκτροδίων ρυθμίζεται να είναι τόση ώστε να μην επηρεάζονται οι ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές. Η καταγραφή γίνεται από νευρώνες της CA1 περιοχής της πυραμιδικής στοιβάδας

του ιπποκάμπου. Για την καταγραφή των αποκρίσεων των κυττάρων χρησιμοποιείται ερεθισματοδότης (master-8 A.M.P.I), ενισχυτής Axoclamp 2B για τη παραγωγή ηλεκτρικού σήματος (Axon Instruments) με δυνατότητα ενεργής σύνδεσης με γέφυρα Wheatstone που επιτρέπει την παροχή ρεύματος διαμέσου του μικροηλεκτροδίου καταγραφής, προενισχυτής DC με εμπέδηση υψηλής εισόδου (Axoclamp HS-2A, Axon-Instruments Inc.) για την ενίσχυση του καταγραφόμενου σήματος, αναλογικός παλμογράφος (HAMEG HM-305) με σκοπό τη συνεχή παρακολούθηση των αποκρίσεων του δυναμικού της μεμβράνης, μετατροπέας σήματος (αναλογικού-ψηφιακού και αντίστροφα) ( Digidata 1200, Axon Instruments) και το πρόγραμμα πρόσληψης και ανάλυσης δεδομένων pCLAMP 5.03 (Axon Instruments). Τα πειραματικά αποτελέσματα αποθηκεύονται με τη μορφή αναλογικού σήματος σε κασέτες καταγραφέα εικόνας-ήχου (DTR 1204 digital tape recorder) και σε χαρτί με τη χρησιμοποίηση ενός καταγραφικού χάρτου (Astromed, DASH IV, Model XL). Όλα τα δεδομένα αποθηκεύονται σε H/Y.

Όλα τα πειράματα με την τεχνική καθήλωσης ρεύματος πραγματοποιήθηκαν διαμέσου ενισχυτή τύπου Axoclamp 2A. Ωστόσο, κατά την παροχή ρεύματος  $I_0$  προέκυπτε πτώση τάσης κατά μήκος του ηλεκτροδίου  $V_e$  η οποία εξαρτάται από την αντίσταση του ηλεκτροδίου ( $R_e$ ). Η τιμή της τάσης που καταγράφεται από τον ενισχυτή ισούται με το άθροισμα της μεταβολής του δυναμικού της μεμβράνης του κυττάρου  $V_m$  και της τάσης  $V_e$ . Προκειμένου να καταγραφεί η πραγματική τιμή του δυναμικού μεμβράνης, κατά τη διάρκεια της διοχέτευσης ρεύματος, η  $V_e$  είναι απαραίτητο να ελαχιστοποιηθεί και η απαίτηση αυτή εκπληρώνεται μέσω της λειτουργίας εξισορρόπησης της γέφυρας. Εκτός αυτού για τη ορθή μέτρηση του δυναμικού της μεμβράνης του κυττάρου ήταν απαραίτητη η εξάλειψη μεταβολών στη μετρούμενη τιμή της διαφοράς δυναμικού οφειλόμενες σε δυναμικά σύνδεσης (junction potentials) που αναπτύσσονται στο σημείο επαφής υλικών διαφορετικής αγωγιμότητας. Αυτό επιτυγχάνονταν με την εφαρμογή ρεύματος DC αντίθετης πολικότητας μέσω του ρυθμιστή offset. Τέλος, η ανάπτυξη χωρικής

αντίστασης σε διάφορα σημεία του συστήματος καταγραφής, και ιδιαίτερα στα γυάλινα τοιχώματα του μικροηλεκτροδίου, η οποία θα μπορούσε να λειτουργήσει κατά τη διάρκεια της καταγραφής ως φίλτρο με συνέπεια το μηδενισμό σημάτων υψηλής συχνότητας, ελαχιστοποιείται με την παροχή ρεύματος αντίθετης πολικότητας (capacitance compensation).

Για την επίτευξη της εισόδου του μικροηλεκτροδίου στο νευρώνα, προωθείται το ηλεκτρόδιο μέσα στον ιστό έως ότου προσεγγίσει τη μεμβράνη ενός πυραμιδικού κυττάρου, γεγονός το οποίο γίνεται αντιληπτό οπτικά με την εμφάνιση μιας μικρής πτώσης τάσης στην οθόνη του παλμογράφου. Με τη εφαρμογή σύντομου ρεύματος υψηλής συχνότητας και καθορισμένης διάρκειας δημιουργείται μια μηχανική ταλάντωση του άκρου του μικροηλεκτροδίου με αποτέλεσμα τη διάτρηση της μεμβράνης του κυττάρου. Στη συνέχεια η εφαρμογή συνεχούς καθοδικού ρεύματος επιτυγχάνει την εγκόλπωση του ηλεκτροδίου από τη μεμβράνη του κυττάρου, απαραίτητη για τη σταθερή καταγραφή μεταβολών του δυναμικού της μεμβράνης του νευρώνα. Ο μηχανισμός εισόδου και εγκόλπωσης της μικροπιπέττας από τη μεμβράνη του κυττάρου δεν είναι πλήρως κατανοητός μέχρι στιγμής, ωστόσο στην όλη διαδικασία θεωρείται ότι εμπλέκονται ελκτικές δυνάμεις μεταξύ φορτίων που αναπτύσσονται στην άκρη του μικροηλεκτροδίου και στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης.

Οι καταγραφές πραγματοποιούνται σε νευρώνες που παρουσιάζουν σταθερό δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης υπερπολωμένο πλέον του  $-55$  mV και δυναμικά ενέργειας με πλάτος μεγαλύτερο από  $75$  mV. Το απόλυτο δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης υπολογίζεται από τη διαφορά μεταξύ της τιμής του δυναμικού πριν την απόσυρση του μικροηλεκτροδίου από τον νευρώνα και της τιμής αμέσως μετά. Υπερπολωτικοί παλμοί ρεύματος διάρκειας  $10$  ms και συχνότητας  $100$  Hz, χορηγούνταν δια μέσου του μικροηλεκτροδίου στο εσωτερικό του νευρώνα, παρέχοντας τη δυνατότητα μέτρησης της αντίστασης της μεμβράνης κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.



### *Νευροφαρμακολογία in vitro*

Για να μελετηθούν τα μετασυναπτικά διεγερτικά δυναμικά τα οποία οφείλονται αποκλειστικά σε διέγερση των υποδοχέων NMDA ή των υποδοχέων GABA<sub>A</sub> έγιναν οι παρακάτω φαρμακολογικοί χειρισμοί: χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που περιείχε τον ανταγωνιστή των AMPA υποδοχέων, 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione disodium (CNQX), τον ανταγωνιστή των GABA<sub>A</sub> υποδοχέων bicuculline methochloride (Bic), και τον ανταγωνιστή των GABA<sub>B</sub> υποδοχέων (3-Aminopropyl)(diethoxymethyl)phosphinic acid (CGP 35348) και τον ανταγωνιστή των NMDA υποδοχέων AP5. Οι παραπάνω ουσίες προστίθενται στο υγρό διαπότισης των τομών (TENY) σε συγκεντρώσεις: CNQX:50μM, BIC:20μM, CGP35348: 500μM και AP5: 10μM.

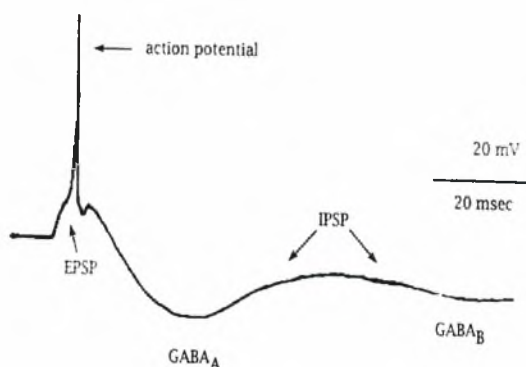
### *Στατιστική μελέτη*

Τα δεδομένα εκφράστηκαν με τον μέσο όρο  $\pm$  το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (S.E.M.). Για τη σύγκριση μεταξύ των τιμών χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test. Σημαντικά στατιστική διαφορά καθορίστηκε για τις τιμές που εμφάνιζαν  $p < 0,05$ . Σε όλες τις περιπτώσεις ως n καθορίζεται ο αριθμός των νευρώνων.

## 8. ΗΛΕΚΤΡΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΑΜΠΟΥ

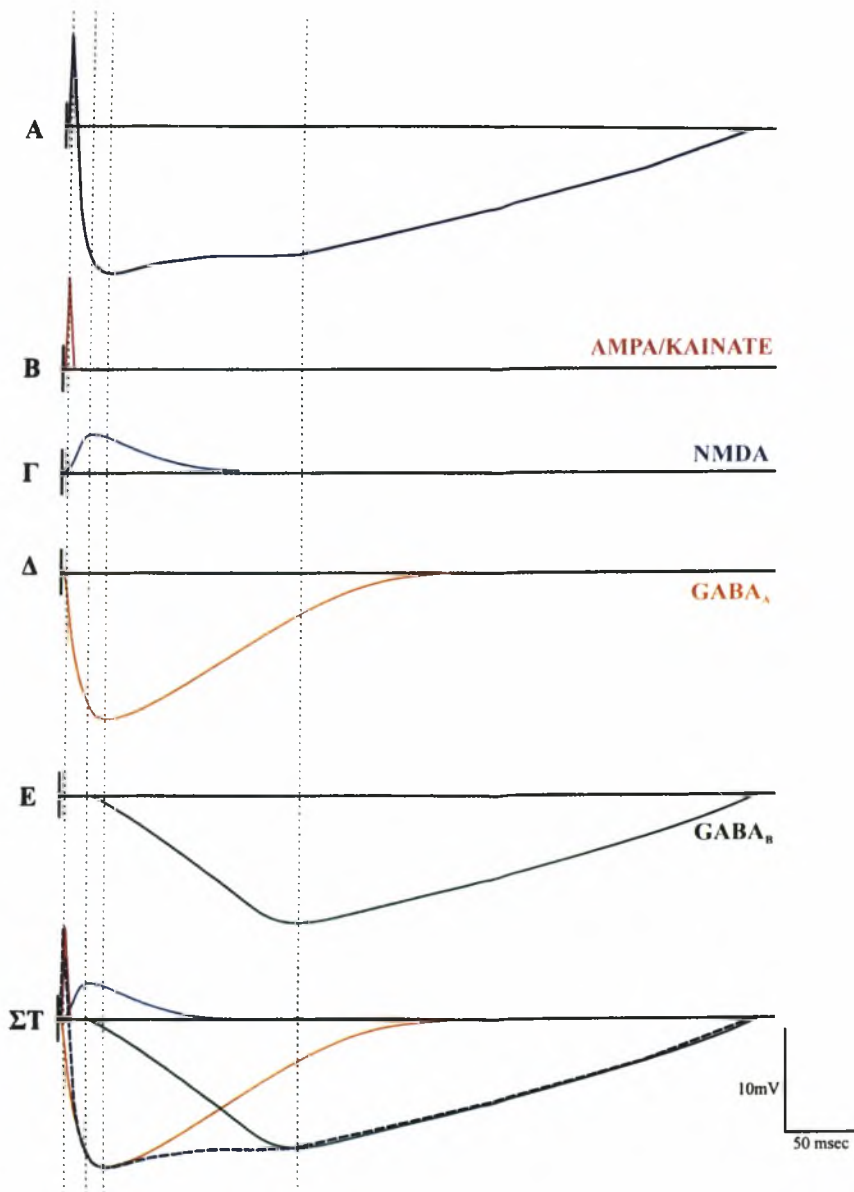
Τα πυραμιδικά κύτταρα του ιπποκάμπου είναι διεγερτικά κύτταρα τα οποία συνθέτουν και εκλύουν ως νευροδιαβιβαστή το γλουταμινικό οξύ. Το γλουταμινικό προκαλεί μέσω μετασυναπτικών υποδοχέων διεγερτικά συναπτικά δυναμικά (EPSPs) τα οποία εκπολώνουν τη μετασυναπτική κυτταρική μεμβράνη. Υπάρχουν δύο τύποι μετασυναπτικών υποδοχέων γλουταμινικού: οι ιοντοτρόποι υποδοχείς και οι μεταβολοτρόποι υποδοχείς. Οι ιοντοτρόποι υποδοχείς διακρίνονται σε υποδοχείς NMDA και μη NMDA ή AMPA. Οι υποδοχείς AMPA διεγείρονται γρηγορότερα είναι διαπερατοί σε ιόντα καλίου και νατρίου και αποτελούν την κυρίαρχη συνιστώσα του EPSP. Οι υποδοχείς NMDA ενεργοποιούνται αργότερα, ωστόσο λόγω της διαπερατότητάς τους και σε ιόντα ασβεστίου είναι ιδιαίτερα σημαντικοί στην ενεργοποίηση ασβεστιοεξαρτωμένων ενζύμων και συστημάτων δεύτερων αγγελιοφόρων στο μετασυναπτικό κύτταρο. Στην καθυστέρηση κατά τη διάνοιξη της ροής ιόντων διαμέσου του διαύλου αυτού οφείλεται η ύστερη συνιστώσα του EPSP (Kandel, 1997). Ενδοκυττάρια καταγραφή από πυραμιδικό νευρώνα της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου μετά από διέγερση των παράπλευρων ινών του Schaffer εμφανίζει την κυματομορφή της εικόνας 16. Όπως προκύπτει και από την εικόνα, η αρχική μετασυναπτική διέγερση του νευρώνα που οδηγεί σε δυναμικό ενέργειας ακολουθείται από υπερπόλωση της μεμβράνης που διακρίνεται σε δύο φάσεις: μία γρήγορη και μία αργή. Οι δύο αυτές φάσεις οφείλονται στα μετασυναπτικά ανασταλτικά δυναμικά: f-IPSP και s-IPSP αντίστοιχα. Τα δυναμικά αυτά οφείλονται στην έκλυση του νευροδιαβιβαστή γ-αμινοβουτυρικό (GABA) από ενδονευρώνες της CA1 περιοχής που νευρώνονται από ίνες της οδού Schaffer και διεγειρόμενοι εκλύουν GABA σε πυραμιδικούς νευρώνες. Ο ανασταλτικός αυτός νευροδιαβιβαστής ενεργοποιεί δύο είδη μετασυναπτικών υποδοχέων. Τους υποδοχείς GABA<sub>A</sub>, που είναι ιοντοτρόποι και ελέγχουν άμεσα ένα δίαυλο χλωρίου, και τους GABA<sub>B</sub>, που είναι μεταβολο-

τρόποι και μέσω δευτέρων αγγελιοφόρων ενεργοποιούν ένα διάλυο καλίου. Ο έλεγχος των διαύλων  $GABA_A$  επιτρέπει την εισροή  $Cl^-$  στο κύτταρο με αποτέλεσμα την υπερπόλωση της μεμβράνης. Η διάνοιξη των διαύλων αυτών αυξάνει την αγωγιμότητα ηρεμίας και «βραχυκυκλώνει» κάθε διεγερτικό ρεύμα που εισρέει στο κύτταρο. Οι διάλυοι  $GABA_A$  είναι υπεύθυνοι για το ταχύ μετασυναπτικό ανασταλτικό δυναμικό (f-IPSP), ενώ οι διάλυοι  $GABA_B$  για το βραδύ μετασυναπτικό ανασταλτικό δυναμικό (s-IPSP).



*Εικ.16. Ενδοκυττάρια καταγραφή νευρώνα της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου μετά από διέγερση των ινών της οδού Schaffer. Το EPSP ακολουθείται από ένα IPSP με γρήγορη ( $GABA_A$ ) και αργή ( $GABA_B$ ) φάση (Johnston and Amaral, 1997)*

Το μέγεθος (amplitude) του EPSPs κυμαίνεται από λιγότερο από 1mV μέχρι μερικές δεκάδες mV, ενώ το IPSPs κυμαίνεται από 1 έως 10mV. Η άνοδος του χρόνου του EPSP (rise time) είναι η άνοδος από το 10% στο 90% της καμπύλης και κυμαίνεται μεταξύ 5-20ms. Το IPSP είναι πολύ πιο αργό από το EPSP και χαρακτηρίζεται από δύο συστατικά. Το γρήγορο συστατικό fIPSP κορυφώνεται σε 20-50ms από την εφαρμογή του ερεθίσματος και ολοκληρώνεται σε 100-500ms. Το αργό συστατικό sIPSP κορυφώνεται σε 100ms περίπου και μπορεί να χρειασθεί πάνω από 1sec για να ολοκληρωθεί (Johnston and Amaral, 1997) (εικ.17).



Εικ.17. Τα AMPA, NMDA και GABA συστατικά της συναπτικής απάντησης.

## ***Παθητικές ηλεκτρικές ιδιότητες των νευρώνων της περιοχής CA1 του ιπποκάμπου***

Όταν ένας νευρώνας μεταδίδει σήματα η τάση της μεμβράνης μεταβάλλεται συνεχώς. Εάν ένα ερέθισμα θα υπερβεί ή όχι τον ουδό καθορίζεται από τις παθητικές ηλεκτρικές ιδιότητες των νευρώνων οι οποίες είναι σταθερές και δεν αλλάζουν κατά τη διάρκεια μετάδοσης των ηλεκτρικών σημάτων. Υπάρχουν τρεις παθητικές ιδιότητες:

- 1. η ηλεκτρική αντίσταση της μεμβράνης εν ηρεμία,**
- 2. η ηλεκτρική χωρητικότητα της μεμβράνης και**
- 3. η αξονική ενδοκυτταρική αντίσταση κατά μήκος του νευράξονα και των δενδριτών.**

Οι παθητικές αυτές ιδιότητες διαδραματίζουν καίριο ρόλο στη μετάδοση των ηλεκτρικών σημάτων διότι παρέχουν την οδό επιστροφής, μέσω της οποίας τα ενεργά ρεύματα ρέουν προς το εσωτερικό του κυττάρου και προς το εξωτερικό περιβάλλον του. Αυτές οι ιδιότητες καθορίζουν τη χρονική εξέλιξη του συναπτικού δυναμικού το οποίο παράγεται από το συναπτικό ρεύμα. Καθορίζουν επίσης το εάν ένα συναπτικό δυναμικό που δημιουργείται σε έναν δενδρίτη θα εξελιχθεί σε εκπόλωση που θα υπερβεί ή όχι τον ουδό, στη ζώνη εκκίνησης πάνω στον εκφυτικό κώνο του νευράξονα. Οι παθητικές ιδιότητες είναι χρήσιμες για τον καθορισμό της ταχύτητας με την οποία μεταδίδεται ένα δυναμικό ενεργείας μετά τη δημιουργία του (Kandel et al, 1999).

### **1. Η ηλεκτρική αντίσταση της μεμβράνης εν ηρεμία**

Η σχέση ρεύματος και τάσης ορίζει μία αντίσταση η οποία καλείται αντίσταση εισόδου του νευρώνα  $R_m$ . Η αντίσταση εισόδου του κυττάρου καθορίζει το μέγεθος της εκπόλωσης την οποία προκαλεί ένα σταθερό ρεύμα. Σύμφωνα με το νόμο του Ohm το μέγεθος της εκπόλωσης  $V$  είναι:

$$V=I \cdot R$$

Έτσι από δύο κύτταρα που δέχονται τα ίδια συναπτικά ρεύματα, εκείνο το οποίο έχει τη μεγαλύτερη αντίσταση εισόδου θα εμφανίσει μεγαλύτερη μεταβολή της τάσης μεμβράνης. Η αντίσταση εισόδου εξαρτάται τόσο από την πυκνότητα των διαύλων εν ηρεμία στη μεμβράνη όσο και από το μέγεθος του νευρώνα. Όσο μεγαλύτερος είναι ο νευρώνας τόσο μεγαλύτερο είναι το εμβαδόν της μεμβράνης του και τόσο μικρότερη είναι η αντίσταση εισόδου, δεδομένου ότι θα υπάρχουν περισσότεροι διάυλοι εν ηρεμία για να άγουν ιόντα.

## **2. Η ηλεκτρική χωρητικότητα της μεμβράνης**

Το εύρος των μεταβολών του δυναμικού μεμβράνης θυμίζει τη συμπεριφορά ενός αντιστάτη. Δεν συμβαίνει όμως το ίδιο και με τη χρονική εξέλιξή τους. Έτσι ενώ ένας αντιστάτης αποκρίνεται σε μία βαθμιαία μεταβολή του ρεύματος με μία όμοια, ταχεία, βαθμιαία μεταβολή της τάσης, το κύτταρο εμφανίζει μία απόκριση της τάσης της οποίας η αύξηση καθυστερεί σε σχέση με τη βαθμιαία μεταβολή του ρεύματος. Η ιδιότητα αυτή της μεμβράνης οφείλεται στην ηλεκτρική χωρητικότητά της. Η χωρητικότητα της μεμβράνης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού μεταβολής του δυναμικού μεμβράνης ως απόκριση σε μία ώση ρεύματος.

## **3. Αξονική ενδοκυτταρική αντίσταση**

Το εύρος ενός σήματος με τάση κάτω από τον ουδό το οποίο άγεται κατά μήκος των δενδριτών και των νευραξόνων εξασθενεί όσο αυξάνεται η απόσταση από το αρχικό σημείο δημιουργίας του. Όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος του δενδρίτη τόσο μεγαλύτερη είναι η αντίσταση.

Η νευρωνική ολοκλήρωση επειδή εξαρτάται από την άθροιση συναπτικών δυναμικών που εξαπλώνονται παθητικά στη ζώνη εκκίνησης επηρεάζεται από τις παθητικές ιδιότητες της μεμβράνης.

Έτσι, η χρονική σταθερά επιτρέπει να προσδιορισθεί η χρονική εξέλιξη του συναπτικού δυναμικού. Όσο μεγαλύτερη είναι η χρονική σταθερά τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα δύο διαδοχικές ώσεις από έναν διεγερτικό προσυναπτικό νευρώνα να προστεθούν για να οδηγήσουν την κυτταρική μεμβράνη στον ουδό δημιουργίας ενός δυναμικού ενέργειας.

Τα αποτελέσματα της μελέης προέρχονται από ενδοκυττάρειες καταγραφές (διάρκειας 1-3 ωρών) πυραμιδικών κυττάρων της CA1 περιοχής της ραχιαίας μοίρας του ιπποκάμπου. Όλοι οι νευρώνες ήταν πυραμιδικοί σύμφωνα με την ανατομική τους θέση, τη συναπτική απάντηση και τα ηλεκτροφυσιολογικά τους χαρακτηριστικά. Οι καταγραφές στη μελέτη αυτή έγιναν σε τομές του ιπποκάμπου προερχόμενες από τη ραχιαία μοίρα του ιπποκάμπου, διότι η ραχιαία μοίρα παρουσιάζει μεγαλύτερη διεγερσιμότητα και μεγαλύτερη πυκνότητα νευρώνων από την κοιλιακή μοίρα.





## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Ομάδα ελέγχου και Fentanyl-treated ομάδα

#### Παθητικές ιδιότητες

Το πρώτο ερώτημα που έπρεπε να απαντηθεί ήταν εάν η *in vivo* χορήγηση φεντανύλης επηρεάζει τα μεμβρανικά χαρακτηριστικά των πυραμιδικών νευρώνων. Για το σκοπό αυτό χορηγήθηκαν τετράγωνοι εκπολωτικοί και υπερπολωτικοί παλμοί στις δύο ομάδες νευρώνων.

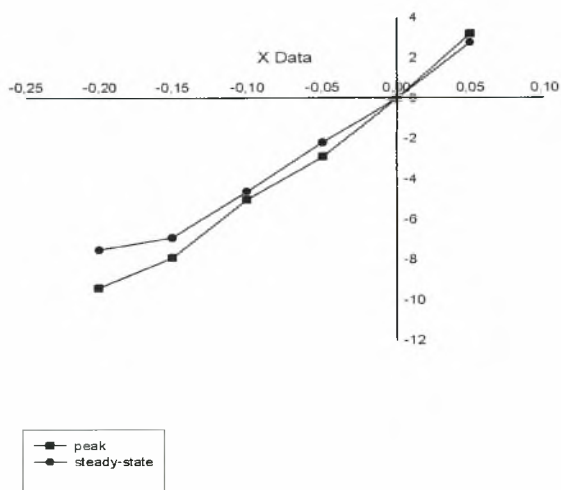
Η μετασυναπτική διεγερσιμότητα των κυττάρων της ομάδας ελέγχου και των κυττάρων της fentanyl-treated ομάδας ελέχθηκε με τη σύγκριση των παθητικών ιδιοτήτων των δύο ομάδων νευρώνων. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν οι παθητικές ιδιότητες της μεμβράνης, το δυναμικό ηρεμίας, η αντίσταση εισόδου και η χρονική σταθερά.

Το δυναμικό ηρεμίας των δύο ομάδων νευρώνων (saline:  $-62.1 \pm 2.4$  mV,  $n=54$ ; fentanyl:  $-64.6 \pm 0.6$  mV,  $n=27$ ;  $p>0.05$ ) δεν βρέθηκε να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά.

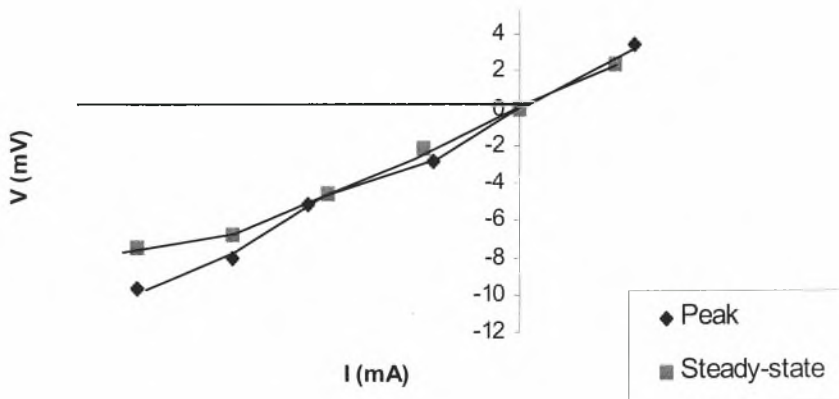
Χρησιμοποιήθηκε ο μικρότερος υπερπολωτικός παλμός για τον υπολογισμό της αντίστασης εισόδου και της χρονικής σταθεράς στις δύο ομάδες νευρώνων. Η αντίσταση εισόδου των νευρώνων υπολογίστηκε από την κυματομορφή που αντιστοιχεί στον υπερπολωτικό τετράγωνο παλμό με το μικρότερο πλάτος (δηλαδή 0.05 nA) διάρκειας 250msec (εικ.18,19). Η αντίσταση εισόδου δεν διέφερε μεταξύ των κυττάρων των δύο ομάδων (saline:  $51.9 \pm 1.7$  M $\Omega$ ,  $n=48$ ; fentanyl:  $47.0 \pm 3.7$  M $\Omega$ ,  $n=27$ ;  $p>0.05$ ).

Επίσης η σταθερά χρόνου-τ δεν βρέθηκε να διαφέρει μεταξύ των κυττάρων των δύο ομάδων (saline:  $15.2 \pm 1.3$  ms,  $n=19$ ; fentanyl:  $17.2 \pm 1.5$  ms,  $n=9$ ;  $p>0.05$ ).

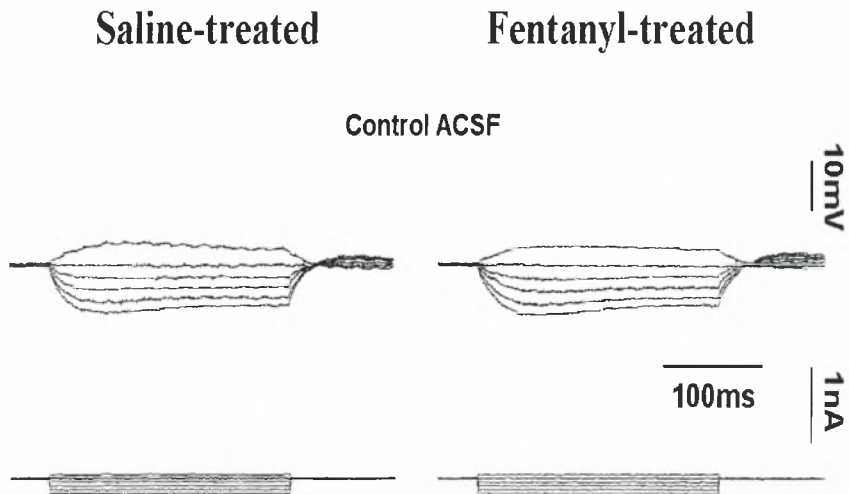
### α. Αντίσταση R Saline-treated κυττάρων



### β. Αντίσταση R fentanyl -treated κυττάρων

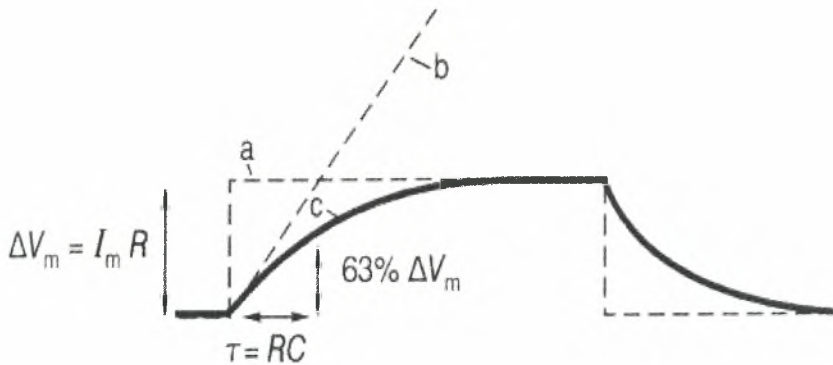


**Εικ. 18α-β.** Γραφική παράσταση του ρεύματος (άξονας x) που εφαρμόζεται στο νευρώνα με τη διαφορά δυναμικού (άξονας y) εκατέρωθεν της μεμβράνης που προκύπτει από την εφαρμογή ρεύματος. Η αντίσταση του νευρώνα υπολογίζεται από την κλίση του ευθύγραμμου τμήματος της καμπύλης κατά το οποίο δεν παρατηρείται ενεργοποίηση τασεοεξαρτώμενων αγωγιμοτήτων.



**Εικ. 19.** Η σχέση ρεύματος-τάσης ( $I-V$ ) δεν μεταβάλλεται μετά την *in vivo* χορήγηση φεντανόλης

Η χρονική σταθερά της μεμβράνης  $\tau$  είναι το γινόμενο της αντίστασης επί τη χωρητικότητα της μεμβράνης ( $RC$ ). Είναι ο χρόνος που απαιτείται για να επιτευχθεί το 63% της τελικής τάσης και μπορεί να μετρηθεί πειραματικά (εικ 20). Η χρονική σταθερά διαφόρων νευρώνων κυμαίνεται από 1 έως 20ms. Όσο μεγαλύτερη είναι η χρονική σταθερά τόσο αυξάνεται η πιθανότητα δύο διαδοχικές ώσεις από ένα διεγερτικό προσυναπτικό νευρώνα να προστεθούν για να οδηγήσουν την κυτταρική μεμβράνη στον ουδό δημιουργίας ενός δυναμικού ενέργειας.



**Εικ. 20.** Ο ρυθμός μεταβολής του δυναμικού μεμβράνης επιβραδύνεται υπό την επίδραση της χωρητικότητας της μεμβράνης. Στο επάνω διάγραμμα φαίνεται η απόκριση του δυναμικού μεμβράνης ( $\Delta V_m$ ) σε μία ορθογώνια ώση ρεύματος. Η πραγματική μορφή της απόκρισης (γραμμή c) συνδυάζει τις ιδιότητες ενός αμιγώς αντιστατικού στοιχείου (γραμμή a) και ενός αμιγώς πυκνωτικού στοιχείου (γραμμή b).

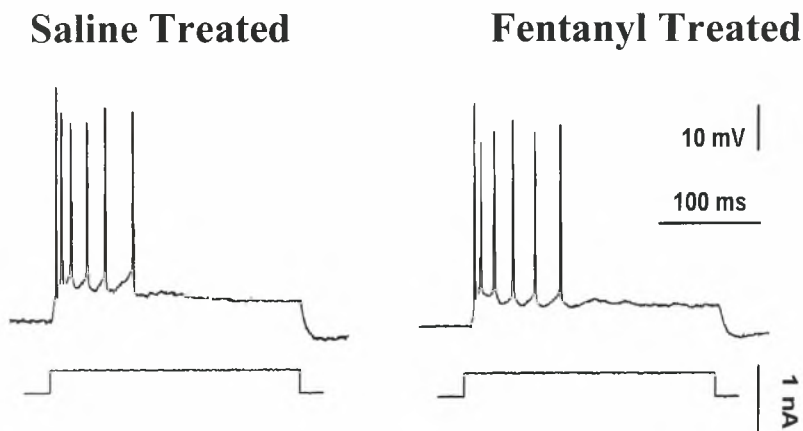
Συνολικά, οι παθητικές ιδιότητες των CA1 πυραμιδικών κυττάρων δεν μεταβάλλονται μετά τη χορήγηση *in vivo* φεντανύλης. Οι παθητικές ιδιότητες των κυττάρων των δύο ομάδων φαίνονται στον πίνακα 1.

**Πίνακας 1.** Παθητικές ιδιότητες των κυττάρων της ομάδας ελέγχου και της ομάδας της φεντανύλης.

	RMP (mV)	Input resistance (MΩ)	χρονική σταθερά-τ (ms)
<b>Saline-treated</b>	-62.1 ± 2.4 n=54	51.9 ± 1.7 n=48	15.2 ± 1.3 n=19
<b>fentanyl -treated</b>	-64.6 ± 0.6 n=27	47 ± 3.7 n=27	17.2 ± 1.5 n=9
	p>0.05	p>0.05	p>0.05

### Μετασυναπτική διεγερσιμότητα

Στη συνέχεια εξετάστηκε η διεγερσιμότητα των πυραμιδικών νευρώνων και η μετασυναπτική τους απάντηση. Τα δυναμικά τα οποία προκλήθηκαν μετά από διέγερση με υπερπολωτικό τετράγωνο παλμό έντασης 0.05 nA και διάρκειας 250msec ήταν παρόμοια στους νευρώνες της ομάδας ελέγχου και της ομάδας της φεντανύλης (εικόνα 21). Επίσης, όπως φαίνεται από τις ενδοκυττάρειες καταγραφές της μετασυναπτικής τους απάντησης (εικόνα 21), τα δυναμικά τα οποία προκαλούνται μετά την εφαρμογή υπερπολωτικού ρεύματος διάρκειας 500ms και έντασης 0.4 nA, παρουσιάζουν ίδια χαρακτηριστική κυματομορφή και στις δύο ομάδες. Μετά από σύγκριση του αριθμού δυναμικών ενεργείας που προκύπτουν ως αποτέλεσμα της εκπόλωσης, βρέθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες νευρώνων (saline:  $4.8 \pm 0.5$ ,  $n=12$ ; fentanyl:  $5.7 \pm 1.1$ ,  $n=7$ ;  $p>0.05$ ).



**Εικ. 21.** Μετασυναπτική απάντηση των νευρώνων της saline-treated ομάδας και της fentanyl-treated ομάδας. Η κυματομορφή και ο αριθμός των δυναμικών ενεργείας που παράγονται δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά διαφορά.

## Συναπτική διαβίβαση

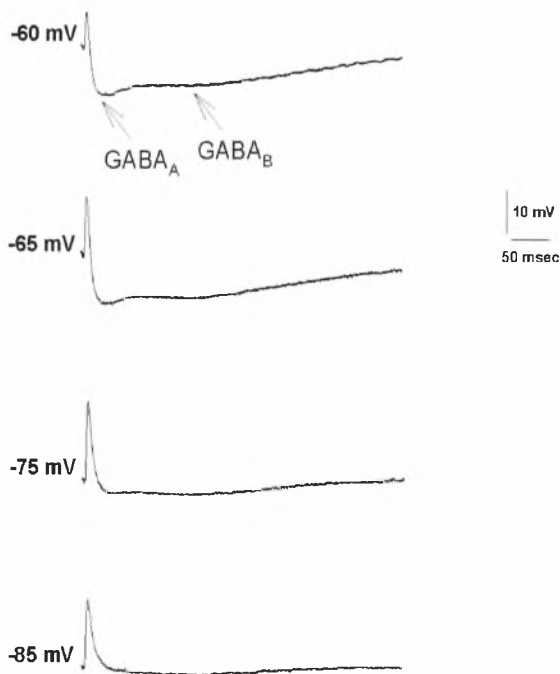
Επόμενο ερώτημα ήταν, αν μεταβάλλεται η συναπτική απάντηση των νευρώνων μετά από *in vivo* χορήγηση φεντανύλης. Για την διερεύνηση αυτού του ερωτήματος προκλήθηκαν συναπτικές απαντήσεις στους νευρώνες των δύο ομάδων.

Μετασυναπτικά δυναμικά αποτελούμενα από διεγερτικά μετασυναπτικά δυναμικά (EPSP), ταχεία μετασυναπτικά ανασταλτικά δυναμικά (fast-IPSP) και αργά μετασυναπτικά ανασταλτικά δυναμικά (slow-IPSP) παράχθησαν χρησιμοποιώντας ηλεκτρικό ερέθισμα υποουδικής έντασης. Τα μετασυναπτικά δυναμικά καταγράφησαν σε φυσιολογικό TENEY στο δυναμικό ηρεμίας (saline:  $-63.3 \pm 0.5$  mV,  $n=22$ ; fentanyl:  $-63.7 \pm 0.7$  mV,  $n=12$ ;  $p>0.05$ ). Η αντίσταση εισόδου των κυττάρων των δύο ομάδων ήταν παρόμοια (saline-treated:  $48.8 \pm 2.5$  mV,  $n=22$ ; fentanyl-treated:  $46.8 \pm 4.6$  mV,  $n=10$ ;  $p>0.05$ ).

Εάν μεταβάλλουμε το δυναμικό της μεμβράνης από το δυναμικό ηρεμίας RMP σε υπερπολωμένο ή εκπολωμένο δυναμικό, με διοχέτευση ρεύματος ανοδικού ή καθοδικού, τότε μεταβάλλεται και το EPSP ανάλογα. Καθώς το δυναμικό μεμβράνης του νευρώνα αυξάνεται από  $-65$  mV σε  $-70$  mV, το εύρος του EPSP αυξάνεται. Αυτό συμβαίνει διότι η αύξηση της κινητήριας δύναμης [(Vm- EPSP) όπου Vm: το δυναμικό της μεμβράνης] συνεπάγεται μεγαλύτερη εισροή ρεύματος διαμέσου των συναπτικών διαύλων. Αντιθέτως, καθώς η μεμβράνη εκπολώνεται προοδευτικά, το EPSP μειώνεται και τελικά εξαφανίζεται όταν το δυναμικό της μεμβράνης φθάνει στα 0 περίπου mV (Kandel, 1999). Στην Εικόνα 22 απεικονίζονται οι μεταβολές της μετασυναπτικής απάντησης κυττάρου της ομάδας ελέγχου σε φυσιολογικό TENEY σε σχέση με τις μεταβολές του δυναμικού της μεμβράνης. Σε χαμηλότερο δυναμικό της μεμβράνης το ανασταλτικό μετασυναπτικού δυναμικού το οποίο οφείλεται στους GABA<sub>A</sub> και GABA<sub>B</sub> είναι μεγαλύτερο ενώ σε περισσότερο αρνητικά δυναμικά της μεμβράνης ( $-80$  mV) είναι λιγότερο ορατό. Αυτό συμβαίνει διότι το ανασταλτικό μετασυναπτικό δυναμικό (IPSP) δημιουργείται με το άνοιγμα των διαύλων Cl<sup>-</sup> και K<sup>+</sup>. Οι διάυλοι Cl<sup>-</sup> και K<sup>+</sup> μοιάζουν ως προς το ότι τα δυναμικά αναστροφής (το

δυναμικό της μεμβράνης στο οποίο το εύρος του συναπτικού ρεύματος μηδενίζεται) έχουν πιο αρνητικές τιμές από το δυναμικό ηρεμίας. Το δυναμικό  $E_{Cl^-}$  είναι  $-70mV$  (δυναμικό Nernst) περίπου και το δυναμικό του  $E_{K^+}$  είναι  $-80mV$  και το δυναμικό ηρεμίας είναι  $-65mV$ . Έτσι η ηλεκτροχημική κινητήρια δύναμη που ασκείται στα  $Cl^-$  και  $K^+$  είναι θετική στο δυναμικό ηρεμίας, με αποτέλεσμα το άνοιγμα των διαύλων  $Cl^-$  ή  $K^+$  να προκαλεί υπερπολωτική εκροή ρεύματος. Όταν το δυναμικό μεμβράνης υπερπολώνεται στα  $-70mV$  το IPSP μηδενίζεται (δεν διατρέχει ρεύμα τον διάυλο). Περαιτέρω υπερπόλωση αναστρέφει το IPSP προς ένα εκπολωτικό μετασυναπτικό δυναμικό ( $-80mV$  και  $-100mV$ ) (Kandel, 1999).

### Κυματομορφές control κυττάρων



**Εικ. 22.** Κυματομορφές μετασυναπτικής απάντησης control κυττάρων σε διάφορα δυναμικά μεμβράνης σε φυσιολογικό TENY. Με τα βέλη υποδεικνύεται ο χρόνος εμφάνισης του  $GABA_A$  και  $GABA_B$ .

Οι συναπτικές απαντήσεις που προκλήθηκαν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των νευρώνων των δύο ομάδων. Συγκεκριμένα, για το ίδιο πλάτος διεγερτικών συναπτικών απαντήσεων παρατηρήθηκε σημαντική ελάττωση τόσο της  $GABA_A$  όσο και της  $GABA_B$ -διαμεσολαβούμενης συναπτικής αναστολής.

Το fast-IPSP (early) υπολογίστηκε στο time to peak, 20-40ms μετά την εφαρμογή του ερεθίσματος (stimulus artifact), ενώ το slow-IPSP (late) υπολογίστηκε 150ms μετά το stimulus artifact, χρονικό σημείο κατά το οποίο η συμμετοχή του fast-IPSP στο συνολικό IPSP έχει φθίνει. Το μέγιστο πλάτος (peak amplitude) του μετασυναπτικού ανασταλτικού δυναμικού τόσο του fast-IPSP όσο και του slow-IPSP ήταν σημαντικά μικρότερο στα fentanyl-treated κύτταρα συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα των control κυττάρων (πίνακας 2).

Το peak amplitude του slow-IPSP βρέθηκε σημαντικά μικρότερο στα fentanyl-treated κύτταρα (fentanyl:  $-2.3 \pm 0.5$  mV,  $n=7$ ; saline  $-4.5 \pm 0.6$  mV,  $n=22$ ;  $p<0.05$ ) κάτω από συνθήκες φυσιολογικού TENV.

Τόσο το early (37.0%) όσο και το late IPSPs (48.0%) ήταν μειωμένα σε παρόμοιο βαθμό. Επιπλέον το time to peak του fast-IPSP ήταν σημαντικά αυξημένο στα fentanyl-treated κύτταρα (saline:  $31.5 \pm 1.3$  ms,  $n=24$ ; fentanyl:  $42.6 \pm 2.6$  mV,  $n=11$ ;  $p<0.05$ ).

Το μετασυναπτικό ανασταλτικό δυναμικό το οποίο διαμεσολαβείται από τους  $GABA_B$  υποδοχείς, δηλαδή το slow-IPSP, εμφανίζεται χρονικά μακριά από το stimulus artifact και δεν συμπίπτει με κανένα άλλο στοιχείο της μετασυναπτικής κυματομορφής του πλάτους του δυναμικού. Είναι μικρό και δεν επηρεάζει τη διεγερσιμότητα όσο το  $GABA_A$ . Για τους λόγους αυτούς υπολογίζονται στις μετρήσεις μόνο τα χαρακτηριστικά του fast-IPSP.

Το εύρος του (υποουδικού) EPSP το οποίο μετρήθηκε στο δυναμικό ηρεμίας ήταν παρόμοιο στους νευρώνες της ομάδας ελέγχου ( $8.0 \pm 1.0$  mV,  $n=20$ ) και στους νευρώνες της ομάδας της φεντανύλης ( $6.8 \pm 0.6$  mV,  $n=12$ ;  $p>0.05$ ). Διέφεραν όμως στο time to peak (sa-



line:  $8.5 \pm 0.4$  ms,  $n=20$ ; fentanyl:  $12.9 \pm 0.9$  ms,  $n=12$ ;  $p < 0.05$ ) και στο half width του εύρους (εικ.26). αυτές οι μεταβολές πιθανόν μπορούν να εξηγηθούν από τη μείωση του εύρους του f-IPSP το οποίο καταγράφηκε από τους νευρώνες της ομάδας της φεντανύλης. Στις καταγραφές από νευρώνες fentanyl-treated πειραματοζώων παρατηρήθηκε ότι το time to peak του EPSP ήταν αυξημένο και το half width μεγαλύτερο. Αυτό ίσως είναι αποτέλεσμα του μειωμένου πλάτους του IPSP.

### **GABA<sub>A</sub>**

Παρουσία ανταγωνιστών των διεγερτικών υποδοχέων AMPA και NMDA CNQX και AP5 αντίστοιχα και των GABA<sub>B</sub> υποδοχέων CGP35348 στο φυσιολογικό TENVY και εφαρμόζοντας ηλεκτρικό ερέθισμα τέτοιας έντασης έτσι ώστε να προκληθεί μέγιστη απάντηση (saline:  $38.7 \pm 4.3$  V,  $n=17$ ; fentanyl:  $37.8 \pm 2.8$  V,  $n=9$ ;  $p > 0.05$ ), απομονώθηκαν μονοσυναπτικά fast-IPSP. Το δυναμικό ηρεμίας (saline:  $-63.6 \pm 1.4$  mV,  $n=11$ ; fentanyl:  $-64.6 \pm 0.9$  mV,  $n=6$ ;  $p > 0.05$ ) και η αντίσταση (saline:  $54.8 \pm 3.4$  MΩ,  $n=12$ ; fentanyl:  $43.0 \pm 5.6$  MΩ,  $n=6$ ;  $p > 0.05$ ) δε διέφεραν συγκρινόμενες με τις αντίστοιχες σε φυσιολογικό TENVY.

Καθώς το εύρος (amplitude) του μετασυναπτικού δυναμικού fast-IPSP αυξάνει όσο εκπολώνεται η μεμβράνη του νευρώνα και είναι πιο εύκολα ορατό και μετρήσιμο, υπολογίσθηκαν και συγκρίθηκαν fast-IPSP νευρώνων σε εκπολωμένο δυναμικό μεμβράνης. Έτσι σε παρόμοιο δυναμικό μεμβράνης (saline:  $-57.9 \pm 0.5$  mV,  $n=17$ ; fentanyl:  $-57.8 \pm 0.5$  mV,  $n=8$ ;  $p > 0.05$ ) και παρόμοια αντίσταση  $R_i$  (saline:  $58.5 \pm 3.5$  MΩ,  $n=15$ ; fentanyl:  $49.4 \pm 4.7$  MΩ,  $n=9$ ;  $p > 0.05$ ) μεταξύ των δύο ομάδων νευρώνων βρέθηκε ότι το πλάτος του fast-IPSP ήταν σημαντικά μικρότερο στους νευρώνες της fentanyl treated ομάδας (πίνακας 2, Εικόνα 23).

Παρουσία ανταγωνιστών υποδοχέων στο TENVY μελετήθηκαν δύο ακόμη χαρακτηριστικά του fast-IPSP: το time to peak (peak latency) και η διάρκεια μετρούμενη στο μισό του μέγιστου εύρους του

δυναμικού (half-maximal amplitude). Η διάρκεια του μέγιστου προκλητού fast-IPSP ήταν σημαντικά μικρότερη στα fentanyl-treated από ότι στα saline-treated πειραματόζωα (πίνακας 2). Το time to peak ήταν παρόμοιο και στις δύο ομάδες νευρώνων.

### *Διεγερτική συναπτική διαβίβαση*

Η καταγραφή της συναπτικής απάντησης ενός CA1 νευρώνα απεικονίζεται στην Εικόνα 24. Η συναπτική απάντηση είναι αποτέλεσμα της διέγερσης των Schaffer collaterals. Η καταγραφή A έγινε με έκλουση της τομής με φυσιολογικό TENVY ενώ η καταγραφή B με προσθήκη στο TENVY CNQX, Bicuculline και CGP55845, αναστολέων των AMPA, GABA<sub>A</sub> και GABA<sub>B</sub> αντίστοιχα. Μετά την προσθήκη των αναστολέων στο TENVY καταγράφεται μόνο το συστατικό του EPSP (του μετασυναπτικού δυναμικού διέγερσης) των NMDA υποδοχέων.

Στην εικόνα 25 απεικονίζεται επίσης η μεταβολή του EPSP ενός control νευρώνα σε διάφορα δυναμικά της μεμβράνης διατηρώντας σταθερή την τάση του ρεύματος που διοχετεύεται μέσω του ηλεκτροδίου διέγερσης. Το TENVY περιλαμβάνει ανταγωνιστές των AMPA, GABA<sub>A</sub> και GABA<sub>B</sub> και έτσι το EPSP που καταγράφεται οφείλεται στους NMDA υποδοχείς. Το EPSP αυξάνεται καθώς υπερπολώνεται η μεμβράνη του κυττάρου.

## Πίνακας 2

	Passive properties	Fast-IPSP	Slow-IPSP				
	RMP (mV)	Input resistance (MΩ)	Peak Amplitude (mV)				
		Peak Amplitude (mV)	Peak Latency (ms)				
		Duration at half amplitude (ms)	Peak Amplitude (mV)				
Saline	-62.1 ± 2.4 (54) <sup>c</sup>	51.9 ± 1.7 (48) <sup>c</sup>	6.7 ± 0.5 (24) <sup>a</sup>	11.2 ± 0.4 (17) <sup>b</sup>	21.0 ± 1.7 (17) <sup>b</sup>	91.2 ± 6.6 (15) <sup>b</sup>	4.5 ± 0.6 (22) <sup>a</sup>
Fentanyl	-64.6 ± 0.6 (26) <sup>c</sup>	47.0 ± 3.7 (27) <sup>c</sup>	4.2 ± 0.7 (11) <sup>a</sup>	8.4 ± 0.7 (9) <sup>b</sup>	21.8 ± 1.3 (9) <sup>b</sup>	61.1 ± 3.0 (9) <sup>b</sup>	2.3 ± 0.5 (7) <sup>a</sup>
			P<0.001	P<0.001		P<0.01	P<0.05

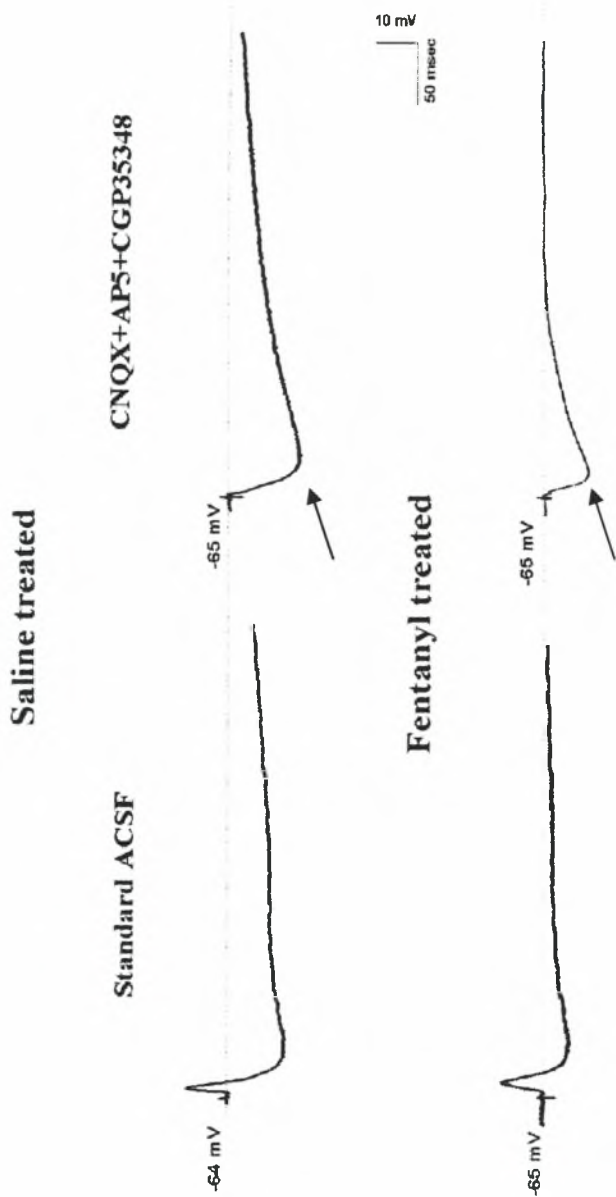
The number of cells is indicated in parentheses.

<sup>a</sup> Measures taken in the absence of drugs.

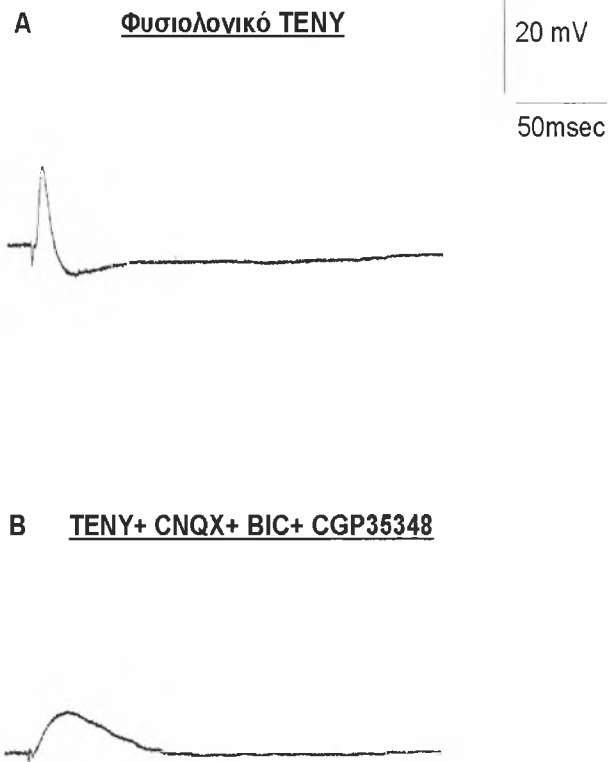
<sup>b</sup> Measures taken in the presence of antagonists of ionotropic excitatory amino acid receptors and GABA<sub>B</sub> receptors.

<sup>c</sup> Measures taken under either a or b conditions.

**fast-IPSP component NMDA saline και fentanyl treated κυττάρων**



**Εικ. 23.** Σύγκριση του fast-IPSP component NMDA των saline και fentanyl treated κυττάρων. Στις δεξιές κυματομορφές (καταγραφές σε TENV προσθήκη CNQX, AP5 και CGP35348) φαίνεται χαρακτηριστικά το μειωμένο μέγιστο εύρος του fast-IPSP των fentanyl treated κυττάρων σε σχέση με το αντίστοιχο των saline treated κυττάρων (βέλος).

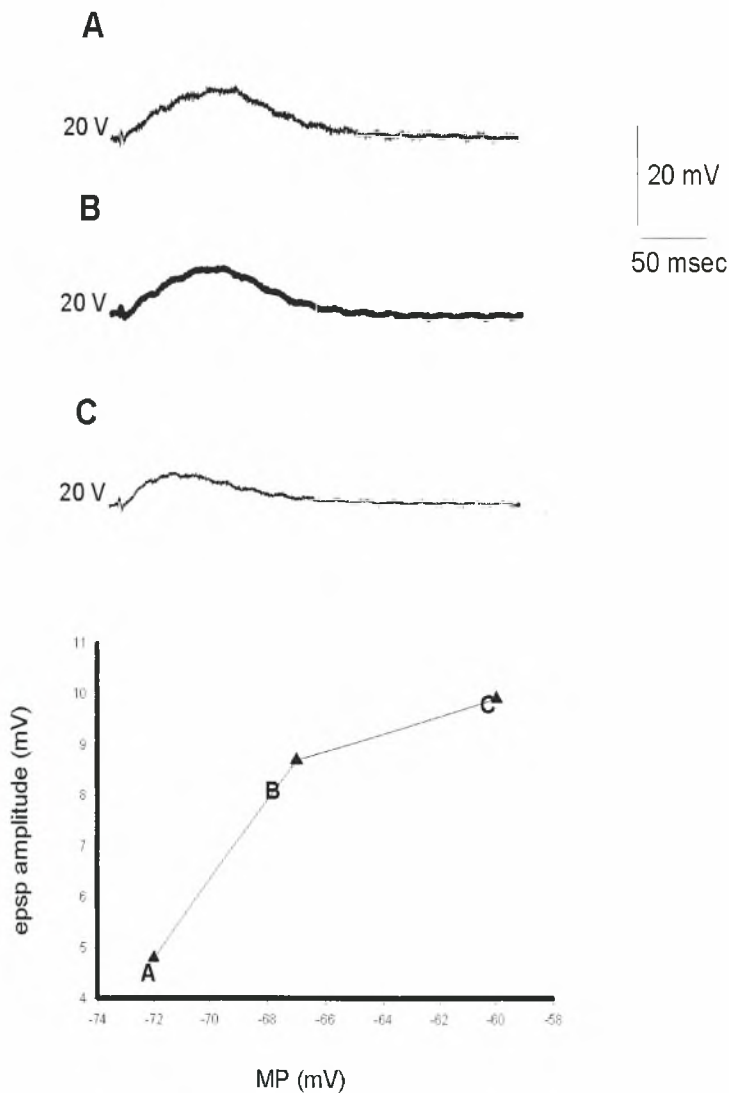


**Εικ. 24.** Συναπτική απάντηση ενός CA1 πυραμιδικού νευρώνα σε:

A) φυσιολογικό TENV και

B) δόμα TENV το οποίο περιλαμβάνει ανταγωνιστές των AMPA, GABA<sub>A</sub> και GABA<sub>B</sub>.

## Τασεοεξαρτώμενη μεταβολή του μετασυναπτικού δυναμικού οφειλόμενη στους υποδοχείς NMDA



**Εικ. 25.** Κυματομορφή και γραφική παράσταση της μεταβολής του πλάτους του EPSP.

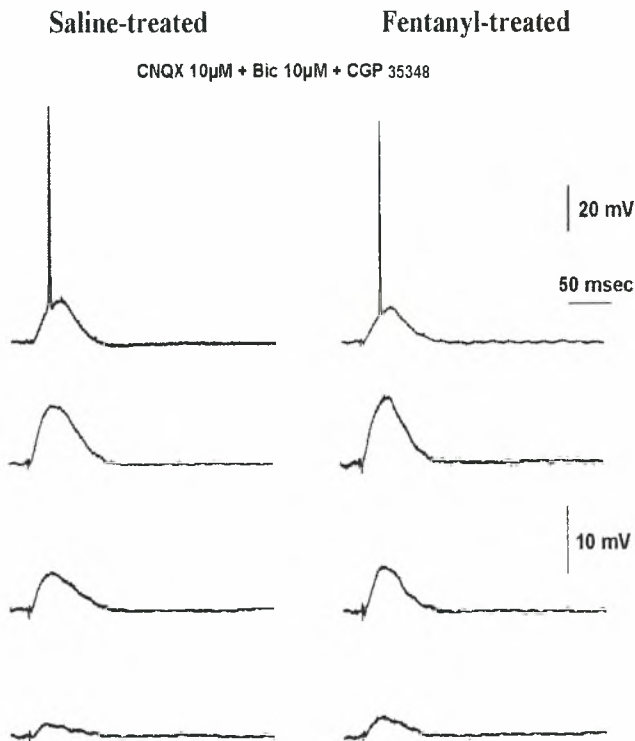
### *NMDA mediated EPSP*

Προηγούμενες μελέτες υποστήριζαν ότι η έκλυση τομών του ιππόκαμπου με TENV το οποίο περιέχει οπιοειδές, έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση στη συναπτική απάντηση της δράσης των οπιοειδών στους NMDA υποδοχείς (Swearengen and Chavkin, 1989). Για να διευκρινιστεί αν η αύξηση στη διάρκεια του EPSP στους νευρώνες των fentanyl-treated πειραματοζώων οφείλεται όχι μόνο στη μείωση του amplitude του IPSP αλλά και στην ενίσχυση της συναπτικής απάντησης από τη διέγερση των NMDA υποδοχέων, η οποία συμπίπτει χρονικά σε ένα διάστημα με το fast-IPSP (εικόνα 17), προκλήθηκαν δυναμικά ενέργειας με διέγερση των Schaffer collaterals μετά από αποκλεισμό των AMPA, GABA<sub>A</sub> και GABA<sub>B</sub> υποδοχέων με τους ανταγωνιστές CNQX, bicuculline και CGP35348, αντίστοιχα. Το EPSP που απομονώθηκε οφείλεται στη διέγερση των NMDA υποδοχέων (Andreasen et al., 1988; Davies and Collingridge, 1989).

Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική αλλαγή, ούτε στο πλάτος, στο εμβαδό ή σε οποιοδήποτε άλλο χαρακτηριστικό του NMDA στοιχείου της συναπτικής απάντησης μεταξύ των νευρώνων των saline-treated και των fentanyl-treated πειραματοζώων (πίνακας 3, εικόνα 26). Οι νευρώνες και των δύο ομάδων είχαν παρόμοιο δυναμικό ηρεμίας ( $p > 0.05$ ) και αντίσταση ( $p > 0.05$ ) (πίνακας 3). Στην εικόνα 27 απεικονίζονται σχηματικά τα υπολογιζόμενα στοιχεία του μετασυναπτικού διεγερτικού δυναμικού. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η χορήγηση φεντανύλης, αντίθετα με την ανασταλτική διαβίβαση δε φαίνεται να επηρεάζει τη διεγερτική διαβίβαση στην περιοχή CA1 του ιππόκαμπου.

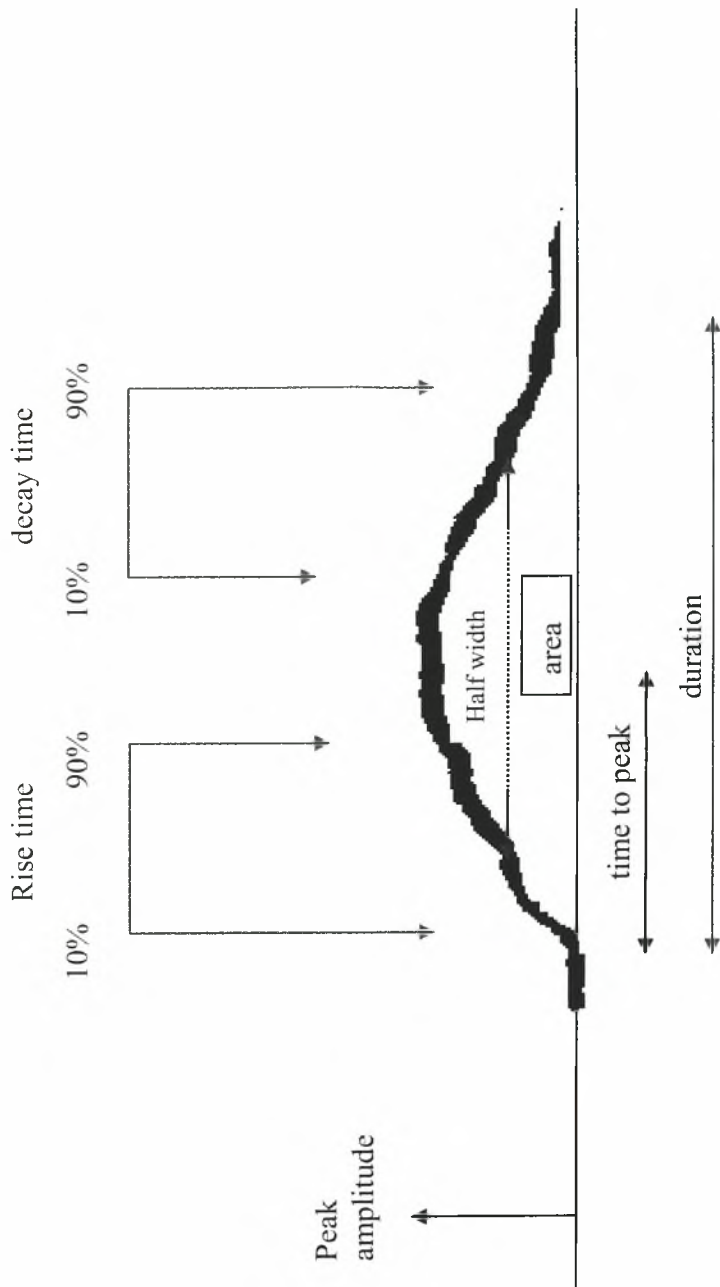
Παρατηρήθηκε ελάττωση της έντασης ερεθισμού των παράπλευρων του Schaffer για την πρόκληση ουδικών ερεθισμάτων στα fentanyl-treated κύτταρα (fentanyl:  $11.6 \pm 1.2$  V,  $n=12$ ; saline:  $18.9 \pm 2.2$  V,  $n=16$ ;  $p < 0.05$ ). Η χορήγηση φεντανύλης είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας των πυραμιδικών νευρώνων στην προσυναπτική διέγερση και το ηλεκτρικό ερέθισμα που απαιτείται για να προκληθεί δυναμικό ενέργειας, είναι χαμηλότερης έντασης.

Συμπερασματικά, η θεραπεία με φεντανύλη μειώνει τη μετασυναπτική απάντηση που οφείλεται στη διέγερση των GABA υποδοχέων. Παρατηρείται μείωση του ταχέως και του αργού μετασυναπτικού ανασταλτικού δυναμικού καταγεγραμμένο από πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής του ιπποκάμου (fast και slow-IPSP). Παρά την αυξημένη ευαισθησία που παρουσιάζουν οι νευρώνες των fentanyl-treated πειραματόζωων στο ηλεκτρικό ερέθισμα (η οποία εκδηλώνεται ως μείωση του ηλεκτρικού ερεθίσματος που απαιτείται για να φθάσει τον ουδό και να παραχθεί δυναμικό ενέργειας) δεν αυξάνει ούτε ο αριθμός των παραγομένων δυναμικών ούτε μεταβάλλεται η διεγερσιμότητα των NMDA υποδοχέων μετά τη χορήγηση της φεντανύλης.



**Εικ. 26.** EPSP control vs fentanyl-treated κυττάρων στο RMP των νευρώνων.



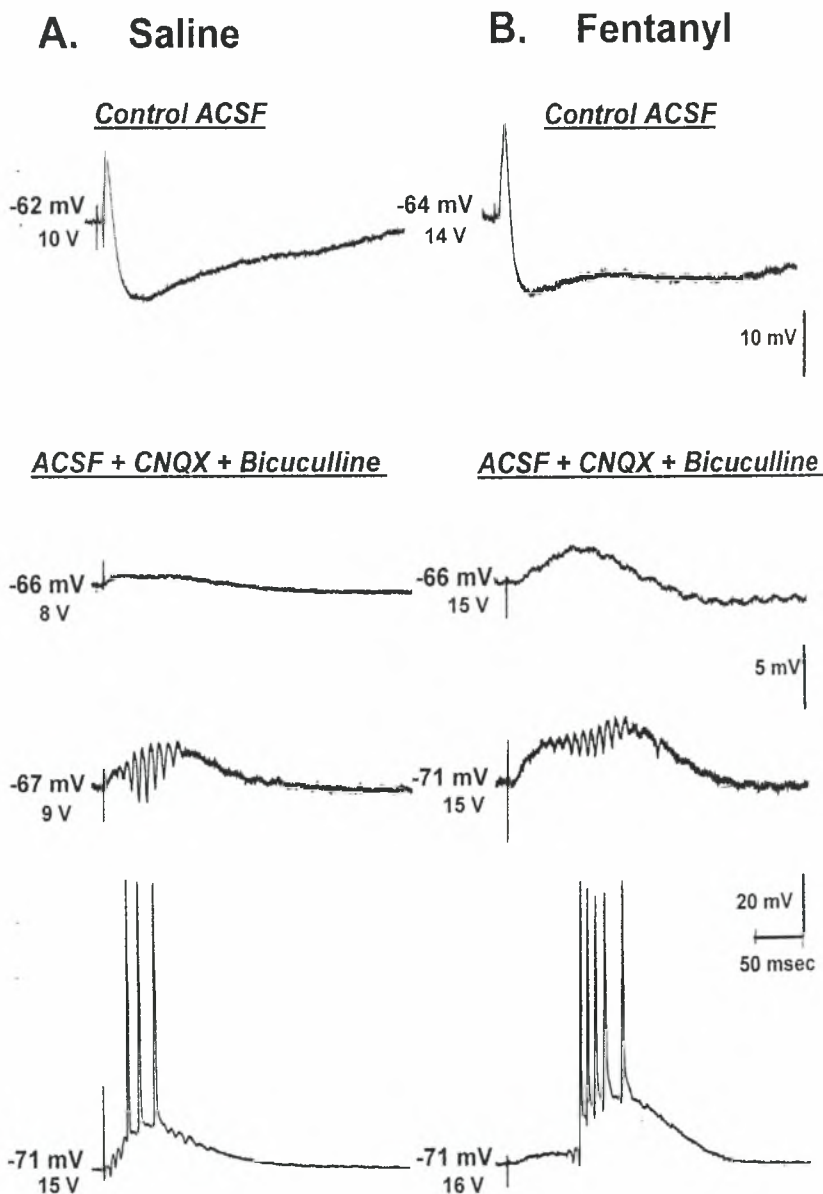


*Εικόνα 27. Σχηματική απεικόνιση των υπολογιζόμενων χαρακτηριστικών του μετασυναπτικού δυναμικού*

**Πίνακας 3.** Παθητικές ιδιότητες των νευρώνων των δύο ομάδων και τα NMDA χαρακτηριστικά του EPSP.

	Passive properties			NMDA-dependent EPSP characteristics					
	MP (mV)	Input resistance (MΩ)	Amplitude (mV)	Time to peak (ms)	Rise time (ms)	Decay time (ms)	Half width (ms)	Duration (ms)	Area (ms.mV)
Saline-treated (n=5)	-66.5 ± 0.8	42 ± 2.7	8.3 ± 0.9	36.2 ± 4.1	23.7 ± 3.4	39.3 ± 2.1	43.5 ± 12.5	111.0 ± 7.3	245.2 ± 33.3
Fentanyl-treated (n=7)	-66.7 ± 0.4	39.1 ± 1.8	8.9 ± 0.4	32.6 ± 1.9	20.9 ± 1.2	34.4 ± 1.4	38.2 ± 2.1	98.1 ± 2.6	257.7 ± 14.3

Σε μερικές περιπτώσεις συναπτικών απαντήσεων, καταγεγραμμένες παρουσία CNQX, Bicuculline και CGP35348, εμφανίστηκαν στην ανοδική φάση του EPSP ριπές (oscillation-like) που έμοιαζαν με επιληπτοειδών εκφορτίσεων. Αυτό το φαινόμενο παρατηρήθηκε στις τομές ιπποκάμπου προερχόμενες από πειραματόζωα και της ομάδας ελέγχου και της fentanyl-treated ομάδας (Εικ.26) και σχετίζονται με υπερπόλωση της μεμβράνης. Οι συναπτικές αυτές απαντήσεις μπορεί να είναι πολυσυναπτικές, καθώς εμφανίζονταν όταν χρειάζονταν να εφαρμοστούν ηλεκτρικά ερεθίσματα μεγάλης έντασης σε μεμβράνες με σχετικά χαμηλό δυναμικό προκειμένου να παραχθούν δυναμικά ενεργείας. Οι νευρώνες οι οποίοι παρουσίασαν τέτοια μορφή εξαιρέθηκαν από τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων.



**Εικ.29.** Συναπτικές απαντήσεις κυττάρων της ομάδας ελέγχου και της *fentanyl-treated* ομάδας παρουσία *oscillations*.

### **ketamine-treated ομάδα**

Ενδοκυττάρειες καταγραφές επιτεύχθηκαν σε 5 κύτταρα (n=5) της ketamine-treated ομάδας.

Οι παθητικές ιδιότητες των κυττάρων της ketamine-treated ομάδας φαίνονται στον πίνακα 4. Η αντίσταση Ri (input resistance) υπολογίστηκε από την εφαρμογή του τύπου  $R=V/I$  στις γραφικές παραστάσεις σχέσεις ρεύματος-τάσης (IV) για κάθε κύτταρο και η χρονική σταθερά από τις καταγραφές του IV τις αντίστοιχες των κυττάρων της ketamine-treated ομάδας.

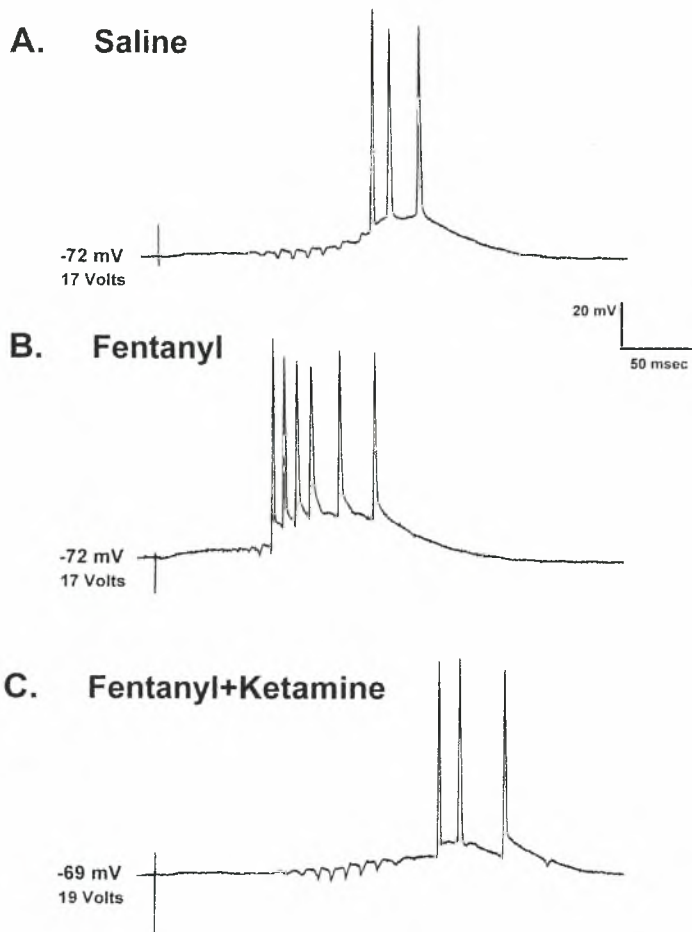
Οι παθητικές ιδιότητες της μεμβράνης νευρώνων των τριών ομάδων δεν παρουσίασαν καμία στατιστικά σημαντική διαφορά.

Για την σύγκριση των amplitude EPSP's χρησιμοποιήθηκαν καταγραφές από κύτταρα με ίδιο δυναμικό. Ο χρόνος εμφάνισης των δυναμικών ενέργειας είναι αρκετά πιο αργός από τον αντίστοιχο των fentanyl-treated και παρόμοιος με των saline-treated. Επιπλέον, ο αριθμός των δυναμικών ενέργειας ήταν μικρότερος από τον αντίστοιχο των fentanyl-treated και παρόμοιος με των saline-treated (εικ.30). Όλα αυτά υποδηλώνουν μείωση της διεγερσιμότητας των πυραμιδικών νευρώνων.

Στην εικόνα 30 απεικονίζονται οι συναπτικές απάντησεις κυττάρων της ομάδας ελέγχου (A), της fentanyl-treated (B) και της ketamine-treated ομάδας (C).

*Πίνακας 6. Σύγκριση των παθητικών ιδιοτήτων των κυττάρων των τριών ομάδων.*

	<i>RMP (mV)</i>	<i>Input resistance (MΩ)</i>	<i>Time constant-τ (ms)</i>
<i>Saline-treated (n=7)</i>	-63.2±0.6	51.9±5.0	19.2±2.0
<i>fentanyl-treated (n=5)</i>	-62.4±0.4	49.8±4.2	21.4±0.9
<i>ketamine-treated (n=5)</i>	-62.6 ± 0.7	50.2± 4.7	20.1±1.8
<i>p</i>	>0.05	>0.05	>0.05



**Εικ.30.** Συναπτικές απαντήσεις κυττάρων των τριών ομάδων σε παρόμοιο ( $p > 0.05$ ) δυναμικό μεμβράνης.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη αναφέρεται για πρώτη φορά στη διερεύνηση των επιδράσεων της φεντανύλης 24 ώρες μετά την *in vivo* χορήγησή της σε *in vitro* παρασκεύασμα ιπποκάμπου. Τα αποτελέσματα, όπως αυτά προκύπτουν μετά από καταγραφές από πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου, είναι ότι η *in vivo* χορήγηση φεντανύλης:

1. δε μεταβάλλει τις παθητικές ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης των πυραμιδικών νευρώνων,
2. δε μεταβάλλει τη μετασυναπτική διεγερσιμότητα των πυραμιδικών νευρώνων,
3. μειώνει την GABA<sub>A</sub>- και GABA<sub>B</sub>-διαμεσολαβούμενη αναστολή,
4. αυξάνει τη διεγερσιμότητα των πυραμιδικών νευρώνων της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου,
5. δε μεταβάλλει τη συναπτική διαβίβαση που διαμεσολαβείται από τους NMDA υποδοχείς.

Επομένως,

***Η διέγερση των μ-οπιοειδών υποδοχέων προκαλεί μακρόχρονη (24 ώρες) άρση της αναστολής-disinhibition- στη CA1 περιοχή του ιπποκάμπου.***

6. Επιπλέον, η *in vivo* χορήγηση κεταμίνης μειώνει την προκαλούμενη από την *in vivo* χορήγηση φεντανύλης αυξημένη διεγερσιμότητα των πυραμιδικών νευρώνων. Ο μηχανισμός παραμένει ανεξερεύνητος.

Όπως προαναφέρθηκε, 24 ώρες μετά την *in vivo* χορήγηση φεντανύλης, δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή τόσο στις παθητικές ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης των πυραμιδικών νευρώνων της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου, όσο και στην ενδογενή μετασυ-

ναπτική διεγερσιμότητα των πυραμιδικών νευρώνων. Έτσι, τόσο η αντίσταση εισόδου και το δυναμικό ηρεμίας της κυτταρικής μεμβράνης, όσο και ο αριθμός και η μορφή των δυναμικών ενεργειών που προέκυψαν, μετά από απευθείας εκπόλωση των πυραμιδικών νευρώνων με ενδοκυττάρια χορήγηση τετράγωνων εκπολωτικών παλμών, δε βρέθηκαν να διαφέρουν μεταξύ των δύο ομάδων νευρώνων. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προγενέστερες μελέτες της επίδρασης της *in vitro* χορήγησης οπιοειδών στη διεγερσιμότητα νευρώνων της CA1 περιοχής του υποκάμπου αρουραίου, στις οποίες, παρομοίως, δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές τόσο στις παθητικές όσο και στις ενεργητικές ιδιότητες της μεμβράνης των νευρώνων υποκάμπου (Dingledine, 1981; Siggins and Zieglgansberger, 1981; Segal, 1988; Swearengen and Chavkin, 1989; Lambert et al., 1991). Επιπλέον, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης υποστηρίζονται και από προϋπάρχουσες μελέτες αυτοραδιογραφίας (Mansour et al., 1987) και ανοσοϊστοχημείας (Drake and Milner, 1999) στις οποίες δεν εντοπίστηκαν μ-οπιοειδικοί υποδοχείς στην επιφάνεια των πυραμιδικών νευρώνων. Αντίθετα, μ-οπιοειδικοί υποδοχείς εντοπίζονται, σε υψηλές συγκεντρώσεις, στους ενδονευρώνες του υποκάμπου (Crain et al., 1986; Drake and Milner, 1999) και η παρουσία τους μπορεί να συσχετισθεί λειτουργικά με την παρατηρούμενη άρση της ανασταλτικής δράσης που αυτοί ασκούν στους πυραμιδικούς νευρώνες, μετά από χορήγηση οπιοειδών φαρμάκων (Siggins and Zieglgansberger, 1981; Bostock et al., 1984). Συγκεκριμένα, η *in vitro* διέγερση των μ-υποδοχέων προκαλεί υπερπόλωση των ανασταλτικών ενδονευρώνων, μέσω διαφόρων μηχανισμών όπως: ενεργοποίηση των διαύλων  $K^+$  που ελέγχονται από G πρωτεΐνες όπως η GIRK (G-protein-activated inwardly rectifying conductance: Madison και Nicoll, 1988; Svoboda και Lupica, 1998), αναστολή διαύλων ασβεστίου (Moises et al, 1994), ελάττωση της απελευθέρωσης GABA από τις συναπτικές απολήξεις (Swearengen and Chavkin, 1989; Lambert et al., 1991, Lupica et al., 1995). Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η μείωση τόσο της προκλητής όσο και της αυτόματη συναπτικής αναστολής που καταγράφεται από τους πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 *in vitro* (Lambert et al., 1991, Lu-



rica et al., 1995). Η επιληπτική δραστηριότητα που παρατηρείται στους πυραμιδικούς νευρώνες μετά από χορήγηση μ-αγωνιστών αντικατοπτρίζει την αναστολή των ανασταλτικών ενδονευρώνων (Whimprey et al, 1989; Lupica and Dunwiddie, 1991).

Σε αντίθεση με την επίδραση στο GABA έχει αναφερθεί ότι η *in vitro* έκθεση στα οπιοειδή δεν επηρεάζει τη συναπτική διαβίβαση που οφείλεται στο γλουταμινικό οξύ (Swearengen and Chavkin, 1989; Carogna et al., 1993). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι η μετασυναπτική απάντηση που οφείλεται στην ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων δεν μεταβάλλεται μετά την χορήγηση οπιοειδών (Carogna et al., 1993). Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν στη μελέτη τους και οι Lambert και συν 1991, όπου παρατήρησαν με εξωκυττάριας ηλεκτροφυσιολογικές καταγραφές ότι το ο μ-αγωνιστής DAGO αυξάνει τη διεγερσιμότητα του υποκάμπου χωρίς να μεταβάλει το EPSP. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έρχονται να συμφωνήσουν με τα ευρήματα άλλων ερευνητών. Έτσι, προκλητά υποουδικά μετασυναπτικά δυναμικά που καταγράφονταν σε φυσιολογικό TENV από νευρώνες πειραματοζώων στα οποία είχε χορηγηθεί φεντανύλη δεν διέφεραν στατιστικά από αντίστοιχα μετασυναπτικά δυναμικά νευρώνων πειραματοζώων στα οποία είχε χορηγηθεί φυσιολογικός ορός. Επιπλέον, μετά από χορήγηση κατάλληλων ανταγωνιστών προκειμένου να απομονωθεί το μετασυναπτικό διεγερτικό δυναμικό που οφείλεται σε NMDA διαύλους βρέθηκε ότι δεν υπήρχε καμία διαφορά τόσο όσον αφορά το εύρος όσο και τα λοιπά χρονικά χαρακτηριστικά του NMDA-εξαρτώμενου μετασυναπτικού δυναμικού μεταξύ των δύο ομάδων νευρώνων.

Όπως προαναφέρθηκε τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με αποτελέσματα μελετών της *in vitro* επίδρασης διαφόρων οπιοειδών αγωνιστών στον υποκάμπο. Η πιθανότητα να υπάρχει κοινός μηχανισμός δράσης μεταξύ της *in vivo* και της *in vitro* χορήγησης, μετά την χορήγηση των οπιοειδών δεν μπορεί να αποκλειστεί. Αντίθετα όμως από τα *in vitro* πειράματα, όπου η επίδραση των οπιοειδών καταγράφεται κατά τη διάρκεια της παρουσίας του φαρμάκου, οι καταγραφές στα πειράματα αυτής της μελέ-

της έγιναν 24 ώρες μετά τη χορήγηση του φαρμάκου. Συνεπώς, τα αποτελέσματα αυτά δεν μπορούν να οφείλονται μόνο στην παρουσία του φαρμάκου στον ιστό, αλλά μάλλον σε πιο μόνιμες μεταβολές οφειλόμενες στην *in vivo* έκθεση στο φάρμακο. Τέτοιες αλλαγές μπορεί να οφείλονται σε μεταβολές της νευρωνικής λειτουργίας λόγω της ενεργοποίησης ή αναστολής διαφόρων πρωτεϊνικών κινασών όπως για παράδειγμα PKA, PKC, Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII). Οι πρωτεΐνες αυτές στη συνέχεια ενεργοποιούν ή αναστέλλουν διάφορα μοριακά μονοπάτια τα οποία τελικά μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Law et al., 2000; Pu et al., 2002; Bilecki et al., 2005), που μπορούν να οδηγήσουν σε παρατεταμένες μεταβολές της κυτταρικής λειτουργίας. Στην κατηγορία των ρυθμιστικών πρωτεϊνών που μπορούν να ενεργοποιηθούν από ένα τέτοιο "καταρράκτη" δευτέρων μηνυτόρων είναι και η c-fos. Αυξημένα επίπεδα της c-fos μετρήθηκαν με ηλεκτροφόρηση μία ώρα μετά την έκλυση των τομών με μορφίνη (Rasmussen et al, 1995). Επιπλέον, αυξημένα επίπεδα της c-fos βρέθηκαν και στον ενδορρινικό φλοιό μετά από εφαρμογή επώδυνου ερεθίσματος μέτριας βαρύτητας (Funahashi et al, 1999), γεγονός το οποίο συνδυάζει την αυξημένη έκφραση της c-fos με την εμφάνιση της υπεραλγησίας.

Ανοσοϊστοχημική μελέτη του GABA 24 ώρες μετά την *in vivo* χορήγηση φεντανύλης έδειξε ελάττωση της ανοσοδραστικότητας του νευροδιαβιβαστή σε τομές ιστού προερχόμενες από αρουραίους στους οποίους είχε χορηγηθεί φεντανύλη (Kouvaras et al., 2006). Συγκεκριμένα βρέθηκε ελάττωση των επιπέδων του GABA που περιέχονται στις απολήξεις των νευρώνων του υποκάμπου και όχι στα σώματα, γεγονός που μπορεί να επιβεβαιώσει και να εξηγήσει την παρατηρούμενη ελάττωση της συναπτικής αναστολής που οφείλεται στο GABA. Μπορούν να διατυπωθούν διάφορες υποθέσεις σχετικά με το που οφείλεται η παρατηρούμενη ελάττωση του GABA στις δενδριτικές απολήξεις όπως μειωμένη σύνθεση GABA. Η ελάττωση η οποία παρατηρείται 24 ώρες μετά από την χορήγηση της φεντανύλης, μπορεί να οφείλεται στη μείωση της σύνθεσης GABA λόγω

μειωμένης δραστηριότητας του ενζύμου glutamic acid decarboxylase (GAD). Όπως αναφέρεται σε προγενέστερη μελέτη η ελάττωση της GABAεργικής ανοσοδραστικότητας που παρατηρήθηκε, μετά από έκθεση καλλιέργειας ενδονευρώνων του ιπποκάμπου σε οιστραδιόλη, οφείλεται σε μείωση της σύνθεσης του GAD (Murphy et al., 1998). Η μείωση ανιχνεύτηκε στις απολήξεις των νευρώνων και όχι στα σώματα γεγονός που ενδεχομένως να σχετίζεται με την ύπαρξη δυο διαφορετικών ισομορφών της GAD, την GAD65 και GAD67 που κατανέμονται διαφορετικά στους GABAεργικούς νευρώνες (Fukuda et al., 1998). Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι η GAD65 εντοπίζεται στις δενδριτικές απολήξεις των νευρώνων και μπορεί να σχετίζεται με την παραγωγή GABA που θα εγκολληθεί σε κυστίδια προκειμένου να απελευθερωθεί από τις συνάψεις, ενώ η GAD67 παρουσιάζει γενικότερη κατανομή και σχετίζεται με την παραγωγή GABA για μεταβολικούς λόγους (Houser and Esclapez, 1994).

Άλλη εξήγηση της επίδρασης της φεντανύλης στα επίπεδα της ανοσοδραστικότητας του GABA αποτελεί η επίδραση των οπιοειδών στη διαθεσιμότητα του γλουταμινικού οξέος, της πρωταρχικής χημικής ένωσης που συμμετέχει στο μεταβολικό μονοπάτι σύνθεσης του GABA. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι τα οπιοειδή μπορούν να ρυθμίσουν την εξωκυττάρια συγκέντρωση γλουταμινικού (Guo et al., 2005), την έκφραση πρωτεϊνών μεταφορέων γλουταμινικού (Xu et al., 2003), ή τη λειτουργία γλοιακών κυττάρων (Shong and Zhao, 2001).

Κλινικές παρατηρήσεις μετά από χορήγηση των ανταγωνιστών των NMDA υποδοχέων, MK-801 (Laulin et al, 1998) και κεταμίνης (Celerier et al, 2000) πριν από τη χορήγηση ηρωίνης και φεντανύλης αντίστοιχα, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ενεργοποίηση των NMDA υποδοχέων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση του άλγους και ότι τα οπιοειδή με κάποιον τρόπο ενεργοποιούν τους NMDA υποδοχείς (Koppert et al, 2003). Επιπλέον βρέθηκε ότι η κεταμίνη μειώνει την υπεραλγησία και αυξάνει το αναλγητικό εύρος των οπιοειδών (Himmelseher and Durieux, 2005) αν και ο μηχανι-

σμός παραμένει ακόμη άγνωστος. Καθώς η κεταμίνη είναι ο μόνος κλινικά διαθέσιμος NMDA ανταγωνιστής, επιλέχθηκε αυτός, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της *in vivo* χορήγησή του, που προηγείται της χορήγησης φεντανύλης, στη λειτουργία του ιπποκάμπου. Ως ομάδα ελέγχου για τα κύτταρα της ketemine-fentanyl treated ομάδας, χρησιμοποιήθηκε η saline-treated και η fentanyl-treated ομάδα. Η κυματομορφή C της εικόνας 30, η οποία μεταφράζεται ως μείωση της διεγερσιμότητας του νευρώνα, είναι η συνιστώσα, πρώτον της μείωσης της διεγερσιμότητας τόσο των πυραμιδικών νευρώνων όσο και των ενδονευρώνων, λόγω αποκλεισμού των διαύλων NMDA οφειλομένου στην επίδραση της κεταμίνης, αλλά και δεύτερον της αύξησης της διεγερσιμότητας του πυραμιδικού νευρώνα λόγω της φεντανύλης. Το αποτέλεσμα της συνιστώσας ηλεκτροφυσιολογικά εκδηλώνεται ως μείωση της διεγερσιμότητας του πυραμιδικού νευρώνα και μοιάζει με την κυματομορφή A (εικόνα 30), των νευρώνων της ομάδας των saline-treated πειραματόζων. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν ενδοκυττάρια καταγραφές και σε πυραμιδικούς νευρώνες της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου πειραματόζων στα οποία χορηγήθηκε μόνο κεταμίνη. Ο αριθμός όμως των κυττάρων με επαρκή στοιχεία ήταν μικρός και εξαιρέθηκαν των μετρήσεων.

Καθώς η φεντανύλη χορηγείται *in vivo* και μάλιστα 24 ώρες πριν, είναι πιθανόν τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών να οφείλονται σε πολλούς μηχανισμούς και αλληλεπιδράσεις με άλλες δομές του εγκεφάλου. Για παράδειγμα, η αναστολή της απελευθέρωσης του GABA οδηγεί σε διέγερση των D1 υποδοχέων γεγονός στο οποίο μπορεί να οφείλεται η αλλαγή συμπεριφοράς μετά από χορήγηση οπιοειδών (Bontempi and Sharp, 1997). Επίσης η διαμεσολάβηση και άλλων νευροδιαβιβαστών ενδέχεται να είναι συνυπεύθυνη για τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν σε αυτή τη μελέτη. Επιπλέον η δράση τους τροποποιείται από τα ενδογενή οπιοειδή πεπτίδια (Smith et al, 1988). Η δράση των οπιοειδών στους νευρώνες της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου είναι σημαντική στην

κατανόηση των μεταβολών των κυκλωμάτων ως απάντηση στη χρόνια (long-lasting) ή στην οξεία (acute) χορήγηση in vivo οπιοειδών.

Τα οπιοειδή αποτελούν αναντικατάστατες ουσίες στη διεγχειρητική και μετεγχειρητική διαχείριση του ασθενούς, όμως η χρήση τους περιορίζεται από την ανάπτυξη ανοχής και υπεραλγησίας. Οι νεώτερες μελέτες κινούνται στην κατεύθυνση κατανόησης του μηχανισμού της υπεραλγησίας και ανεύρεσης παραγόντων οι οποίοι συγχωρηγούμενοι με τα οπιοειδή θα εμποδίζουν την εμφάνιση της οξείας και μακρόχρονης υπεραλγησίας. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ο παράγοντας RF9 (Simonin et al, 2006), ανταγωνιστής του νευροπεπτιδίου FF (NPFF), ο οποίος συγχωρηγούμενος με την ηρωίνη στα ποντίκια, αναστέλλει την υπεραλγησία, καθώς επίσης επανεξετάζεται η δράση της βουπρενορφίνης (Vadivelu et al, 2007) και του νιτρικού οξειδίου (Richebe et al, 2005) ως αντι-υπεραλγησιακοί παράγοντες. Απαιτείται ο σχεδιασμός περαιτέρω πειραμάτων με σκοπό να διευκρινιστούν οι μοριακές και κυτταρικές αλλαγές και οι μεταβολές στο νευρωνικό δίκτυο οι οποίες συμβαίνουν μετά από θεραπεία με οπιοειδή, για να γίνει περισσότερο κατανοητός ο μηχανισμός και τα νευρωνικά στοιχεία του κυκλώματος που ενέχονται στο μηχανισμό του άλγους και στα αρχικά στάδια της εξάρτησης.

Στο πλαίσιο αυτό τα ευρήματα της παρούσας εργασίας παρέχουν στοιχεία για την υπόθεση ότι το GABAεργικό σύστημα του ιπποκάμπου ενέχεται στην ανάπτυξη άλγους και ότι μπορεί να ρυθμίζεται από τα οπιοειδή. Επίσης, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η χορήγηση της κεταμίνης προκάλεσε μείωση της διεγερσιμότητας των πυραμιδικών κυττάρων, παρόλο που η φεντανύλη δεν είχε καμία επίδραση στο NMDA συστατικό του μετασυναπτικού διεγερτικού δυναμικού. Μελλοντικές μελέτες είναι απαραίτητες για την κατανόηση του κυτταρικού μηχανισμού πρόκλησης υπεραλγησίας από την φεντανύλη, τη διερεύνηση του μηχανισμού εμφάνισης μέγιστης υπεραλγησίας 24 ώρες μετά τη χορήγηση του οπιοειδούς που διατηρείται αρκετές μέρες αργότερα, τη διευκρίνιση του μηχανισμού μέσω του οποίου η κεταμίνη κλινικά μειώνει την υπεραλγησία και αυξάνει το αναλγητικό εύρος των οπιοειδών (Richebe et al, 2005).



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ιπποκάμπος κατέχει κεντρικό ρόλο σε διαδικασίες μνήμης και μάθησης καθώς μπορεί να τροποποιεί την αντίληψη του πόνου. Η παρούσα μελέτη αναφέρεται για πρώτη φορά στη διερεύνηση των επιδράσεων της φεντανύλης 24 ώρες μετά την *in vivo* χορήγησή της σε *in vitro* παρασκεύασμα ιπποκάμπου.

Κλινικές μελέτες σε ανθρώπους και πειραματόζωα οδήγησαν στην παρατήρηση ότι μετά από μακρόχρονη χορήγηση αγωνιστών των μ-υποδοχέων παρατηρείται μακροχρόνια υπεραλγησία. Το φαινόμενο αυτό επιτείνεται όσο αυξάνεται η δόση των οπιοειδών. Κλινικές παρατηρήσεις οι οποίες δείχνουν μείωση της υπεραλγησίας, όταν έχει προηγηθεί χορήγηση κεταμίνης πριν τη χορήγηση οπιοειδών, υποδηλώνουν ότι τα οπιοειδή ίσως έχουν επιπλέον και δράση NMDA αγωνιστών, δράση την οποία ανταγωνίζεται η κεταμίνη.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι ότι η *in vivo* χορήγηση φεντανύλης δεν μεταβάλλει τις παθητικές ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης των πυραμιδικών νευρώνων της CA1 περιοχής του ιπποκάμπου, μειώνει την GABA<sub>A</sub> και GABA<sub>B</sub> ανασταλτικού μετασυναπτικού δυναμικού πυραμιδικών νευρώνων της CA1 και προκαλεί long-lasting (24 ώρες) αναστολή της αναστολής-disinhibition στη CA1 περιοχής του ιπποκάμπου. Δεν αποδείχθηκε συμμετοχής της φεντανύλης στο NMDA εξαρτώμενο μετασυναπτικό διεγερτικό δυναμικό. Γεγονός παραμένει ότι η κεταμίνη μειώνει την υπεραλγησία και αυξάνει το αναλγητικό εύρος των οπιοειδών αν και ο μηχανισμός παραμένει ακόμη άγνωστος.

Οι μελλοντικές κλινικές και πειραματικές έρευνες θα πρέπει να κατευθυνθούν στον επαναπροσδιορισμό του προφίλ των οπιοειδών όχι μόνο για τις αναλγητικές τους ιδιότητες αλλά και για την ικανότητά τους να ενισχύουν ή να αναστέλλουν την κεντρική ευαισθητοποίηση.

## SUMMARY

The human hippocampus plays an important role to the negative effect and avoidance motivation experienced during pain. Recently, the hippocampus is thought to be also involved in the process of pain. To the best of our knowledge the present study represents a unique investigation of the effects of fentanyl 24 hours after its administration in vivo, at in vitro hippocampal slices.

Clinical studies in human and animals models have led to the observation that long-lasting treatment with mu-opioid agonist might result in hyperalgesia. Enhanced intraoperative fentanyl administration increases the postoperative pain level and morphine requirements. Ketamine-NMDA antagonist has been reported to be effective in preventing hyperalgesia when given prior to fentanyl administration. The rationale is that fentanyl, like other opioids, activate NMDA receptors.

The results of this study show that fentanyl in vivo treatment does not alter the basic membrane characteristics of CA1 pyramidal neurons, while reducing GABAA and GABAB mediated synaptic inhibition. Fentanyl treatment also causes long-lasting (24h) disinhibition in the CA1 area of the hippocampus but has no demonstrable effect on NMDA-mediated synaptic response. However, ketamine reduces hyperalgesia and extends the analgesic strength of opioids even though the exact mechanism remains poorly defined.

Future clinical and experimental investigations should focus on the revision of the pharmacological profile of opioids, regarding their antinociceptive capacities and also their role in facilitating or preventing central pain sensitization.



## ACKNOWLEDGEMENTS

Η μελέτη αυτή χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aley KO, Levine JD. Different mechanisms mediated development and expression of tolerance and dependence for peripheral mu-opioid antinociception in rat. *J Neurosci* 1997;17(20):8018-23
2. Ali N. Hyperalgesic response in a patient receiving high concentrations of spinal morphine. *Anesthesiology* 1986;65:449
3. Alkon D.J., Rasmussen H. A spatial temporal model of cell activation. *Science* 1988;239(4843):998-1005.
4. Andreasen M., Lambert J.D., Jensen M.S. Direct demonstration of an NMDA receptor mediated component of excitatory synaptic transmission in area CA1 of the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 1988;31(1):61-6.
5. Amaral D.G., Witter M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neurosci.* 31: 571-591.
6. Angst M.S, Koppert W, Pahl I, Clark D.J, Schmelz M. Short-term infusion of the m-opioid agonist remifentanyl in humans causes hyperalgesia during withdrawal. *Pain* 2003;106:49-57.
7. Arancio O., Kandel F.R., Hawkins R.D. Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3,5-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. *Nature* 1995;376 (6537):74-80.
8. Archer DP, Roth SH. Pharmacodynamics of thiopentone: nocifensive reflex threshold changes correlate with hippocampal electroencephalography. *Br J Anaesth* 1997;79:744-749.
9. Arendt-Nielsen L, Petersen-Felix S, Fischer M, Bak P, Bjerring P, Zbinden A.M. The effect of N-Methyl-d-ASPARTATE Antagonist (ketamine) on single and repeated nociceptive stimuli: A placebo-controlled experimental human study. *Anesth Analg* 1995;81:63-8.

10. Arner S, Rawal N, Gustafsson L.L: Clinical experience of long-term treatment with epidural and intrathecal opioids-a nationwide survey. *Acta Anaesthesiol Scand* 1988;32:253-59.
11. Beckmann AM, Matsumoto I, Wilce PA. Immediate early gene expression during morphine withdrawal. *Neuropharmacology*. 1995 Sep;34(9):1183-9.
12. Behe P., Stern P. et al. Determination of the NMDA NR1 subunit copy number in recombination NMDA receptors. *Proc Biol Sci* 1995;262(1364):205-13.
13. Besse D., Lombard M.C., Zajak J.M., Roques B.P., Besson J.M. pre and postsynaptic location of mu, delta and kappa opioid receptors in the superficial layers of the dorsal horn of the rat spinal cord. *Prog Clin Biol Res*. 1990;328:183-6.
14. Bhargava H.N. Attenuation of tolerance and physical dependence on morphine in the rat by inhibition of nitric oxide synthase. *Gen Pharmacol* 1995;26(5):1049-53.
15. Bhargava H.N., Cao Y.J. Effect of chronic administration of morphine, U-50, 488H and enkephalin on the concentration of cGMP in brain regions and spinal cord of the mouse. *Peptides* 1997;18(10):1629-34.
16. Bilecki W, Zapart G, Ligeza A, Wawrzczak-Bargiela A, Urbanski MJ and Przewlocki R. Regulation of the extracellular signal-regulated kinases following acute and chronic opioid treatment. *CMLS* 62: 2369-2375, 2005.
17. Bilsky E.J., Inturrisi C.E., Sadee W., Hrubu V.J., Porreca F. Competitive and not competitive NMDA antagonist block the development of antinociceptive tolerance to morphine, but not to selective mu or delta opioid agonists in mice. *Pain* 1996;68(2):229-37.
18. Birrell G.L, McQueen D.S, Iggo A., Coleman R.A, Grubb B.P. PG12-induced activation and sensitization of articular mechanoreceptors. *Neurosci Lett*.1991, Mar 11 ;124(1) :5-8.
19. Bontempi B., Sharp F.R. Systemic morphine-induced Fos protein in the rat striatum and nucleus accumbens is regulated by mu

- opioid receptors in the substantia nigra and ventral tegmental area. *J Neurosci*. 1997 Nov 1;17(21):8596-612.
20. Bostock E., Dingledine R., Xu G., Chang K.J. Mu opioid receptors participate in the excitatory effect of opiates in the hippocampal slice. *J Pharmacol Exp Ther* 1984;231(3):512-17.
  21. Capasso F., Dumm C.J. et al. Pharmacological mediators of various immunological inflammatory reactions produced in the pleural cavity. *Agents Actions* 1975;5(5) :528-33.
  22. Capogna M, Gähwiler B.H., Thompson S.M. Mechanism of mu-opioid receptor-mediated presynaptic inhibition in the rat hippocampus in vitro. *J Physiol*. 1993 October; 470: 539–558.
  23. Ceccarelli I, Casamenti F, Massafra C, Pepeu G, Scali C, Aloisi AM. Effects of novelty and pain on behavior and hippocampal extracellular ACh levels in male and female rats. *Brain Res* 1999;815:169-176.
  24. Celerier E, Laulin J.P et al: Evidence for opiate-activated NMDA processes masking opiate analgesia in rats. *Brain Research* 1999;847:18-25.
  25. Celerier E, Rivat C, Jun Y, Laulin J.P et al: Long-lasting hyperalgesia induced by fentanyl in rats: Preemptive effect of ketamine. *Anesthesiology* 2000;92:465-72.
  26. Celerier E., Laulin J.P., Corcuff B., Le Moal M., Simonnet G. Progressive enhancement of delayed hyperalgesia induced by repeated heroin administration: a sensitization process. *J Neuroscience* 2001;21:4074-4080.
  27. Celerier E, Simonnet G, Maldonado R. Prevention of fentanyl delayed pronociceptive effects in mice lacking the protein kinase C gene. *Neuropharmacology* 2004;46:264-272.
  28. Cervantes M., Antonio-Ocampo et al. Effects of diazepam on fentanyl induced epileptoid Eeg activity and increase of multineuronal firing in limbic and mesencephalic brain structures. *Arch Med Res* 1996;27(4):495-502.

29. Chavnik C. Electrophysiology of opiates and opioid peptides. In: The opiate receptors. Pasternak G.W. Humana press.1988.
30. Chen L., Huang L.Y. Sustained potentiation of NMDA receptor-mediated glutamate responses through activation of protein kinase C by a mu opioid. *Neuron* 1991;7:319-326.
31. Chen L., Huang L.Y. Protein kinase C reduces Mg<sup>2+</sup> block of Nmda-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature* 1992;356:521-23.
32. Chia Y.Y et al. Adding ketamine in a multimodal patient-controlled epidural regimen reduces postoperative pain and analgesic consumption. *Anesth, Analg* 1998;86: 1245-9.
33. Childers S.R, Fleming L.M, Selley D.E., McNutt R.W., Chang K.J. BW373U86: a nonpeptidic delta-opioid agonist with novel receptor-G-protein-mediated actions in rat brain membranes and neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol* 1993;44(4):827-34.
34. Cobb S.R., Bucl E.H. et al. Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 1995;378(6552):75-8.
- 35.Coderre T.J, Melzack R: Cutaneous hyperalgesia: contribution of the peripheral and central nervous system to the increase in pain sensitivity after injury, *Br.Reas.* 404;95-106,1987.
36. Coderre T.J. The role of excitatory amino acid receptors and intracellular messengers in persistent nociception after tissue injury in rats. *Mol Neurobiol* 1993;7:229-246.
37. Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL, Melzack. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain* 1993;52:259-285
38. Cohen M.M. Selected clinical research involving the central nervous system. *J. Craniofac Genet Dev Biol.* 1990;10(2): 215-38.
39. Cohen GA, Doze VA, Madison DV. Opioid inhibition of GABA release from presynaptic terminals of rat hippocampal interneurons. *Neuron.* 1992 Aug;9(2):325-35.

40. Crain B.J., Chang K.J., McNamara J.O. Quantitative autoradiographic analysis of mu and delta opioid binding sites in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol* 1986;246(2) :170-80.
41. Davies S.N., Collingridge G.L. Role of excitatory amino acid receptors in synaptic transmission in area CA1 of the rat hippocampus. *Proc R Soc Lond B. Biol Sci* 1989;236(1285)373-84.
42. Das S., Sasaki Y.F. et al. Increased NMDA Current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 1998;393(6683):377-81.
43. DelleMijn P.L, Fields M.L et al. The interpretation of pain relief and sensory changes following sympathetic blockade. *Brain* 1994;117(6):1475-87.
44. Derbyshire SWG, Jones AKP, Gyulai F, Clark S, Townsend D, Firestone LL. Pain processing during three levels of noxious stimulation produces differential patterns of central activity. *Pain* 1997;73:431-445.
45. Devouder J: Hyperalgesia induced by high-dose intrathecal sufentanyl in neuropathic pain. *J.Neurosurg.Anesthesiol* 1997;9:146-48.
46. Dickenson AH, Sullivan AF. Electrophysiological studies of the effects of intrathecal morphine on nociceptive neurons in the rat dorsal horn. *Pain* 1986; 24(2):211-22.
47. Dickenson AH, Sullivan AF: Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurons following C fibre stimulation, *Neuropharmacology* 26;1235-38,1990.
48. Dingle R. Possible mechanisms of enkephalin action on hippocampal CA1 pyramidal neurons. *The journal of Neuroscience* 1981;1(9): 1022-35.
49. Dingle R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev.* 1999 Mar;51(1):7-61.
50. Drake C.T., Milner T.A. mu opioid receptors are in somatodendritic and axonal compartments of GABAergic neurons in rat hippocampal formation. *Brain Res* 1999;849(1-2):203-15.

51. Eisenach CJ: Preemptive hyperalgesia, not analgesia. *Anesthesiology* 2000;92:308-9
52. Elliott K., Hynansky A., Inturrisi C.E. Dextromethorphan attenuates and reverses analgesic tolerance to morphine. *Pain* 1994; 59 :361-68.
53. Fitzgerald LW, Ortiz J, Hamedani AG, Nestler EJ. Drugs of abuse and stress increase the expression of GluR1 and NMDAR1 glutamate receptor subunits in the rat ventral tegmental area: common adaptations among cross-sensitizing agents. *J Neurosci.* 1996 Jan;16(1):274-82.
54. Freund T.F, Buzzaki G. Interneurons of hippocampus. In: *Hippocampus*, 1996. p347-470.
55. Fukuda T, Aika Y, Heizman CW, Kosaka T. GABAergic axon terminals at the perisomatic and dendritic inhibitory sites show different immunoreactivities against two GAD isoforms, GAD 67 and GAD 65, in the mouse hippocampus: a digitized quantitative analysis. *J Comp Neurol* 395 (2): 177-94, 1998.
56. Funahashi M, He YF, Sugimoto T, Matsuo R. Noxious tooth pulp stimulation suppresses c-fos expression in the rat hippocampal formation. *Brain Res.* 1999 May 8;827(1-2):215-20.
57. Gies U, Bilzer T, Stitz L, Staiger JF. Disturbance of the cortical cholinergic innervation in Borna disease prior to encephalitis. *Brain Pathol.* 1998 Jan;8(1):39-48.
58. Gilman A.G. Goodman and Gilman's. *The Pharmacological Basic of Therapeutics.* New York: Pergamon, 1990.
59. Grachev I.D., Fredickon B.E, Apkarian AV. Dissociating anxiety from pain: mapping the neuronal marker N-acetyl aspartate to perception distinguishes closely interrelated characteristics of chronic pain. *Mol. Psychiatry* 2001;6(3)256-8.
60. Guignard B et al: Intraoperative remifentanyl increases postoperative pain and morphine requirement. *Anesthesiology* 2000;93:409-17.



61. Guignard B et al. Supplementing desflurane-remifentanil anesthesia with small-dose ketamine reduces perioperative opioid analgesic requirements. *Anesth Analg* 2002;95:103-8.
62. Guo M, Xu N, Li Y, Yang J, Wu C, Pei G Morphine modulates glutamate release in the hippocampal CA1 area in mice. *Neurosci. Lett.* 381: 12-15, 2005.
63. Guyton A.G: *Ιατρική Φυσιολογία*, Εκδόσεις Παρισιάνος 1991,2:680-84.
64. Haas H.L., Ryall R.W. Is excitation by enkephalins of hippocampal neurons in the rat due to presynaptic facilitation or to disinhibition? *J Physiol* 1980;308:315-30.
65. Hebben N, Corkin S, Eichenbaum H, Shedlack K (1985) Diminished ability to interpret and report internal states after bilateral medial temporal resection: case H.M. *Behav Neurosci* 99:1031-1039.
66. Hemmings C. H., Hopkins M. P. Anesthetic adjuvant and other CNS drugs. In: *Foundations of Anesthesia. Basic sciences for clinical practise.* Elsevier 2005, pp.340-341.
67. Henderson G. Electrophysiological analysis of opioid action in the central nervous system. *Br. M. Bull* 1983;39:59-64.
68. Himmelseher S., Durieux E. Ketamine for perioperative pain management. *Anesthesiology* 2005;102(1):211-20.
69. Hirota K, Lambert D.G. Ketamine: its mechanism(s) of action and unusual clinical uses. *British Journal of anaesthesia* 1996 77(4): 441-44.
70. Hollmann M., Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 1994;17:31-108.
71. Hollmann M., Boulter J., Maron C., Heinemann S. Molecular biology of glutamate receptors. Potentiation of NMDA receptor slice variants by zinc. *Ren Physiol Biochem* 1994;17(3-4):182-3.
72. Houser CR, Esclapez M. Localization of mRNAs encoding two forms of glutamate acid decarboxylase in the rat hippocampal formation. *Hippocampus* 4 (5): 530-45, 1994.

73. Hudspith M.J: Glutamate: a role in normal brain function, anaesthesia, analgesia and CNS injury, *Br.J.Anaesthesia* 78;731-747, 1997.
74. Ikeda K., Kobayashi K. et al. Functional coupling of the nociceptin/orphanin FQ receptor with the G-protein-activated K<sup>+</sup> (GIRK) channel. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997 Apr;45(1):117-26.
75. Jaffe JH: Drug addiction and drug use. In: *The pharmacological basis of therapeutics*, Ed 8, pp522-573. New York: Goodman and Gilman's.
76. Johnston D., Amaral D.G. Hippocampus. In: *Synaptic Organization of the Brain*. Shepherd, GM (ed.), Oxford University Press: New York, 1997.
77. Julien R.M. Βασικές αρχές ψυχοφαρμακολογίας. Εκδόσεις Πασχαλίδης, 2003.
78. Kain Z.N., Sevarino F. et al. Attenuation of the perioperative stress response with midazolam: effects on postoperative outcome. *Anesthesiology* 2000;93(1):141-7.
79. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Νευροεπιστήμη και συμπεριφορά. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρητης, 1999.
80. Kangrga I., Randic M. Outflow of endogenous aspartate and glutamate from the rat spinal dorsal horn in vitro by activation of low- and high-threshold primary afferent fibers: Modulation by mu-opioids. *Brain Res* 1991;553:347-352.
81. Kayan S, Woods A, Mitchell C.L: Morphine-induced hyperalgesia in rats tested on the hot plate. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1971;177(3):509-13.
82. Kissin I et al: Acute tolerance in morphine analgesia: continuous infusion and single injection in rats. *Anesthesiology* 1991;74:166-71.
83. Kissin I, Brown PT, Bradley EL: Magnitude of acute tolerance to opioids is not related to their potency. *Anesthesiology* 1991;75:813-16.

84. Kissin I, Bright C.A, Bradley E.L. The effect of ketamine on opioid-induced acute tolerance: can it explain reduction of opioid consumption with ketamine-opioid analgesic combinations? *Anesth Analg* 2000;91:1483-8.
85. Kock De M, Lavand'homme P, Waterloos H. 'Balanced analgesia' in the perioperative period: is there a place for ketamine? *Pain* 2001;92:373-80.
86. Kolesnikov YA, Pick CG, Ciszewska G, Pasternak GW. Blockade of tolerance to morphine but not to kappa opioids by a nitric oxide synthase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jun 1;90(11):5162-6.
87. Koopert W, Sittl R et al: Differential modulation of remifentanyl-induced analgesia and postinfusion hyperalgesia by S-Ketamine and klonidine in humans. *Anesthesiology* 2003;99:152-9.
88. Kouvaras E, Asproдини E, Asouchidou E, Koukoutianou I, Vasilaki A, Papatheodoropoulos C, Kostopoulos G. A single *in vivo* exposure to fentanyl induces long-lasting reduction of gabaergic inhibition in the CA1 area of rat hippocampus. *20th Annual Meeting of the Hellenic Society for Neuroscience*. Heraclio 2006.
89. Lambert N, Harrison N.L, Teyler T. Evidence for m opiate receptors on inhibitory terminals in area CA1 of rats hippocampus. *Neuroscience Letters*, 1991;124:101-104.
90. Laulin J.P, Larcher A, Celerier E et al: Long-lasting increased pain sensitivity in rat following exposure to heroin for the first time. *Eur.J.Neuroscience* 1998;10:782-85.
91. Laulin JP, Celerier E et al: Opiate tolerance to daily heroin administration: an apparent phenomenon associated with enhanced pain sensitivity. *Neuroscience* 1999;89:631-36.
92. Law PY, Wong YH, Loh HH. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signalling. *Annu Rev Toxicol*, 40:389-430, 2000.
93. Le Greves P, Huang W, Zhon Q, Thornwall M, Nyberg F. Acute effect of morphine on the expression of mRNA for NMDA receptors

subunits in the rat hippocampus, hypothalamus and spinal cord. *Eur J Pharmacol* 1998;341(2-3) :161-4.

94. Leung A, Wallace M.S, Ridgeway B, Yaksh T. Concentration-effect relationship of intravenous alfentanil and ketamine on peripheral neurosensory thresholds, allodynia and hyperalgesia of neuropathic pain. *Pain* 2001;91:177-87.
95. Levine S. The phycoendocrinology of stress. *Ann N.Y Acad Sci* 1993;29(697):61-9.
96. Li X, Angst S.M et al: Opioid-Induced Hyperalgesia and incisional Pain. *Anesth Analg* 2001;93:204-09.
97. Luginbuhl M, Gerber A et al: Modulation of Remifentanyl-induced Analgesia, Hyperalgesia, and Tolerance by small-Dose ketamine in Humans. *Anesth Analg* 2003;96:726-32.
98. Lupica C.R., Dunwiddie T.V. Differential effects of mu and delta-receptor selective opioid agonists on feedback GABAergic inhibition in hippocampal brain slices. *Synapse* 1991;84(4):237-48.
99. Lupica C.R, Proctor W.R, Dunwiddie T.V. Dissociation of  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptor-mediated reductions in evoked and spontaneous synaptic inhibition in the rat hippocampus in vitro. *Brain Research* 1992;593:22-38.
100. Lupica C.R. Delta and mu enkephalins inhibit spontaneous GABA-mediated IPSCs via a cyclic AMP-independent mechanism in the rat hippocampus. *J Neurosci.* 1995 Jan;15(1 Pt 2):737-49.
101. Madison D.V, Nicoll R.A. Enkephalin hyperpolarizes interneurons in the rat hippocampus. *J. Physiol. Lond*, 1988; 398:123-130.
102. Malenka R.C, Nicoll R.A. NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci.* 1993 Dec;16(12):521-7.
103. Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H and Watson SJ. Autoradiographic differentiation of mu, delta and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. *J Neurosci* 7: 2445-64, 1987.

104. Mao J., Price D. Thermal hyperalgesia in association with the development of morphine tolerance in rats: roles of excitatory amino acid receptors and protein kinase C. *J Neurosci* 1994;14:2301-2312.
105. Mao J., Price D., Mayer D.J. mechanisms of hyperalgesia and opiate tolerance: a current view of their possible interactions. *Pain* 1995;62:259-74
106. Mayer M.L, Miller R.J. Excitatory amino acid receptors, second messengers and regulation of intracellular  $Ca^{+2}$  in mammalian neurons. *Trends Pharmacol Sci* 1990 ;11(6) :254-60.
107. McKenna JE, Melzack R (1992) Analgesia produced by lidocaine microinjection into the dentate gyrus. *Pain* 49:105-112.
108. McKenna J.E, Melzack R. Blocking NMDA receptors in the hippocampal dentate gyrus with AP5 produces analgesia in the formalin pain test. *Experimental Neurology*. 2001 ; 172 :92-99.
109. McNaughton N, Gray JA. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Disord*. 2000 Dec;61(3):161-76.
110. Mendel L.M. Physiological properties of unmyelinated fiber projection to the spinal cord. *Exp Neurol* 1966;16:316-332.
111. Menigaux C, Guignard B et al. Intraoperative small-dose ketamine enhances analgesia after outpatient knee arthroscopy. *Anesth. Analg* 2001;93:606-12.
112. MestekA, Hurley JH et al. The human mu opioid receptor: modulation of functional desensitization by calcium/calmodulin-dependent protein kinase and protein kinase C. *J. Neurosci*. 1995 Mar;15(3 Pt 2):2396-40.
113. Meunier F.A., Colosante C., Molgo J. Sodium-dependent increase in quantal secretion induced by brevetoxin-3 in  $Ca^{2+}$ -free medium is associated with depletion of synaptic vesicles and swelling of motor nerve terminals in situ. *Neuroscience*. 1997 Jun; 78(3):883-93.

114. Miles R., Toth k., et al. Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* 1996;16(4):815-23.
115. Mitchell A.C, Fallon M.T. A single infusion of intravenous ketamine improves pain relief in patients with critical limb ischaemia: results of a double blind randomized controlled trial. *Pain* 2002;97:275-81.
116. Moises H.C. Rusin K.i., Macdonald R.L. mu opioid receptor-mediated reduction of neuronal calcium current occurs via a G(o)type GTP-binding protein. *J Neurosci* 1994;14(6):3842-51.
117. Monyer H., Burchashev N., et al. Development and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 1994;12(3) :529-40.
118. Morgan G.E, Mikhail M.S. Κλινική αναισθησιολογία. Εκδόσεις Παριστιανός 1992.
119. Mori H., Mishina M. Structure and function of the NMDA receptors channel. *Neuropharmacology* 1995;34(10):1219-37.
120. Murasse K., Randik M. Actions of substance P on rat spinal dorsal horn neurons. *J Physiol* 1984 ;346 :203-17.
121. Murphy DD, Cole NB, Greenberger V and Segal M. Estradiol increases dendritic spine density by reducing GABA neurotransmission in hippocampal neurons. *J Neurosci* 18 (7): 2550-2569, 1998.
122. Narita M., Feng Y, Makimura M., Hoskins B., Ho J.K. Repeated administration of opioids alters characteristics of membrane-bound phorbol ester binding in rat brain. *Eur J Pharmacol* 1994;271(2-3):547-50.
123. Narita M., Narita M., Mizoguchi H., Tseng L.F. Inhibition of protein Kinase C, but not of protein Kinase A, blocks the development of acute antinociceptive tolerance to an intrathecally administered mu-opioid receptor antagonist in the mouse. *Eur J Pharmacol* 1995; 280(2):1-3.

124. Narita M., Dun S.L., Dun N.J., Tseng L.F. Hyperalgesia induced by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the mouse spinal cord. *Eur J Pharmacol* 1996;123:11(2-3):121-6.
125. Nicoll R., Madison D. The action of enkephalin on interneurons in the hippocampus. *Soc Neurosci Abst* 1984 ;10(1) :660.
126. Nieuwenhuys R. The greater limbic system, the emotional motor system and the brain. *Prog Brain Res.* 1996;107:551-80.
127. Nishizuka M. Studies and prospectives of the protein kinase C family for cellular regulation. *Cancer* 1989; 63(10):1892-903.
128. Nomura T., Fukuda T. et al. Laminar distribution of non principal neurons in the rat hippocampus with special reference to their compositional difference among layers. *Brain Res* 1997 ;764(1-2) :197-204.
129. O'Dell T.J., Alger B.E. Single calcium channels in rat and guinea-pig hippocampal neurons. *J Physiol* 1991;436:739-67.
130. Oye I, Paulsen O, Maurset A: Effects of ketamine on sensory perception: Evidence for a role of *N*-methyl-d-aspartate receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 260:1209-13.
131. Pearse D, Mirza A, Leah J. Jun, Fos and Krox in the hippocampus after noxious stimulation: simultaneous-input-dependent expression and nuclear speckling. *Brain Res* 2001;894:193-208.
132. Peyron R, García-Larrea L, Grégoire MC, Costes N, Convers P, Lavenne F, Mauguière F, Michel D, Laurent B. Haemodynamic brain responses to acute pain in humans: sensory and attentional networks. *Brain* 1999;122:1765-1779.
133. Ploghaus A., Narain C. Et al. Exacerbation of pain by anxiety is associated with activity in a hippocampal network. *J Neurosci* 2001;21(24):9896-9903.
134. Pohl M.L., Lombart M.C. et al. Opioid control of the *in vivo* release of calcitonin gene-related peptide from primary afferent fibres projecting in the rat cervical cord. *Neuropeptides* 1989; 14(3):151-9.

135. Prado WA, Roberts MH. An assessment of the antinociceptive and aversive effects of stimulating identified sites in the rat brain. *Brain Res* 1985;340:219-228.
136. Pu L, Bao GB, Xu NJ and Pei G. Hippocampal long-term potentiation is reduced by chronic opiate treatment and can be restored by re-exposure to opiates. *J Neurosci* 22(5): 1914-1921, 2002.
137. Rang H.P., Urban L. New molecules in analgesia. *Br. J. Anaesthesia* 1994 ;75(2) :145-56.
138. Rasmussen K, Brodsky M, Inturrisi CE. NMDA antagonists and clonidine block c-fos expression during morphinewithdrawal. *Synapse*. 1995 May;20(1):68-74.
139. Richebe P, Rivat C, Laulin JP, Maurette P, Simonnet G. Ketamine improves the management of exaggerated postoperative pain observed in perioperative fentanyl-treated rats. *Anesthesiology*. 2005 Feb;102(2):421-8.
140. Richebe P, Rivat C, Creton C, Laulin JP, Maurette P, Lemaire M, Simonnet G. Nitrous oxide revisited: evidence for potent antihyperalgesic properties. *Anesthesiology*. 2005;103(4):845-54.
141. Rivat C, Laulin J.P, Corcuff J.B, Celerier E et al: Fentanyl Enhancement of carrageenan-induced Long lasting Hyperalgesia in rats. *Anesthesiology* 2002;96:381-91.
142. Rivat C, Laboureyras E, Laulin JP, Le Roy C, Richebe P, Simonnet G. Non-Nociceptive Environmental Stress Induces Hyperalgesia, Not Analgesia, in Pain and Opioid-Experienced Rats. *Neuropsychopharmacology*. 2007 ;14.
143. Roytblat L et al. Pain: The effect of low dose ketamine in addition to general anesthesia. *Anesth. Analg* 1993;77:1161-5.
144. Salmanzadeh F, Fathollahi Y, Semnianian S, Shafizadeh M. Dependence on morphine impairs the induction of long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Brain Res* 965: 108-113, 2003.
145. Sarma VJ. Use of ketamine in acute severe asthma. *Acta Anaesthesiologica* 1992;36:106-7.



146. Schmid R.L, Sandler A.N, Katz J. Use and efficacy of low dose ketamine in the management of acute postoperative pain: a review of current techniques and outcomes. *Pain* 1999;82:111-25.
147. Segal M. Effects of m opioid receptor Activation in rat hippocampal. *NIDA Res Monogr* 1988;82: 133-45.
148. Shafer A, White PF: Use of a fentanyl infusion in the intensive care unit: Tolerance to its anesthetic effect? *Anesthesiology* 1983; 59:245-48.
149. Shimoyama N et al. Ketamine attenuates and reverses morphine tolerance in rodents. *Anesthesiology* 1996;85:1357-66.
150. Song P and Zhao ZQ. The involvement of glial cells in the development of morphine tolerance. *Neurosci Res* 39: 281-286, 2001.
151. Siddall P.J, Cousins M.J. Neurobiology of pain. In: *Acute and Chronic Pain. International Anesthesiology Clinics. Lippincott-Raven* 1997.
152. Siggins G, Zieglansberger W. Morphine and opioid peptides reduce inhibitory synaptic potentials in hippocampal pyramidal cells in vitro without alteration of membrane potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981,78(8): 5235-9.
153. Simone DA, Sorkin LS et al: Neurogenic hyperalgesia: Central correlates in responses of spinthalamic tract neurons. *J. Neurophysio* 1 66;228-246, 1991.
154. Simonin F, Schmitt M, Laulin J.P et al. RF9, a potent and selective neuropeptide FF receptor antagonist, prevents opioid-induced tolerance associated with hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 January 10; 103(2): 466-471.
155. Skofitsch G., Jacobowitz D.M. Quantitive distribution of calcitonine gene-related peptide in the rat central nervous system. *Peptides* 1985;6(6):1069-73.
156. Smith A.P, Law PY, Loh HH. Role of opioid Receptors in Narcotic Tolerance/Dependence. In: *The opiate receptors. Pasternak G.W. Humana press.* 1988.

157. Song P and Zhao ZQ. The involvement of glial cells in the development of morphine tolerance. *Neurosci Res* 39: 281-286, 2001.
158. Sorkin L, Wallace M.S. Pain control in the perioperative period. The surgical clinic of North America 1999;79(2) Harcourt Brace& Company.
159. Stoelting R.K, Miller R.D. Βασικές αρχές αναισθησιολογίας. Εκδόσεις Λίτσας 1991.
160. Stoelting R.K. Pharmacology and physiology in anesthetic practice, 3<sup>rd</sup> Ed, Lippincott Raven, Philadelphia, 1999.
161. Stubhaug A, Breivik H, Eide P.K, et al: Mapping of punctuate hyperalgesia around a surgical incision demonstrates that ketamine is a powerful suppressor of central sensitization to pain following surgery. *Acta Anaesthesiologia Scand*1997;41:1124-1132.
162. Sullivan A.F., Dashwood M.R., Dickenson A.H. Alpha 2-adrenoreceptor modulation of nociception in rat spinal cord: location, effects and interactions with morphine. *Eur J Pharmacol* 1987 ;138(2) :169-77.
163. Svoboda K.R, Lupica C.R. Opioid inhibition of hippocampal interneurons via modulation of potassium and hyperpolarization-activated cation (I<sub>h</sub>) Currents. *The journal of neuroscience* 1998;18(18): 7084-7098.
164. Svoboda K.R, Adams C.E, Lupica C.R. Opioid receptor subtype expression defines morphologically distinct classes of hippocampal interneurons. *The Journal of Neuroscience*. 1999; 19(1): 85-95.
165. Swanson L.W. A direct projection from Ammon's horn to prefrontal cortex in the rat. *Brain Res*. 1981 Jul 27;217(1):150-4.
166. Swanson L.W. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull*. 1982 Jul-Dec;9(1-6):321-53.

167. Swearengen and Chavkin. Comparison of opioid and GABA receptor control of excitability and membrane conductance in hippocampal CA1 pyramidal cells in rat. *Neuropharmacology* 1989;28(7):689-697.
168. Tverskoy M, Yuval O et al: Preemptive effect of fentanyl and ketamine on postoperative pain and wound hyperalgesia. *Anesth Analg* 1994;78:205-09.
169. Unterwald E.M., Knapp C., Zukin R.S. Neuroanatomical localization of kappa 1 and kappa 2 opioid receptors in rat and guinea pig brain. *Brain Res* 1991;18(562):57-65.
170. Uchida Y., Maeda S., Matsuya T., Saito K. Effect of morphine on aluminium fluoride and dibutyryl-cyclic AMP induced reduction of field potentials in hippocampal slices. *Pharmacol Res.* 1995;31(2):127-31.
171. Vadivelu N, Hines RL. Buprenorphine: a unique opioid with broad clinical applications. *J Opioid Manag.* 2007;3(1):49-58.
172. Vanderah T.W., Ossipov M.H. et al. Mechanism of opioid-induced pain and antinociceptive tolerance descending facilitation and spinal dynorphin. *Pain* 2001;92(1-2):5-9.
173. Villiger J.W., Ray L.J., Taylor K.M. Characteristics of [3H] fentanyl binding to the opiate receptor. *Neuropharmacology* 1983;22(4) : 447-52.
174. Vinik H.R, Kissin I: Rapid development of tolerance to analgesia during remifentanyl infusion in humans. *Anesth Analg* 1998;86:1307-11.
175. Vlaskovska M., Schramm M. et al. Opioid effects on  $45\text{Ca}^{-2}$  uptake and glutamate release in rat cerebral cortex in primary culture. *J Neurochem* 1997;68(2):517-24.
176. Wall P.D: The prevention of postoperative pain. *Pain* 1988;33:289-90.
177. Wei F, Xu ZC, Qu Z, Milbrandt J, Zhuo M. Role of EGR1 in hippocampal synaptic enhancement induced by tetanic stimulation and amputation. *J Cell Biol* 2000;149:1325-1334.

178. Whittington M.A., Traub R.D. et al. Morphine disrupts long-range synchrony of gamma-oscillations in hippocampal slices. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(10):5807-11.
179. Wilding T.S., Womack M.D., Mcleskey E.W. Fast, local signal transduction between the mu opioid receptor and  $Ca^{+2}$  channels. *J Neurosci* 1995;15(5):4124-32.
180. William J.T., Egan T.M., Norton R.A. Enkephalin opens potassium channels on mammalian central neurons. *Nature* 1982;299:74-77.
181. Williams P,T, Bannister L.H, Berry M.M, Collins P, Dyson M, Dussek J.E, Ferguson M. W.J: *Gray's Anatomy*. Churrchill Livingstone 1995.
182. Williams P,T, Bannister L.H, Berry M.M, Collins P, Dyson M, Dussek J.E, Ferguson M. W.J: *Gray's Anatomy*. Churrchill Livingstone 2004.
183. Willmott N.,Sethi S.K et al. Nitric-oxide-induced mobilization of intracellular calcium via the cyclic ADP-ribose signaling pathway. *J Biol Chem* 1996;16-271(7):3699-705.
184. Wimpey T.L., Opheim K., Chavkin C. Effects of chronic morphine administration on the mu and delta opioid responses in the CA1 region of the rat hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;251(2):405-11.
185. Woolf J.C; Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity, *Nature* 1983;306:686-88.
186. Woolf J.C; Dynamic alterations in the cutaneous mechanosensitive receptive fields of dorsal horn neurons in the rat spinal cord, *J.Neurosci* 1990;10;2717-26.
187. Woolf C, Chong M.S: Preemptive analgesia-Treating postoperative pain by preventing the establishment of central sensitization. *Anesth Analg* 1993;77:362-79.
188. Xi ZX, Wu G, Stein EA, Li SJ. GABAergic mechanisms of heroin-induced brain activation assessed with functional MRI. *Magn Reson Med*. 2002 Nov;48(5):838-43.

189. Xu NJ, Bao L, Fan HP, Bao GB, Pu L, Lu YJ, Wu CF, Zhang X and Pei G. Morphine withdrawal increases glutamate uptake and surface expression of glutamate transporter GLT1 at hippocampal synapses. *J Neurosci* 23(11): 4775-4787, 2003.
190. Yaksh T.L. Pharmacology and mechanisms of opioid analgesic activity. *Acta Anaesthesiol Scand* 1997;41:94-111.
191. Yamamura T., Harada K., Okamura A., Kemmotsu O. Is the site of action of ketamine anesthesia the NMDA? *Anesthesiology* 1990;72:704-10.
192. Yu L., Colvin R.A. Regional differences in expression of transcripts for Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger isoforms in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997 Oct 15;50(1-2):285-92.
193. Zheng F, Khanna S. Morphine reversed formalin-induced CA1 pyramidal cell suppression via an effect on septohippocampal neural processing. *Neuroscience* 1999; 89:61-71.
194. Zieglansberrger W, French E.D, Siggins G.R and Bloom F.E. Opioid peptides may excite hippocampal pyramidal neurons by inhibiting adjacent inhibitory interneurons. *Science* 1979; 205:415-17.
195. Ασκητοπούλου Ε, Whitwam J.G et al: Acute tolerance to fentanyl during anesthesia in dogs. *Anesthesiology* 1985;63:255-61.
196. Γκιάλα Μ. Αναισθησιολογία. Επείγουσα και Εντατική Ιατρική. Αντιμετώπιση του πόνου. University studio press 1998.
197. Μπαλαμούτσος Ν. Στοιχεία περιεγχειρητικής ιατρικής. Εκδόσεις University studio press 2002.



[www.copycity.gr](http://www.copycity.gr)

Κ. Ν. ΕΠΙΣΚΟΠΟΥ 7  
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ