



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ-ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΚΟΙΝΩΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΨΥΧΙΚΗΣ ΥΓΕΙΑΣ  
ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ-ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΨΥΧΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΠΟΝΟΥ»  
ΕΠΙΣΤ. ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ: Δ. ΔΑΜΙΓΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

## Οι επιδράσεις Zn και ροπιβακαΐνης στην νευρική αγωγή και τον πόνο σε περιφερικό νεύρο πειραματόζωου

### Σπουδάστρια:

Ντάφλου Αικατερίνη, Ιατρός (Α.Μ. 110)

### Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Καλφακάκου Βασιλική, Καθηγήτρια Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

### Τριμελής Επιτροπή Αξιολόγησης:

Δαμίγος Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Ψυχολογίας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ευαγγέλου Άγγελος, Ομότιμος Καθηγητής Φυσιολογίας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων  
Καλφακάκου Βασιλική, Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ιωάννινα, 2009

# Περιεχόμενα

## Πρόλογος

### A. Εισαγωγή

#### I. Νευρώνας και νευρική ώση 5

1. Δομή και λειτουργία του νευρώνα
2. Παραγωγή του δυναμικού ενέργειας
3. Αγωγή της νευρικής ώσης

#### II. Πόνος 9

1. Υποδοχείς και είδη πόνου
2. Αισθητικές οδοί του πόνου
3. Αναλγητικό σύστημα

#### III. Τοπικά αναισθητικά 18

1. Γενικά-Ιστορία
2. Δομή και μηχανισμός δράσης
3. Ροπιβακαΐνη

#### IV. Ψευδάργυρος (Zn) 24

1. Βαρέα μέταλλα και Zn
2. Χημικές ιδιότητες ψευδαργύρου
3. Μεταλλοπρωτεΐνες και Ψευδαργυροπρωτεΐνες
4. Φυσιολογικός ρόλος ψευδαργύρου (Zn)
5. Νευρικό σύστημα και Zn
6. Μηχανισμός νευροτοξικότητας του ψευδαργύρου

#### V. Ισχιακό νεύρο βατράχου 31

1. Στοιχεία βιολογίας του βατράχου
2. Zn και ισχιακό νεύρο βατράχου

## **B. Υλικά και Μέθοδοι**

34

### **I. Υλικά**

1.1 Αναλώσιμα

1.2 Συσκευές

### **II. Μέθοδοι**

1. Προετοιμασία του ισχιακού νεύρου βατράχου

2. Ανάρτηση του ισχιακού νεύρου

3. Προσδιορισμός των μετάλλων .

4. Φασματοφωτομετρία Ατομικής Απορρόφησης με φλόγα (flame)

5. Πειραματικές Ομάδες

## **Γ. Αποτελέσματα**

40

## **Δ. Συζήτηση**

48

## **Ε. Συμπεράσματα**

51

## **ΣΤ. Περίληψη**

51

## **Ζ. Βιβλιογραφία**

53

## Πρόλογος

Απαραίτητα μέταλλα όπως ο ψευδάργυρος (Zn) και ο χαλκός (Cu) λόγω των ευρύτατων εφαρμογών τους, εισέρχονται στους οργανισμούς και οι επιπτώσεις τους ειδικότερα στην λειτουργία του νευρικού συστήματος καθώς και στους μηχανισμούς του πόνου είναι ελάχιστα τεκμηριωμένες. Στα πλαίσια του παρόντος μεταπτυχιακού του πόνου κρίθηκε σημαντικό να διερευνηθεί η δράση αυτών των μετάλλων στους μηχανισμούς του πόνου, με στόχο την καλλίτερη διαχείριση αυτού του επώδυνου αλλά ζωτικής σημασίας χαρακτηριστικού των ζώντων οργανισμών. Στην παρούσα εργασία διερευνώνται και συγκρίνονται η συμμετοχή και η αλληλεπίδραση του Zn, ενός απαραίτητου και εξαιρετικά διαδεδομένου στο νευρικό σύστημα μετάλλου και της ροπιβακαΐνης, ενός ισχυρού αναλγητικού, στη βασική λειτουργία του νευρικού συστήματος, την μεταβίβαση δηλαδή της νευρικής ώσης στο ισχιακό νεύρο βατράχου.

Εκφράζω θερμότατες ευχαριστίες στην επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ. Βασιλική Καλφακάκου που με μεγάλη προθυμία διέθεσε τις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Φυσιολογίας για την πραγματοποίηση αυτής της διπλωματικής και με τις πολύτιμες γνώσεις της με καθοδήγησε τη συγγραφή της. Επίσης ευχαριστώ την ομάδα της τον κ. Γιάννη Δεληγιάννη και κ. Ευάγγελο Κονταργύρη για την αμέριστη συμπαράσταση και σημαντική βοήθεια που μου προσέφεραν, χωρίς την οποία θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

## **A. Εισαγωγή**

### **I. Νευρώνας και νευρική ώση**

#### **1. Δομή και λειτουργία του νευρώνα**

Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) είναι δέκτης πληροφορίας τόσο από το εσωτερικό όσον και από το εξωτερικό περιβάλλον. Πληροφορία αποτελούν τα διάφορα ερεθίσματα που μεταφέρονται ως νευρικές ώσεις μέσω των περιφερικών νευρών (αισθητική οδός). Στο ΚΝΣ οι πληροφορίες -ερεθίσματα αξιολογούνται και ανάλογα παράγονται και διαβιβάζονται εντολές (κινητική οδός) επίσης με τη μορφή νευρικών ώσεων προς στα εκτελεστικά όργανα, τους μύες και αδένες. Οι νευρικές ώσεις που αφορούν συνειδητές λειτουργίες, καταλήγουν μέσω των αισθητικών οδών στο φλοιό των ημισφαιρίων του εγκεφάλου, ενώ οι νευρικές ώσεις που αφορούν ασυνείδητες ομοιοστατικές λειτουργίες μεταφέρονται κυρίως στο στέλεχος του εγκεφάλου που αποτελείται από τον προμήκη μυελό, τη γέφυρα και τον υποθάλαμο. Το νευρικό σύστημα αποτελείται κυρίως από νευρικά κύτταρα ή νευρώνες και από νευρογλοία (νευρογλοιακά κύτταρα και μεσοκυττάρια ουσία).

**Οι νευρώνες** αποτελούν τις δομικές και λειτουργικές μονάδες του νευρικού συστήματος. Ο νευρώνας αποτελείται από το κυτταρικό σώμα, τους δενδρίτες, και τον νευράξονα με τις προσυναπτικές απολήξεις. Οι δενδρίτες είναι αποφυάδες του κυταροπλάσματος και διακλαδίζονται εκτεταμένα. Μαζί με το σώμα αποτελούν την κύρια περιοχή υποδοχής μηνυμάτων. Το σώμα περιέχει τον πυρήνα του νευρώνα, και τον εκφυτικό κώνο από τον οποίο εκφύεται ο νευράξονας. Χαρακτηριστικό των νευρώνων είναι αυτές οι μεγάλης μήκους αποφυάδες οι οποίες αυξάνουν σημαντικά την απόσταση προς ή από την οποία ο νευρώνας μπορεί να στείλει ή να δεχθεί μήνυμα. Οι δενδρίτες μεταφέρουν μηνύματα προς το κυτταρικό σώμα ενώ οι νευράξονες μεταφέρουν μηνύματα εκτός του νευρώνα. Σε ορισμένους νευρώνες, το μήκος των νευραξόνων μπορεί να ξεπερνά το 1 μέτρο ενώ η διάμετρος τους φθάνει

μέχρι και το 0,1mm. Πολλοί νευρώνες έχουν νευράξονες οι οποίοι περιβάλλονται από έλυτρο μυελίνης. Η μυελίνη επηρεάζει σημαντικά την ταχύτητα και την ποιότητα των νευρικών ώσεων. Οι τελικές απολήξεις του νευράξονα φέρουν στα άκρα διογκώσεις, τα τελικά κομβία.

Οι νευρώνες διακρίνονται σε αισθητικούς, κινητικούς και ενδιάμεσους. Οι αισθητικοί νευρώνες μεταφέρουν μηνύματα από την περιφέρεια προς το ΚΝΣ ενώ οι κινητικοί νευρώνες μεταφέρουν μηνύματα-εντολές από το ΚΝΣ προς τα εκτελεστικά όργανα. Οι ενδιάμεσοι νευρώνες παρεμβάλλονται μεταξύ αισθητικών και κινητικών νευρώνων και κατευθύνουν τα μηνύματα που προέρχονται από τους αισθητικούς νευρώνες στις κατάλληλες περιοχές του ΚΝΣ. Μεταφέρουν επίσης τα μηνύματα από περιοχή σε περιοχή του ΚΝΣ και τελικά στους κατάλληλους κινητικούς νευρώνες.

## **2. Παραγωγή του δυναμικού ενέργειας**

**Οι νευρικές ώσεις** είναι ηλεκτρικά σήματα τα οποία παράγονται στην πλασματική μεμβράνη των νευρώνων και διαδίδονται μέσω αυτής, χάρη στις ηλεκτρικές της ιδιότητες.

Η πλευρά της μεμβράνης που είναι εκτεθειμένη στο κυτταρόπλασμα, η ενδοκυτάρια, είναι φορτισμένη αρνητικά και αποτελεί τον αρνητικό πόλο ενώ η πλευρά που είναι σε επαφή με το εξωκυττάριο υγρό, η εξωκυτάρια, είναι φορτισμένη θετικά ως προς την ενδοκυτάρια και αποτελεί το θετικό πόλο αυτής της μεμβρανικής δομής, που λόγω της **εκλεκτικής της διαπερατότητας** στα ιόντα δημιουργεί διαφορά δυναμικού.

Αυτή η διαφορά δυναμικού ονομάζεται δυναμικό μεμβράνης και σε ένα νευρώνα που βρίσκεται σε ηρεμία (δεν παράγει ώσεις) ονομάζεται **δυναμικό ηρεμίας**. Η μονάδα μέτρησης διαφοράς δυναμικού είναι τα volts και το δυναμικό ηρεμίας των νευρώνων κυμαίνεται συνήθως περί τα 70mV (χιλιοστά του volt) ή 0,07V.

Οι παράγοντες που διαμορφώνουν το δυναμικό μεμβράνης είναι τρεις:

1. Η δράση της αντλίας ιόντων νατρίου και καλίου.
2. Η εκλεκτική διαπερατότητα της μεμβράνης στα διάφορα ιόντα.
3. Η παρουσία αρνητικά φορτισμένων ιόντων στο εσωτερικό των κυττάρων τα οποία λόγω μεγέθους δεν μπορούν να εξέλθουν του κυττάρου.

Οι τρεις πιο πάνω παράγοντες επικρατούν σε όλα τα κύτταρα με αποτέλεσμα όλα τα κύτταρα να διαθέτουν δυναμικό μεμβράνης. Οι αντλίες  $\text{Na}^+$  και  $\text{K}^+$  συνεχώς μεταφέρουν 3 ιόντα νατρίου προς εκτός του κυττάρου και 2 ιόντα καλίου προς τα

εντός του κυττάρου. Η μεταφορά είναι ενεργητική και το αποτέλεσμα της λειτουργίας των αντλιών αυτών είναι η άνιση κατανομή αυτών των ιόντων μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης, έτσι ώστε ενδοκυτάρια εμφανίζονται λιγότερα θετικά φορτία από ότι εξωκυτάρια.

Οι αντλίες  $\text{Na}^+$  και  $\text{K}^+$  ενισχύουν το αποτέλεσμα της παρουσίας των ανιόντων στο εσωτερικό των κυττάρων. Τα ανιόντα αυτά δεν μπορούν, λόγω μεγέθους, να εγκαταλείψουν το κύτταρο, αλλά ελκύουν κατιόντα από το εξωτερικό περιβάλλον. Η πλασματική μεμβράνη δεν παρουσιάζει την ίδια διαπερατότητα στα κατιόντα. Η πλασματική μεμβράνη ενός νευρώνα που βρίσκεται σε ηρεμία είναι κατά πολύ πιο διαπερατή στα  $\text{K}^+$  παρά σε οποιαδήποτε άλλα κατιόντα και το αποτέλεσμα αυτής της εκλεκτικότητας της μεμβράνης προς τα ιόντα καλίου είναι η ισχυρή έλξη των ιόντων αυτών προς το εσωτερικό των κυττάρων. Ακριβώς γι. αυτούς τους λόγους η συγκέντρωση των ιόντων καλίου στο εσωτερικό είναι κατά 30 φορές μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση των ιόντων αυτών στο εξωτερικό των κυττάρων. Και άλλα κατιόντα, πέραν των ιόντων καλίου, μπορούν να περάσουν στο εσωτερικό των κυττάρων αλλά ο ρυθμός εισόδου είναι σχετικά πολύ αργός.

Τα νευρικά και τα μυϊκά κύτταρα εμφανίζουν **ηλεκτρική διεγερσιμότητα**. Τα κανάλια μέσα από τα οποία περνούν τα ιόντα νατρίου και καλίου διαθέτουν «πύλες» που ανοίγουν ή κλείνουν τους πόρους των καναλιών. Όταν το κύτταρο βρίσκεται σε ηρεμία, οι πύλες  $\text{Na}^+$  είναι κλειστές αλλά πολλές πύλες  $\text{K}^+$  είναι ανοικτές με αποτέλεσμα το κύτταρο να είναι περισσότερο διαπερατό στο  $\text{K}^+$  παρά στο  $\text{Na}^+$ , ενώ η συνεχής λειτουργία της αντλίας  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  διατηρεί την ομοιοστασία των ιοντικών συγκεντρώσεων, έτσι ώστε να διατηρείται σταθερό το δυναμικό ηρεμίας (-70mV).

Όταν ο βαθμός της εκπόλωσης της μεμβράνης κάτω από την επίδραση ενός ερεθίσματος φτάσει σε μια κρίσιμη τιμή που ονομάζεται **κατώφλιος ή ουδική τιμή** εντάσεως του ερεθίσματος - (μεταξύ -50mV και -55mV) παράγεται **νευρική ώση ή δυναμικό ενέργειας**. Η **εκπόλωση** αυτή έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμα κατ'αρχήν των καναλιών  $\text{Na}^+$  και στην συνέχεια αυτών του  $\text{K}^+$ . Έτσι, παρατηρείται ραγδαία διάχυση  $\text{Na}^+$  στο εσωτερικό του κυττάρου που διαρκεί 1ms και το δυναμικό μεμβράνης αρχίζει να θετικοποιείται.

Αυτό που συμβαίνει στην πράξη είναι η αναστροφή της πολικότητας της μεμβράνης καθώς τα  $\text{Na}^+$  διαχέονται με ραγδαίους ρυθμούς στο εσωτερικό του κυττάρου. Το δυναμικό μεμβράνης αγγίζει τα +30mV καθώς κλείνουν οι πύλες στα κανάλια των ιόντων νατρίου και αρχίζουν να ανοίγουν οι πύλες στα κανάλια των ιόντων

καλίουγεγονός που διαρκεί πάλιν 1ms. Το δυναμικό ενέργειας φτάνει τα +30mV πριν ανοίξουν οι πύλες των καναλιών των ιόντων καλίου και αρχίσει η διάχυση των ιόντων από μέσα προς τα έξω (**επαναπόλωση**). Η συνεχιζόμενη έξοδος των ιόντων καλίου προκαλεί πρώτα **υπερπόλωση** ενώ στη συνέχεια, με τη βοήθεια της αντλίας ιόντων νατρίου/καλίου, επανέρχεται το δυναμικό ηρεμίας.

Το δυναμικό ενέργειας έχει δυο βασικά χαρακτηριστικά.

Κατ' αρχή, η παραγωγή του ακολουθεί το νόμο του «όλου ή τίποτα», δηλαδή, η εκπολωτική διέγερση θα προκαλέσει τη δημιουργία του δυναμικού ενεργείας αν και όταν φτάσει την κατώφλιο τιμή και μόνο τότε. Διεγέρσεις μικρότερης έντασης δεν προκαλούν παραγωγή δυναμικού ενέργειας. Μετά, τα δυναμικά ενέργειας αποτελούν πάντοτε ξεχωριστά γεγονότα, δηλαδή, το κάθε ένα είναι αυτόνομο και αυτό γιατί αμέσως μετά την παραγωγή του δυναμικού ενέργειας, η μεμβράνη καθίσταται ανερέθιστη για ένα πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Αυτή η περίοδος λέγεται ανερέθιστη περίοδος και για να δημιουργηθεί μια νέα ώση, πρέπει το επόμενο υπερουδικό ερέθισμα να φτάσει στο νευρώνα μετά την ανερέθιστη περίοδο, δηλαδή, αφού περάσουν περίπου 2msec, αφού τόσο διαρκεί το δυναμικό ενέργειας.

Η παραγωγή του δυναμικού ενέργειας δηλ της νευρικής ώσης είναι αποτέλεσμα της παθητικής και μόνο διάχυσης ιόντων. Η αντλία ιόντων νατρίου και καλίου, που είναι βέβαια ενεργητική, επαναφέρει τις συγκεντρώσεις αυτών των ιόντων στην προ της εκπόλωσης κατάσταση (δυναμικό ηρεμίας).

### **3.Αγωγή της νευρικής ώσης**

Η νευρική ώση δεν είναι μια ηλεκτρική διέγερση που μετακινείται κατά μήκος του νευράξονα σε ένα νευρώνα, πρόκειται περισσότερο για γεγονότα που επισυμβαίνουν ξανά και ξανά σε διαφορετικά σημεία της μεμβράνης του νευράξονα. Στην πραγματικότητα, αφ'ότου η ώση δημιουργηθεί, η ίδια αυτή καθ'αυτή ώση (δυναμικό ενέργειας) λειτουργεί ως επί μέρους εκπολωτικό ερέθισμα. Κάθε δυναμικό ενέργειας στα πρώτα του στάδια αντικατοπτρίζει την αναστροφή της πολικότητας της μεμβράνης καθώς γίνεται η ραγδαία διάχυση των  $\text{Na}^+$  στον νευράξονα. Τα θετικά φορτισμένα ιόντα εκπολώνουν το επόμενο τμήμα του νευράξονα το οποίο παράγει το επόμενο δυναμικό ενέργειας ενώ το προηγούμενο τμήμα επανέρχεται στην κατάσταση ηρεμίας, κάτι ανάλογο με το πλήθος των θεατών σε ένα κατάμεστο στάδιο όταν δημιουργεί το γνωστό «κύμα».Καθώς σηκώνονται τα άτομα από το



κάθισμά τους (εκπόλωση) και σηκώνουν τα χέρια (κορύφωση του δυναμικού ενέργειας) και μετά ξανακάθονται (εδώ βέβαια δεν παρατηρείται υπερπόλωση) δίνεται η εντύπωση ενός κύματος που ταξιδεύει.

Αναλυτικότερα, σχετικά με την αγωγή της νευρικής ώσης, στο αρχικό σημείο ερεθισμού, κάπου 7000 ιόντα νατρίου διαχέονται ραγδαία στο κύτταρο από το εξωκυττάριο υγρό, δημιουργώντας ρεύμα ιόντων μεταξύ του εξωκυττάριου υγρού και του κυτταροπλάσματος. Το ηλεκτρικό ρεύμα διαπερνά την πλασματική μεμβράνη και λίγο μακρύτερα από το σημείο ερεθισμού, με αποτέλεσμα να την ερεθίσει και να προκαλέσει εκπόλωση και δημιουργία δεύτερου δυναμικού ενέργειας. Η ροή του ηλεκτρικού ρεύματος επαναλαμβάνεται και η μεμβράνη ερεθίζεται σε ακόμη πιο απότερο σημείο από το σημείο του αρχικού ερεθισμού.

Το μέγεθος των δυναμικών ενέργειας είναι πάντοτε το ίδιο και δεν εξαρτάται από την ένταση του ερεθίσματος. Η ένταση του ερεθίσματος επηρεάζει τη συχνότητα των δυναμικών ενέργειας. Η ταχύτητα διάδοσης εξαρτάται από τη διάμετρο του νευράξονα και το είδος του, δηλ. την παρουσία ή όχι μυελίνης, η οποία εξασφαλίζει ισχυρή μόνωση κατά την αγωγή της ώσης και επομένως αυξημένη ταχύτητα και πιστότητα του ηλεκτρικού σήματος. Στα θηλαστικά έχει αναπτυχθεί μηχανισμός ταχύτερης διάδοσης των ώσεων στον οποίο ακριβώς συμμετέχει η μυελίνη που εναποτίθεται στον νευράξονα από τα κύτταρα Schwann.

Στους εμμέλους νευρώνες, οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που επιτρέπουν την είσοδο και έξοδο των ιόντων, βρίσκονται μόνο στα κενά του νευράξονα, δηλαδή εκεί όπου δεν υπάρχει μυελίνη. Το εξωκυττάριο υγρό βρίσκεται σε επαφή με το νευράξονα μόνο εκεί που δεν υπάρχει μυελίνη και μόνο σε αυτά τα σημεία μπορεί να γίνει ανταλλαγή ιόντων μεταξύ του κυττάρου και του περιβάλλοντός του. Έτσι, η νευρική ώση δε διαδίδεται κατά συνεχή τρόπο κατά μήκος του νευράξονα, αλλά, «πηδά» από κενό σε κενό, αποφεύγοντας το μονωμένο μέρος του νευράξονα. Με αυτό τον τρόπο η ταχύτητα διάδοσης των νευρικών ώσεων αυξάνεται σημαντικά.

## II. Πόνος

Ο πόνος είναι μια πολυδιάστατη αισθητηριακή εμπειρία πραγματικά δυσάρεστη. Διαφέρει σε ένταση ( ήπιος, μέτριος, σοβαρός), ποιότητα ( διαπεραστικός, σαν κάψιμο, αμβλύς), διάρκεια (παροδικός, διαλείπων, επίμονος), και εντόπιση

(επιφανειακός ή βαθύς, εντοπισμένος ή διάχυτος). Αν και είναι αίσθηση, έχει ισχυρά συνειδησιακά και συναισθηματικά στοιχεία. Συνδέεται με κινητικά αντανακλαστικά αποφυγής και με διέγερση του αυτόνομου νευρικού συστήματος.

## 1. Είδη και υποδοχείς του πόνου

Ο πόνος διακρίνεται σε δύο γενικές κατηγορίες: προσαρμοστικό και δυσπροσαρμοστικό. Ο προσαρμοστικός πόνος βοηθά στην επιβίωση καθώς προστατεύει τον οργανισμό από τους βλαπτικούς παράγοντες τους οποίους καθιστά αντιληπτούς. Αντίθετα ο δυσπροσαρμοστικός πόνος είναι έκφραση παθολογικής λειτουργίας του νευρικού συστήματος, δηλ. είναι ο ίδιος ασθένεια.

Η αισθητική εμπειρία του οξέος **προσαρμοστικού πόνου** που προκαλείται από ένα βλαπτικό ερέθισμα γίνεται αντιληπτή με τη μεσολάβηση ενός εξειδικευμένου αισθητικού συστήματος αντίληψης, σύστημα αλγοαντίληψης. Αυτό το σύστημα εκτείνεται από την περιφέρεια μέσω του νωτιαίου μυελού, του εγκεφαλικού στελέχους και του θαλάμου για να καταλήξει στον εγκεφαλικό φλοιό, όπου και γίνεται αντιληπτή η αίσθηση του πόνου. Η εκπαίδευση στην αποφυγή ορισμένων κατηγοριών ερεθισμάτων που ενέχουν κινδύνους, επιτυγχάνεται όταν συνδέεται το βλαπτικό ερέθισμα με το δυσάρεστο αίσθημα του πόνου. Η αίσθηση του πόνου πρέπει να είναι αρκετά δυνατή ώστε να προκαλεί την άμεση προσοχή. Αυτό το σύστημα αλγοαντίληψης είναι ένα σύστημα συναγερμού που αναγγέλλει την παρουσία του βλαπτικού ερεθίσματος. Ο προσαρμοστικός πόνος διακρίνεται στον βλάβοαντιληπτικό πόνο και στον φλεγμονώδη πόνο. Ο **βλάβοαντιληπτικός πόνος** πρέπει να ελέγχεται μόνο κάτω από ειδικές κλινικές καταστάσεις όπως είναι ο μετεγχειρητικός πόνος ή αυτός που προκαλείται από ιατρικές παρεμβάσεις και μετατραυματική καταστροφή ιστών. Αυτός ο πόνος είναι απαραίτητος γιατί έχει προστατευτική δράση. Απώλεια της αίσθησης αυτού του πόνου μπορεί να οδηγήσει σε τραυματισμό ιστών, αυτοτραυματισμούς, καταστροφή αρθρώσεων, απώλεια των δακτύλων και δημιουργία ελκών από πίεση. Γι'αυτούς τους λόγους ο βλάβοαντιληπτικός πόνος είναι μια φυσιολογική αίσθηση. Παράδειγμα της σημασίας αυτού του πόνου είναι οι ασθενείς με συγγενή έλλειψη αντίληψης του πόνου που οφείλεται σε μετάλλαξη του υποδοχέα του παράγοντα ανάπτυξης νεύρων που οδηγεί σε απώλεια νεύρων υψηλής αισθητικής οδού με αποτέλεσμα μειωμένο προσδόκιμο

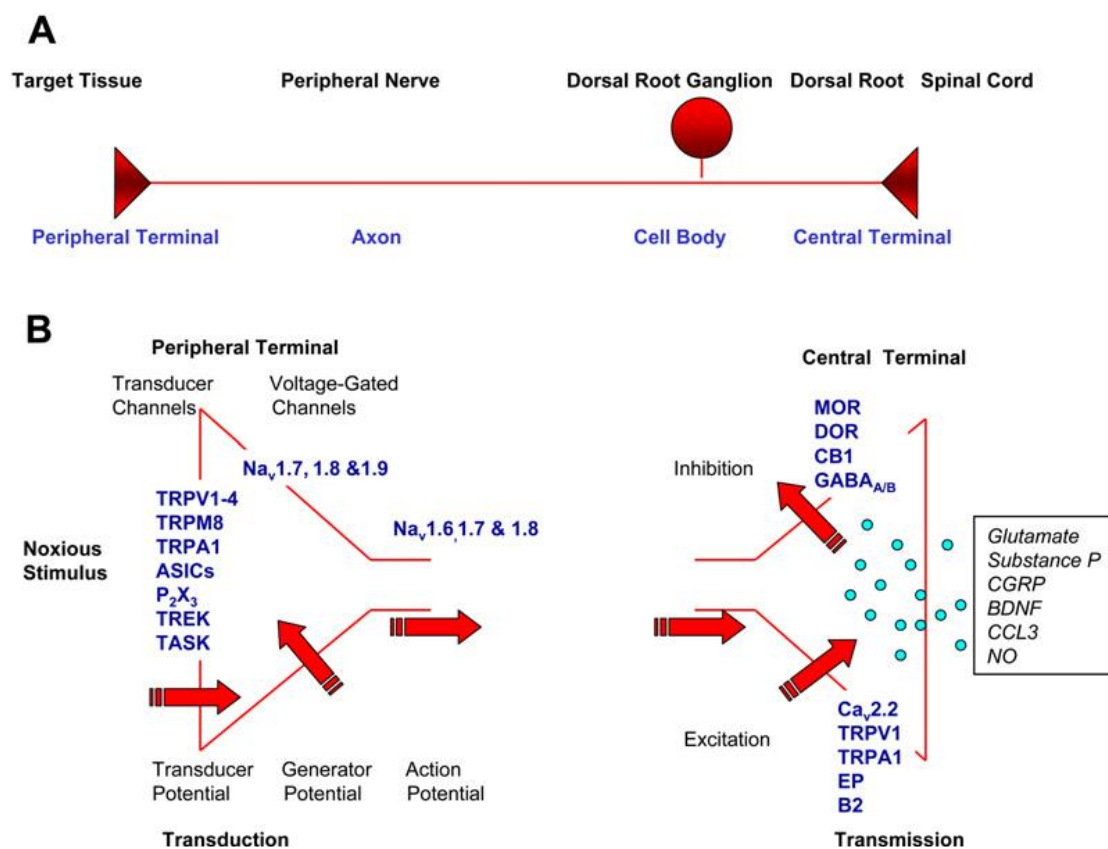
ζωής (Miiranda C, et al 2002). Ο **φλεγμονώδης πόνος** είναι αυτός που είναι παρών, όταν παρά την παρουσία του συστήματος αλγοαντίληψης εγκατασταθεί καταστροφή των ιστών (π.χ. μετά από τραυματισμό, χειρουργείο ή φλεγμονώδη νόσο), και το σώμα από την προστασία περνάει στη διαδικασία επούλωσης του τραύματος. Κάτω από αυτές τις συνθήκες αυξάνεται η ευαισθησία στα ερεθίσματα και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την προστασία του προσβεβλημένου μέλους από τη επαφή και την κίνηση, ελαχιστοποιώντας μέχρι την πλήρη επούλωση. Ο φλεγμονώδης πόνος συνήθως μειώνεται όταν η καταστροφή και η φλεγμονώδης απάντηση υποχωρήσουν. Ο φλεγμονώδης πόνος επίσης είναι προσαρμοστικός πόνος και γι' αυτό δεν πρέπει να καταργείται αλλά να φυσιολογικοποιείται.

Ο **δυσπροσαρμοστικός πόνος** δεν συνοδεύει βλαπτικά ερεθίσματα ή επουλωμένο ιστό. Αυτός ο πόνος είναι απάντηση σε βλάβη του νευρικού συστήματος (νευροπαθητικός πόνος) ή αποτέλεσμα μη φυσιολογικής λειτουργίας του νευρικού συστήματος (λειτουργικός πόνος). Ο δυσπροσαρμοστικός πόνος είναι έκφραση μιας μη φυσιολογικής αισθητικής διαδικασίας η οποία συνήθως είναι επίμονη ή επαναλαμβανόμενη. Οι θεραπευτικές δυνατότητες αυτού του πόνου είναι περιορισμένη καθώς περιορισμένες είναι και οι γνώσεις μας. Σε αυτό το είδος πόνου το σύστημα συναγερμού είτε είναι συνεχώς αναμμένο, είτε αναβοσβήνει χωρίς να υπάρχει πραγματικά επείγουσα κατάσταση. Ο νευροπαθητικός πόνος πιθανά είναι αποτέλεσμα βλαβών του περιφερικού νευρικού συστήματος, όπως σε ασθενείς με διαβητική πολυνευροπάθεια, AIDS, μεθερπητική νευραλγία, οσφυϊκή ριζίτιδα ή από το ΚΝΣ όπως σε ασθενείς με τραυματισμό του νωτιαίου μυελού, σκλήρυνση κατά πλάκας ή εγκεφαλικό επεισόδιο (Koltzenburg M, et al 2001). Στον λειτουργικό πόνο δεν παρατηρείται νευρολογικό έλλειμμα ή περιφερική ανωμαλία. Αυτός ο πόνος οφείλεται σε μη φυσιολογική ανταπόκριση ή λειτουργία του νευρικού συστήματος κατά τον οποίο η αυξημένη ευαισθησία του αισθητικού οργάνου προκαλεί τα συμπτώματα. Παρατηρείται στην ινομυαλγία, στο σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, σε μερικές μορφές μη καρδιακού θωρακικού πόνου και στην κεφαλαλγία τάσης (Bennet RM. 2002, Sarkar S, et al 2000, and Bolay H. 2002). Είναι άγνωστος ο μηχανισμός αυτού του πόνου.

### **Υποδοχείς πόνου (nociceptors)**

Ο υποδοχέας είναι ένας ειδικευμένος ανιχνευτής βλαπτικών ερεθισμάτων εξαιρετικά πλαστικός είτε σε απάντηση βλάβης, που τυχόν συμβαίνει στον άξονα του είτε έκθεσης του σε φλεγμονή, η πλαστικότητά του δεν είναι ενσωματωμένη στην

λειτουργία παραγωγής πόνου (Woolf C.J, Ma Q, 2007). Οι υποδοχείς αναγνωρίζουν τα επικίνδυνα σήματα του περιβάλλοντος και διαθέτουν υψηλή ουδό, ώστε να αντιδρούν σε εκείνα τα ερεθίσματα που δυνητικά ή πραγματικά έχουν αρκετή ενέργεια ώστε να βλάψουν τους ιστούς. Μερικοί διαθέτουν εμύελες ίνες (Αδ), οι περισσότεροι όμως έχουν αμύελες ίνες (C), βραδείας αγωγής, και αυτοί αποτελούν την πλειονότητα των αισθητικών νευρώνων του περιφερικού νευρικού συστήματος (Π.Ν.Σ.). (McCleskey EW, Gold MS. 1999). Το κυτταρικό σώμα βρίσκεται στα γάγγλια των οπισθίων ριζών από όπου εκφύεται ένας ενιαίος άξονας, που διαχωρίζεται σε ένα περιφερικό κλάδο που νευρώνει τον περιφερικό ιστό στόχο και ένα κεντρικό κλάδο που εισέρχεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Κ.Ν.Σ.) και συνάπτεται με τον νευρώνα β' τάξης. (Woolf and Ma, 2007)



**Εικόνα 1.Υποδοχείς πόνου(Woolf and Ma, 2007)**

Μεταλλάξεις του υποδοχέα TrKA του παράγοντα ανάπτυξης των νευρών (NGF) όπως και του SCN9A που κωδικοποιεί την α-υπομονάδα του Na<sub>v</sub>1,7, τα σεοελεγχόμενου καναλιού του νατρίου, οδηγούν σε εμβρυϊκή απώλεια των βλαβούποδοχέων και καταλήγουν σε συγγενή υποαισθητικότητα του πόνου με

εξαιρετικά αρνητικά αποτελέσματα στην ζωή αυτών των ανθρώπων (Verrooten et al, 2006; Cox et al, 2006; Goldberg et al, 2007). Όλοι οι εμβρυϊκοί βλαβοϋποδοχείς εκφράζουν τον υποδοχέα TrKA του NGF (Marmigere and Enfors, 2007). Το γονίδιο *Btn3a* και το Zn-finger γονίδιο *Klf7* απαιτούνται για τη διατήρηση του TrKA υποδοχέα (Lei et al, 2006). Μετά την νευρογένεση των αισθητικών υποδοχέων οι βλαβοϋποδοχείς ακολουθούν 2 διαφορετικές οδούς διαφοροποίησης που οδηγούν στις δύο μεγάλες κλάσεις: τους πεπτιδεργικούς και μη πεπτιδεργικούς βλαβοϋποδοχείς. Οι μη πεπτιδεργικοί υποδοχείς εκφράζουν τον Ret, τον διαμεμβρανικό υποδοχέα, τον προερχόμενο από τα κύτταρα της γλοίας (glial cell derived factor-GDNF). Οι πεπτιδεργικοί διατηρούν τον TrKA και εκφράζουν τους παράγοντες CGRP και SP (Bennett et al 1996, Mollirer et al 1997).

Σε αυτή τη διαφοροποίηση των υποδοχέων σημαντικό ρόλο παίζει το γονίδιο *Runx1* του οποίου η έκφραση εξαφανίζεται στους πεπτιδεργικούς νευρώνες TrKA αλλά παραμένει στους μη πεπτιδεργικούς (Chein et al, 2006). Ο ώριμος υποδοχέας εκφράζει μεγάλο αριθμό καναλιών ιόντων και υποδοχέων και ο έλεγχος της λειτουργίας όλων αυτών αποτελεί προϋπόθεση της ανίχνευσης των βλαπτικών ερεθισμάτων, η έκφραση δε όλων αυτών είναι ιεραρχημένη. Σήματα του TrKA απαιτούνται για την εγκατάσταση της μοριακής και λειτουργικής πυκνότητας των βλαβοϋποδοχέων (Luo et al 2007, Patel et al 2006). Ο *Runx1* απαιτείται για την έκφραση μεγάλης ομάδας ειδικών βλαβοϋποδοχέων και καναλιών όπως το κανάλι TRPC3 για τον TRP, ο υποδοχέας P2x3, το κανάλι νατρίου  $Na_v 1,9$  (Chen et al 2006) και την έκφραση των θερμο-χημικών υποδοχέων πόνου TRP όπως: TRPA1, TRPV1 κ'2. Ο *Runx 1* εν τούτοις είναι ικανός να περιορίσει την έκφραση σε μια ξεχωριστή ομάδα καναλιών υποδοχέων όπως τα ( acid sensing ion channels ) ASIC 1-3, ο υποδοχέας των οπιοειδών MOR και το κανάλι νατρίου  $Na_v 1,8/SNS$  (Chen et al 2006). Συνεπώς τα κανάλια/υποδοχείς πόνου μπορούν να διαιεθούν σε *Runx1* εξαρτημένα κ' *Runx1*-ανεξάρτητα. Το *Runx-1*, εκλεκτικά, απαιτείται για τη θερμική και όχι την μηχανική αίσθηση του πόνου *in vivo*. Η εξειδικευμένη αισθητικότητα του υποδοχέα καθιερώνεται από την έκφραση ιοντικών καναλιών συντονισμένων να αντιδρούν με υψηλή ουδό μόνο σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του μηχανικού, θερμικού ή χημικού περιβάλλοντος (Ramsey et al, 2006, Julius D and Basbaum AI. 2001) Η υψηλή ουδός αυτών των μεταγωγέων σήματος διαφοροποιεί τους βλαβοϋποδοχείς από τους αισθητικούς νευρώνες που απαντούν σε αυτά εκφράζοντας μεταγωγείς χαμηλής ουδού. Η πλαστικότητα των νευρώνων έχει επηρεάσει την

ανάπτυξη ενός ευρέως φάσματος μεταγωγέων του σήματος όπως τα TRPV1-4 κανάλια που ανιχνεύουν σήματα θερμικού πόνου ή τα TRPM8, TRPA1 που ανιχνεύουν σήματα πόνου από το ψύχος και μάλιστα μερικά όπως το TTX-R Na<sub>v</sub> 1,8 τασσεοεξαρτώμενο κανάλι Na είναι ανθεκτικό στο κρύο και μεταδίδει ώσεις πόνου, όταν όλες οι άλλες αισθήσεις ακόμη και η κινητικότητα έχουν εκπέσει (Zimmermann et al 2007).

Πολλά TRP κανάλια είναι ευαίσθητα σε πικάντικες γευστικές ουσίες που βρίσκονται στο chili, σκόρδο, μέντα, μουστάρδα, αγριοραπανάκια, ρίγανη, θρύμβη, και θυμάρι (Xu et al 2006) ή σε λιγότερο ευχάριστες ερεθιστικές ουσίες όπως η ακρολεΐνη, ένα χημικό όπλο του Α΄ Παγκοσμίου πολέμου και συστατικό του τσιγάρου (Bautista et al 2006) και μερικές τοξίνες αραχνών (Siemens et al 2006). Οι TRP ανιχνεύουν εκτός από εξωτερικά και εσωτερικά σήματα στους ιστούς από την ενεργοποίησή τους από ενδογενείς ουσίες όπως η N-ακυλ-ταυρίνη (Van der stelt et al 2005)

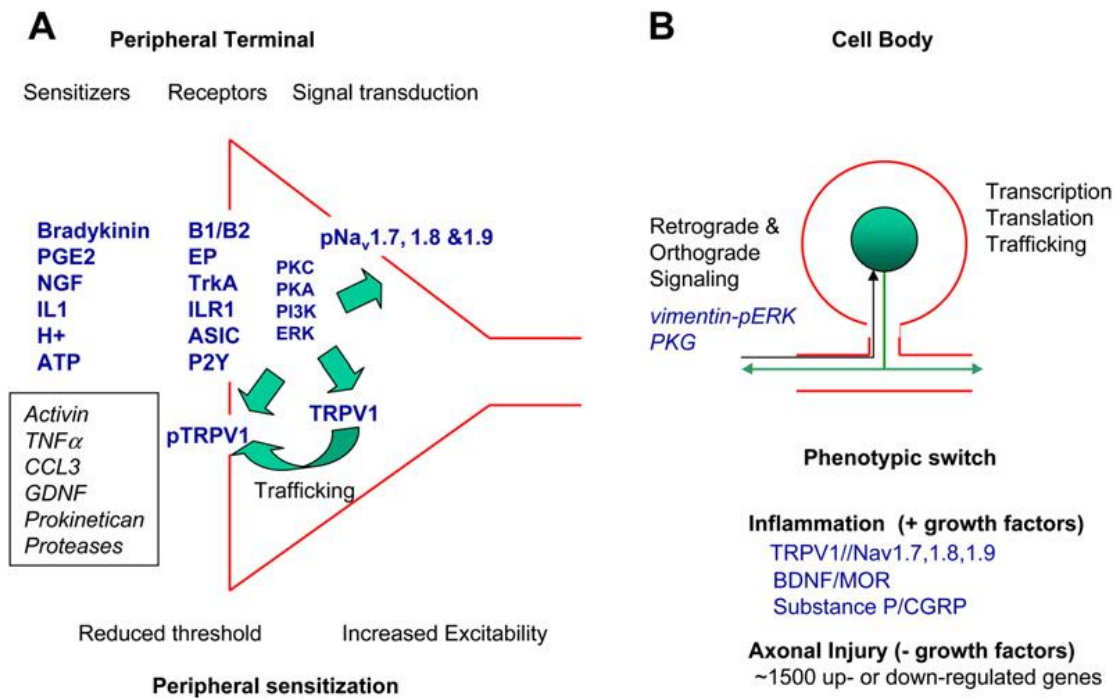
Οι TRP υποδοχείς δρουν και ως υποδοχείς λειτουργούμενοι από τη βραδυκινίνη καθώς προκαλούν είσοδο Ca σε απάντηση της σύνδεσης βραδυκινίνης στους B2 υποδοχείς της (Bautista et al 2006).

Γενικά πρόκειται για ομάδα πολύτροπων μεταγωγέων βλαπτικών σημάτων για ερεθίσματα που είτε δυνητικά απειλούν τους ιστούς είτε η βλάβη έχει συμβεί και αυτή ανιχνεύεται από την απελευθέρωση βραδυκινίνης και άλλων συνδέσμων (ligands) των οποίων οι υποδοχείς είναι συζευγμένοι με τους TRP υποδοχείς.

### **Περιφερική ευαισθητοποίηση**

Μια περιφερική ιστική βλάβη ή φλεγμονή μεταβάλλει το τοπικό χημικό περιβάλλον λόγω καταστροφής των κυττάρων, αποκοκκίωσης των μαστοκυττάρων, εκκρίσεων από τα φλεγμονώδη κύτταρα και επαγωγή ενζύμων όπως κύκλοξυγενάση-2.

Τα παραπάνω έχουν σαν αποτέλεσμα και την μεταβολή των υποδοχέων οι οποίοι ενώ είναι ανιχνευτές αποκλειστικά βλαπτικών ερεθισμάτων, αντιδρούν και σε αθώα ερεθίσματα. Έτσι χαμηλής-ουδού ερεθίσματα προωθούνται στις οδούς του πόνου και αρχίζουν να προκαλούν πόνο. Ένα ευρύ φάσμα ουσιών (sensitizers) που ευαισθητοποιούν τους υποδοχείς, περιλαμβάνει κινίνες, αμίνες, προστανοειδή, αυξητικούς παράγοντες, χυμοκίνες, κυτοκίνες. (Woolf, Ma, 2007).



Εικόνα 2. Περιφερική ευαισθητοποίηση (Woolf & Ma ,2007).

Αυτοί οι ευαισθητοποιητές συνδέονται στην μεμβράνη του υποδοχέα και ενεργοποιούν πολλές ενδοκυττάρειες οδούς μεταγωγής σήματος στην περιφερική απόληξη, που περιλαμβάνουν τις PKC, PKA, P13K, και τις MAP κινάσες : ERK κ' p38 κ' JNK (Woolf, Ma, 2007). Αυτοί οι καταρράκτες προκαλούν φωσφορυλίωση των TRP και τάσεοεξαρτώμενων καναλιών Na και μεταβάλουν την ουδό και τις κινητικές αντιδράσεις (Εικ.2) επάγοντας περιφερική ευαισθητοποίηση. Συνεπώς ανταγωνιστές των TRP υποδοχέων και εκλεκτικών αναστολέων των καναλιών Na είναι πιθανά μια καλή προσέγγιση μείωσης της περιφερικής ευαισθητοποίησης και του φλεγμονώδους πόνου (Jarvis et al 2007).

Επίσης μεταλλάξεις του τάσεο-εξαρτώμενου καναλιού Na<sub>v</sub>1.7, του νατρίου, αυξάνουν τη διεγερσιμότητα του υποδοχέα ή προκαλούν κληρονομικού τύπου ερυθρομαλγία, (erythromalgia) κατάσταση στην οποία ερεθίσματα θερμού, προκαλούν επεισόδια καυστικού πόνου. Η περιφερική φλεγμονή εκτός της περιφερικής ευαισθητοποίησης προκαλεί ανάδρομα σήματα προς τον νευρώνα που αυξάνουν την μεταγραφή νευροπεπτιδίων, BDNF και καναλιών Na καθώς και αυξημένη μετάφραση των TRP καναλιών (Ji et al 2002).

Αν ο περιφερικός άξονας του υποδοχέα τμηθεί η έλλειψη σημάτων μεταβάλει την μεταγραφή περισσότερων των 1000 γονιδίων (Xiao et al, 2002). Τα κανάλια TRP και

Να μειορρυθμίζονται στον DRG νευρώνα, ενώ αυξορρυθμίζονται ένζυμα που συμμετέχουν στην σύνθεση-ανακύκλωση της τετραϋδροβιοπτερίνης (BH4) συμπαράγοντα της σύνθεσης του μονοξειδίου του αζώτου- NO. Η αύξηση του NO στον DRG νευρώνα αυξάνει την είσοδο Ca και την πρόκληση πόνου. Αναστολή της σύνθεσης BH4 προκαλεί αναλγησία. (Tegeder etal 2006)

## 2. Αισθητικές οδοί πόνου

Τα δυναμικά ενεργείας μεταδίδονται από το περιφερικό προς το κεντρικό νευρικό σύστημα , μέσω του άξονα του πρώτου αισθητικού νευρώνα, των γαγγλίων των οπίσθιων ριζών και των οπισθίων κεράτων του νωτιαίου μυελού, όπου πραγματοποιείται η σύναψη του με τον δεύτερο αισθητικό νευρώνα .Τα σήματα του ταχέος πόνου εκλύονται με μηχανικά και θερμικά ερεθίσματα και μεταδίδονται με ίνες τύπου Αδ των περιφερικών νευρών. Αντίθετα, τα σήματα του βραδέος, χρόνιου πόνου μεταδίδονται μέσω ινών τύπου C. Καθώς οι ίνες αυτών των δύο τύπων μπαίνουν στην σπονδυλική στήλη, διαχωρίζονται, έτσι ώστε οι ίνες του τύπου Αδ διεγείρουν νευρώνες της ζώνης I του οπισθίου κέρατος, ενώ οι ίνες C σχηματίζουν συνάψεις με νευρώνες της πηκτωματώδους ουσίας. Οι τελευταίοι προβάλλουν στη συνέχεια βαθύτερα στη φαιά ουσία και ενεργοποιούν νευρώνες κυρίως της ζώνης V, αλλά και των VI και VII. Οι νευρώνες, που δέχονται ερεθίσματα από ίνες Αδ, αποτελούν αρχή της *νεονωτιαιοθαλαμικής* οδού, ενώ αυτές που σχετίζονται με ίνες C σχηματίζουν την *παλαιονωτιαιοθαλαμική* οδό.

Η **νεονωτιαιοθαλαμική οδός** χρησιμοποιείται για εντοπισμό του πόνου. Οι άξονες των νευρώνων της ζώνης I, που αποτελούν την νεονωτιαιοθαλαμική οδό, τέμνουν την μέση γραμμή κοντά στο σημείο απόφυσής τους και ανέρχονται την σπονδυλική στήλη σαν μέρος του προσθιοπλάγιου συστήματος. Ωρισμένες από τις ίνες αυτές καταλήγουν στον δικτυωτό σχηματισμό του εγκεφαλικού στελέχους, οι περισσότερες, όμως, προβάλλονται τελικά στον οπίσθιο έξω κοιλιακό πυρήνα (VPL) του θαλάμου. Από εδώ, οι θαλαμικοί νευρώνες προβάλλονται στον πρωτεύοντα αισθητικό φλοιό (SI). Το σύστημα αυτό χρησιμεύει, κατά πρώτο λόγο, για την χωρική εντόπιση ερεθισμάτων πόνου. Η δραστηριότητα του **παλαιονωτιαιοθαλαμικού συστήματος** μπορεί να εκλύει την δυσάρεστη αίσθηση πόνου. Η παλαιονωτιαιοθαλαμική οδός είναι φυλογενετικά παλαιότερη από τις δύο οδούς



πόνου. Οι άξονες των κυττάρων της ζώνης V, όπως και αυτοί της ζώνης I, χιάζονται άμεσα στον τόπο προέλευσής τους και ανέρχονται ως μέρος του προσθιοπλάγιου συστήματος. Οι άξονες της ζώνης V τερματίζουν σχεδόν αποκλειστικά στο εγκεφαλικό στέλεχος, παρά στον θάλαμο, όπου οι ίνες αυτές διεγείρουν τον δικτυωτό σχηματισμό, τα πρόσθια διδύμια και την κεντρική φαιά ουσία. Ένα σύνολο ανερχόμενων ινών, κυρίως από τον δικτυωτό σχηματισμό, προσανατολίζεται πρόσθια προς τους **ενδοπεταλιακούς πυρήνες** και **οπίσθιους πυρήνες του θαλάμου**, καθώς και προς ορισμένα μέρη του υποθαλάμου. Τα μεταδιδόμενα με αυτή την οδό σήματα πόνου εντοπίζονται τυπικά μόνο σε εκτεταμένα μέρη του σώματος. Για παράδειγμα, εάν τα σήματα προέρχονται από το χέρι, αυτά γίνονται αντιληπτά σαν να εντοπίζονται ‘κάπου’ στο άνω άκρο. ( Hall ,2006, Rhodes and Pflanzner,1996)

### **3. Αναλγητικό σύστημα**

Η επεξεργασία στο κεντρικό νευρικό σύστημα της αρχής, διάρκειας, έντασης, και θέσης του περιφερικού βλαπτικού ερεθίσματος γίνεται μέσω της ταχείας συναπτικής ενεργοποίησης από τους αλγυποδοχείς, του νευρώνα του νωτιαίου μυελού (που δέχεται ερεθίσματα από το σώμα) ή του πυρήνα του τρίδουμου νεύρου (που δέχεται ερεθίσματα από το πρόσωπο). Μερικοί από αυτούς τους νευρώνες στέλνουν πληροφορίες στον θάλαμο, μεταφέροντας την αισθητική πληροφορία στον εγκέφαλο. Τα ταχέα δυναμικά των συνάψεων επιτυγχάνονται με την απελευθέρωση του γλουταμινικού οξέος ,από το κεντρικό άκρο του υποδοχέα άλγους , το οποίο δρα σε ιοντικά κανάλια υποδοχέων της μετασυναπτικής μεμβράνης του κεντρικού νευρώνα (Woolf CJ, Salter MW. 2000). Ο θάλαμος δέχεται ένα μικρό μόνο μέρος της αισθητικής πληροφορίας που έρχεται από το νωτιαίο μυελό σαν αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των δυναμικών ενεργείας των νευρώνων των οπίσθιων κεράτων και στέλνει αυτή την πληροφορία στον εγκεφαλικό φλοιό. Τα κεντρικά άκρα των αλγυποδοχέων περιέχουν προσυναπτικούς υποδοχείς που μπορούν να μεταβάλουν την απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή. Αυτό το προσυναπτικό κεντρικό άκρο του άξονα του νευρώνα είναι σημαντική θέση δράσης οπιοειδών, καναβινειδών, γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) και του αντιεπιληπτικού γκαμπαπεντίνης. Η μέτασυναπτική αναστολή εμπεριέχει ένα υπερπολωτικό ανασταλτικό δυναμικό που προκαλείται στους νευρώνες των οπίσθιων κεράτων με το άνοιγμα καναλιών καλίου και χλωρίου σαν απάντηση στα οπιοειδή και στο GABA. Τα οπιοειδή είναι

αποτελεσματικά γιατί δρουν προ- και μετασυναπτικά καθώς και σε ποικίλες περιοχές του νευρικού συστήματος. Η διαδικασία της αίσθησης ελέγχεται από τοπικά τμήματα της περιοχής του νωτιαίου μυελού καθώς ελαττώνει τον τόνο, αναστέλλει την κρίσιμη φάση και διευκολύνει την ροή από τον εγκέφαλο. Ο αναλγητικός μηχανισμός είναι αρκετά ισχυρός ώστε μπορεί να υπερισχύσει της αίσθησης του άλγους, εμποδίζοντας την μεταφορά της στις περιοχές του εγκεφαλικού φλοιού. Η αναστολή μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί με διάφορους τρόπους συμβάλλοντας στην placebo αναλγησία, όπως θεωρείται ότι συμβαίνει σε θεραπείες βελονισμού. Ωστόσο αυτή η δράση του αναλγητικού συστήματος είναι απρόβλεπτη και εξαρτάται από τη δεκτικότητα και την πίστη του ασθενούς. Μεγαλύτερη επιτυχία έχει ο φαρμακολογικός χειρισμός του ανασταλτικού μηχανισμού, σε συγκεκριμένες θέσεις των μ υποδοχέων των οπιοειδών, οι οποίοι μεσολαβούν όλες τις δράσεις της μορφίνης (Matthes HW, 1996). Αυτός ο υποδοχέας είναι υπεύθυνος για τις παρενέργειες του αγωνιστή του: ναυτία, καταστολή, δυσλειτουργία της συνείδησης, αναπνευστική καταστολή και δυσκοιλιότητα.

### **III.Τοπικά αναισθητικά**

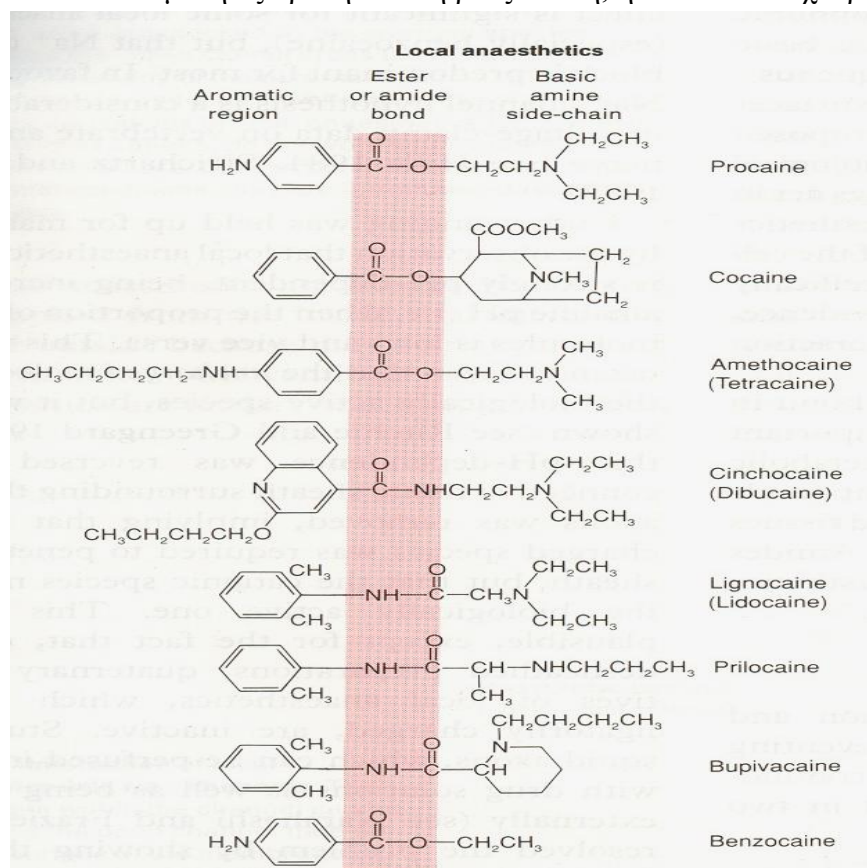
#### **1.Γενικά-Ιστορία**

Τα τοπικά αναισθητικά εφαρμόζονται για την πρόκληση παροδικής και αναστρέψιμης κατάργησης των αισθήσεων σε μια περιορισμένη περιοχή του σώματος, μέσω παρεμπόδισης της νευρικής αγωγιμότητας. Η μάσηση φύλλων κόκας και η αίσθηση μουδιάσματος στη γλώσσα και στο στόμα από τους ινδιάνους της Νότιας Αμερικής για χιλιάδες χρόνια ήταν γνωστή για πολύ καιρό. Εντούτοις μόλις το 1884 προτάθηκε η κοκαΐνη ως ένα τοπικό αναισθητικό για χειρουργικές επεμβάσεις. Η κοκαΐνη απομονώθηκε από τα φύλλα κόκας το 1860 και βρέθηκε ότι σταματάει την επίδραση αισθητικής διέγερσης στους βατράχους. Ο Anrep το 1880 δημοσίευσε ότι η ένεση κοκαΐνης κάτω από το δέρμα προκαλεί μια αναστρέψιμη απώλεια αίσθησης και πρότεινε ότι το φαινόμενο αυτό θα μπορούσε να είναι κλινικά χρήσιμο, ιδέα η οποία τότε δεν έγινε αποδεκτή. Ο Sigmund Freud επιδίωξε ανεπιτυχώς, να χρησιμοποιήσει την ισχυρή ιδιότητα «ψυχικής ενέργειας» του τοπικού αυτού αναισθητικού, που ήταν γνωστή από τους χρήστες των φύλλων κόκας στις Άνδεις, για ψυχιατρικούς σκοπούς.

Όμως ο φίλος και συνάδελφος του οφθαλμολόγος Carl Köller στη Βιέννη, προμηθεύτηκε λίγη κοκαΐνη από τον Freud και έδειξε το 1884 ότι, προκαλείται αναστρέψιμη αναισθησία του κερατοειδούς χιτώνα στάζοντας κοκαΐνη μέσα στο μάτι. Εκείνη την περίοδο, η ιδέα έγινε ταχέως αποδεκτή, και μέσα σε λίγα χρόνια η αναισθησία από την κοκαΐνη εισήχθη στην οδοντιατρική και στη γενική χειρουργική. Το 1904, με την εισαγωγή της προκαΐνης από τον Einhorn, αρχίζει μια νέα εποχή για την τοπική αναισθησία. Η προκαΐνη ήταν το πρώτο ακίνδυνο ενέσιμο τοπικό αναισθητικό που παρέμεινε σε χρήση για πολλά χρόνια μέχρι να εκτοπιστεί από τη λιδοκαΐνη. Άλλα σημαντικά τοπικά αναισθητικά είναι η τετρακαΐνη, η μεπιβακαΐνη, η πριλοκαΐνη και η βουπιβακαΐνη (Goth, 1981, Rang and Dale, 1991).

## 2. Δομή και μηχανισμός δράσης

Τα μόρια των τοπικών αναισθητικών, αποτελούνται από ένα αρωματικό δακτύλιο συνδεδεμένο μέσω ενός εστερικού ή αμιδικού δεσμού με μια βασική πλευρική αλυσίδα. Η μόνη εξαίρεση είναι η βενζοκαΐνη, ην οποία δεν έχει βασική μονάδα

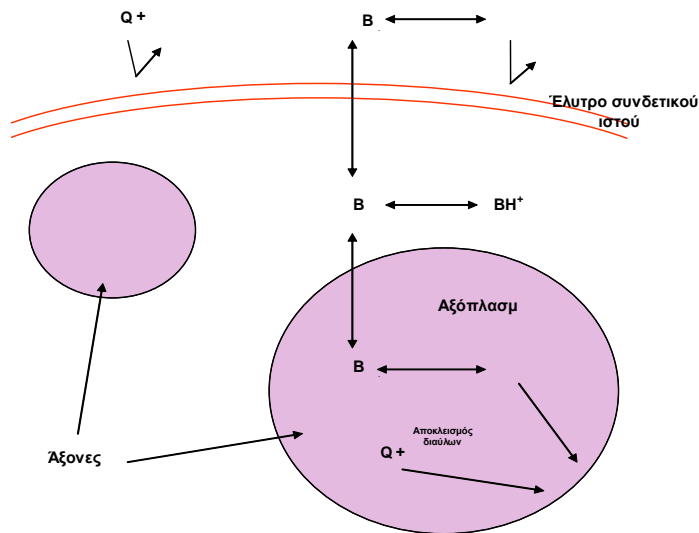


**Fig. 31.4 Structures of local anaesthetics and drugs that block** of local anaesthetic molecules consists of aromatic group (left), amine group (right).

**Σχήμα 1. ΔΟΜΕΣ ΤΩΝ ΤΟΠΙΚΩΝ ΑΝΑΙΣΘΗΤΙΚΩΝ.** Η γενική δομή των μορίων των τοπικών αναισθητικών αποτελείται από αρωματική ομάδα (αριστερά), εστέρα ή αμιδική ομάδα (ροζ πλαίσιο) και αμινομάδα (δεξιά) (Rang and Dale, 1991).

Όλα τα τοπικά αναισθητικά είναι ασθενείς βάσεις με τιμές  $pK_a$  κυρίως μεταξύ 8-9 έτσι ώστε να είναι κυρίως, αλλά όχι εντελώς ιονισμένα σε φυσιολογικό pH, γεγονός σημαντικό σε ότι αφορά την ικανότητα διείσδυσης τους στο έλυτρο των νευρώνων και στη μεμβράνη του νευράξονα. Γι αυτό και τα πλήρως ιονισμένα παράγωγα των ουσιών αυτών, ανεξάρτητα από το pH, δεν είναι αποτελεσματικά ως τοπικά αναισθητικά. Επειδή τα μόρια των τοπικών αναισθητικών αποτελούνται από μια υδρόφοβη αρωματική ομάδα συνδεδεμένη με μια υδρόφιλη βασική ομάδα, εμφανίζουν χαμηλή δραστικότητα επιφανειακής τάσης. Προτάθηκε ότι αυτό το γεγονός, είναι σημαντικό για τη βιολογική δράση τους από τον Skou το 1961 και ότι αυτές οι ουσίες, δρουν παρόμοια με τα πτητικά γενικά αναισθητικά επεκτείνοντας τον όγκο της κυτταρικής μεμβράνης και επεμβαίνοντας μη-ειδικά στη λειτουργία των διαύλων ιόντων. Τέλος, η ύπαρξη του εστερικού ή αμιδικού δεσμού στα μόρια των τοπικών αναισθητικών είναι σημαντική λόγω της ευαισθησίας του στη μεταβολική υδρόλυση. Τα εστερικά τοπικά αναισθητικά όπως η βενζοκαΐνη, η κοκαΐνη, η προκαΐνη και η τετρακαΐνη, απενεργοποιούνται με υδρόλυση στο αίμα και στους ιστούς, κυρίως στο συκώτι. Τα αμιδικά τοπικά αναισθητικά όπως η βουπιβακαΐνη, η ροπιβακαΐνη, η λιδοκαΐνη, η μεπιβακαΐνη, η διβουκαΐνη και η πριλοκαΐνη, είναι πολύ πιο σταθερά έχοντας μακροχρόνια ημιζωή στο πλάσμα και μεταβολίζονται κυρίως στο ήπαρ (Rang and Dale, 1991, Θεοχαρίδης, 1997).

Όσον αφορά το μηχανισμό δράσης τους, τα τοπικά αναισθητικά, χωρίς να επηρεάζουν το δυναμικό ηρεμίας ή τον ουδό ερεθισμού των νευρώνων, ασκούν αποκλεισμό σταματώντας την έναρξη και τη διάδοση των δυναμικών ενέργειας, παρεμποδίζοντας την αύξηση της αγωγιμότητας των ιόντων νατρίου ( $Na^+$ ). Η δράση αυτή φαίνεται ότι ασκείται κυρίως με αποκλεισμό των τασεοεξαρτώμενων διαύλων  $Na^+$ . Τα συνηθισμένα τοπικά αναισθητικά που είναι τριτογενείς ή δευτερογενείς αμίνες, διεισδύουν στο έλυτρο μυελίνης και στη μεμβράνη του νευράξονα στη μη φορτισμένη μορφή, αλλά δρουν από την εσωτερική επιφάνεια της αξονικής μεμβράνης στην κατιονική μορφή (Rang and Dale, 1991).



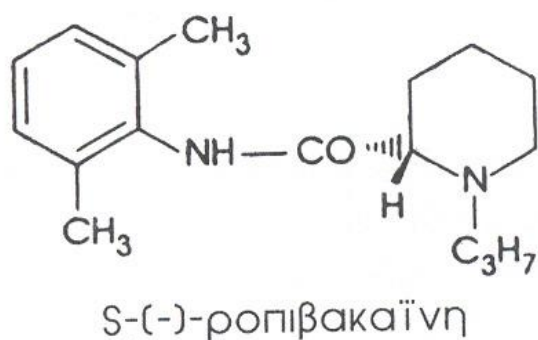
**Σχήμα 2 . Ιστική διείσδυση και δράση των τοπικών αναισθητικών**

Γενικά τα τοπικά αναισθητικά ασκούν αποκλεισμό στην αγωγιμότητα των νευρικών ινών μικρής διαμέτρου πιο εύκολα, από ότι στις μεγάλες νευρικές ίνες. Ωστόσο, οι μικρότερες ίνες στα περιφερικά νεύρα είναι οι αμύελες C-ίνες (C-fibers) με διάμετρο μικρότερη του 1 μ που άγουν τα ερεθίσματα με ταχύτητα 1m/sec. Αυτές είναι λιγότερο ευαίσθητες από τις μικρότερες εμύελες ίνες Αδ, με διάμετρο 1-20 μ και με ταχύτητα αγωγής μέχρι 100 m/sec. Επειδή οι ώσεις ερεθισμάτων πόνου φέρονται από τις ίνες Αδ- και C-, η αίσθηση του πόνου υφίσταται αποκλεισμό πιο εύκολα από άλλες αισθητικές λειτουργίες, όπως η αφή και τα ιδιοδεκτικά ερεθίσματα. Οι άξονες των κινητικών νευρώνων, επειδή είναι μεγάλοι σε διάμετρο, είναι επίσης σχετικά ανθεκτικοί (Goth, 1981, Rang and Dale, 1991, Θεοχαρίδης, 1997).

### 3. Ροπιβακαΐνη

Η ροπιβακαΐνη (ropivacaine hydrochloride, Naropin TM), είναι ένα από τα προσφάτως εισαχθέντα στην αγορά τοπικά αναισθητικά αμιδικού τύπου, που επινοήθηκε και αναπτύχθηκε σε ένα πρωτότυπο ερευνητικό πρόγραμμα της “Astra Pain Control AB”, στην Σουηδία. Είναι ένα εναντιομερές του υδροχλωρικού άλατος της S-(-)-1-προπυλ -2',6' -πιπεκολοξυλιδίδης και η δομή του είναι ενδιάμεση μεταξύ της βουπιβακαΐνης και της μεπιβακαΐνης. Τα τοπικά αναισθητικά της ομάδας των πιπεκολοξυλιδίων είναι ουσίες με οπτική ισομέρεια (chiral), γιατί το μόριό τους έχει ένα ασύμμετρο άτομο άνθρακα και επομένως μπορεί να έχει αριστερόστροφη ή δεξιόστροφη μορφή. Ενώ η μεπιβακαΐνη και η βουπιβακαΐνη παράγονται για κλινική

χρήση σαν ρακεμικά μείγματα των εναντιομερών περιλαμβάνοντας ίσες αναλογίες “S” και “R” μορφών, η ροπιβακαΐνη παρασκευάζεται σαν ένα γνήσιο S-εναντιομερές. Συγκεκριμένα, παρασκευάζεται από την αλκυλοποίηση του S εναντιομερούς του διβενζοϊλικού-L-ταρταρικού οξέος και έχει 99,5% εναντιομερική γνησιότητα.



Όσον αφορά τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ροπιβακαΐνης έχει βρεθεί ότι η λιπιδιακή διαλυτότητα του αναισθητικού αυτού είναι σχετικά χαμηλή και ανάμεσα σε αυτή της λιδοκαΐνης και της βουπιβακαΐνης και η

σταθερά διάστασης (pKa) είναι 8,1, ίδια με αυτή της βουπιβακαΐνης και λίγο υψηλότερη από αυτή της λιδοκαΐνης (McClure, 1996, McClellan and Faulds, 2000, O’Keeffe and Healy, 1999, Owen and Dean, 2000). Επίσης η ροπιβακαΐνη επιδεικνύει ένα πολύ παρόμοιο φαρμακοδυναμικό προφίλ με αυτό των αντίστοιχων δόσεων βουπιβακαΐνης. Δόσεις 0,5%, 0,75% και 1% (ή 5, 7,5 και 10 mg/mL αντίστοιχα) ροπιβακαΐνης χρησιμοποιούνται για ενδοεγχειρητική αναισθησία ενώ η συγκέντρωση 0,2% (ή 2 mg/mL) είναι προτιμότερη για την μετεγχειρητική αναλγησία, είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με άλλα οπιοειδή ή με κλονιδίνη (Eledjam, Ripart and Viel, 2001). Ακόμα ασκεί πολύ καλή μετεγχειρητική αναλγησία μετά από επισκληρίδιες και περιφερικές περινευρικές ενέσεις, με χρήση ενέσεων μιας έγχυσης και συνεχούς έγχυσης. Ο διαφορικός αισθητικός και κινητικός αποκλεισμός είναι φανερός μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0,2% ή λιγότερο).

Πρόσφατες μελέτες επικεντρώνονται στην χρήση της ροπιβακαΐνης για περιφερικούς αποκλεισμούς των κάτω άκρων, όπως οι αποκλεισμοί του ισχιακού και του μηριαίου νεύρου. Το πρωταρχικό πλεονέκτημα της ροπιβακαΐνης είναι η χαμηλή τοξικότητά της, κυρίως η καρδιοτοξικότητα, που προκύπτει από ενδοαγγειακή ένεση κατά λάθος. Αυτός ο υψηλός θεραπευτικός δείκτης της οδηγεί σε βελτιωμένο προφίλ ασφάλειας σε σύγκριση με άλλα ισχυρά τοπικά αναισθητικά όπως η ρακεμική βουπιβακαΐνη (Eledjam, Ripart and Viel, 2001).

Η δράση της ροπιβακαΐνης μόνη της και σε συνδυασμό με άλλα αναισθητικά και αναλγητικά, **στο ισχιακό νεύρο ασθενών**, όπως αναφέρθηκε, έχει μελετηθεί σε διάφορες εργασίες. Αρχικά σε μια έρευνα μελετήθηκε ο συνεχής αποκλεισμός του ιγνυακού ισχιακού νεύρου από τη ροπιβακαΐνη και προέκυψε ότι η συγκέντρωση και

ο όγκος του τοπικού αναισθητικού επηρέασε τα χαρακτηριστικά του αποκλεισμού. Δηλαδή, η αναισθησία στα άκρα ήταν πολύ πιο συνηθισμένη όταν οι όγκοι σχετικά αραιωμένης ροπιβακαΐνης, ήταν μεγαλύτεροι. Εντούτοις, κατά τη διάρκεια συνεχούς αποκλεισμού του ισχιακού νεύρου στο ιγνυακό βοθρίο, ένα σχετικά πυκνό διάλυμα αναισθητικού σε μικρότερο όγκο φαίνεται ότι είναι προτιμότερο (Ilfeld et al, 2008).

Επίσης, σε άλλη μελέτη έγινε σύγκριση μετεγχειρητικής αναλγητικής ικανότητας και έκτασης αισθητικού και κινητικού αποκλεισμού από τη χορήγηση λεβοβουπιβακαΐνης, ροπιβακαΐνης και βουπιβακαΐνης στον συνδυασμό «αποκλεισμού διαμερίσματος ψοΐτη και ισχιακού νεύρου» (psoas compartment–sciatic nerve block ή PCSNB) για πλήρη αρθροπλαστική ισχίου (γοφού). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και τα τρία τοπικά αναισθητικά ήταν ισοδύναμα αποτελεσματικά στο PCSNB σε ασθενείς που υπέστησαν πλήρη αρθροπλαστική ισχίου. Ένας υπολειμματικός πόνος που μπορεί να παρατηρηθεί οφείλεται πιθανόν στην απώλεια αισθητικού αποκλεισμού στον δερματόμο L1, έτσι προτείνεται μια τροποποίηση της τεχνικής αυτής για αυτού του τύπου τη χειρουργική επέμβαση (de Leeuw, 2008).

Σε άλλη μία έρευνα έγινε σύγκριση των επιδράσεων της βουπιβακαΐνης (0,5%) και της ροπιβακαΐνης (0,75%) μόνο ή σε διάλυμα ανάμειξης με ίσους όγκους βουπιβακαΐνης (0,5%) και λιδοκαΐνης (2%) ή ροπιβακαΐνης (0,75%) και λιδοκαΐνης (2%) για εγχείρηση μετά από αποκλεισμό μηριαίου και ισχιακού περιφερικού νεύρου. Τα μείγματα των τοπικών αναισθητικών μακράς διάρκειας με την λιδοκαΐνη επάγουν γρήγορους αποκλεισμούς έναρξης με μειωμένη διάρκεια. Εντούτοις δεν είναι ξεκάθαρο αν υπάρχει πλεονέκτημα ασφάλειας, αφού το πλεονέκτημα την μειωμένης συγκέντρωσης των αναισθητικών μακράς διάρκειας μπορεί να αντισταθμίζεται από την παρουσία σημαντικής συγκέντρωσης λιδοκαΐνης στο πλάσμα (Cuvillon , et al 2009).

Άλλη μια μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς που υπέστησαν ανασυγκρότηση πρόσθιων χιαστών συνδέσμων με επιγονατιδικό τένοντα, υπό αναισθησία αποκλεισμού μηριαίου και ισχιακού νεύρου με χορήγηση ροπιβακαΐνης μόνη της και σε συνδυασμό με κλονιδίνη. Στην έρευνα αυτή έγινε σύγκριση μεταξύ συνεχούς μηριαίου νευρικού αποκλεισμού και συνεχών τοπικών εγχύσεων σε πληγές και ενδοαρθρικά. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο συνεχής μηριαίος νευρικός αποκλεισμός παρέχει καλύτερη αναλγησία από αυτή των συνεχών εγχύσεων στην πληγή του επιγονατιδικού τένοντα και ενδοαρθρικά μετά από αυτού του τύπου την χειρουργική επέμβαση (Dauri, et al 2009).

Η δράση της ροπιβακαΐνης έχει επίσης μελετηθεί και στο **ισχιακό νεύρο του βατράχου**. Αρχικά, σε μια μελέτη συγκρίθηκε η επίδραση της ροπιβακαΐνης με αυτή της βουπιβακαΐνης στο ισχιακό νεύρο του βατράχου σε συγκεντρώσεις από  $10^{-9}$  έως και  $10^{-3}$  M και για χρονικές περιόδους 5, 10 και 15 λεπτά. Και τα δύο τοπικά αναισθητικά μείωσαν σημαντικά τις παραμέτρους του συνδυασμένου δυναμικού δράσης με δοσοεξαρτώμενο και αναστρέψιμο τρόπο. Όταν ο χρόνος (15 λεπτά) και η δόση ( $10^{-3}$  M) έκθεσης ήταν υψηλότερα τότε υπήρξαν και οι διαφορές ανάμεσα στα δύο τοπικά αναισθητικά. Η ροπιβακαΐνη ήταν πιο ταχεία και πιο ισχυρή στον αποκλεισμό της αγωγιμότητας υπό αυτές τις συνθήκες, ενώ η βουπιβακαΐνη είναι αποτελεσματική στην ομάδα των νευρικών ιών με σχετικά χαμηλότερη ταχύτητα αγωγιμότητας για όλες τις δόσεις και τις χρονικές περιόδους που μετρήθηκαν (Bariskaner et al, 2007). Τέλος σε μια άλλη έρευνα στην οποία μελετήθηκε κυρίως η επίδραση του αναλγητικού τραμαδόλη (tramadol), φαίνεται και η επίδραση της ροπιβακαΐνης στο ισχιακό νεύρο βατράχου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα 0,2 mM ροπιβακαΐνης μείωσαν με αναστρέψιμο τρόπο το ύψος της κορυφής του «σύνθετου δυναμικού ενέργειας» (compound action potential) και αύξησαν τον χρόνο «διάρκειας της μισής κορυφής» (half-peak duration) στα 20 λεπτά. Επίσης η επίδραση του αναισθητικού στο ύψος του «σύνθετου δυναμικού ενέργειας» είναι εξαρτώμενη από την συγκέντρωση με  $IC_{50} = 0,34$  mM, ενώ σε συγκέντρωση 1 mM το «σύνθετο δυναμικό ενέργειας» αναστέλλεται εντελώς (Katsuki et al, 2006).

## **IV. Ψευδάργυρος(Zn)**

### **1.Βαρέα μέταλλα και Zn**

Είναι γνωστό ότι τα βαρέα μέταλλα ασκούν τοξικές δράσεις στα διάφορα βιολογικά συστήματα (Nordberg, 1984, Revis, 1978). Επιπρόσθετα, εξαιτίας του μεγάλου χρόνου ημιζωής τους, τα βαρέα μέταλλα επάγουν φαινόμενα συσσώρευσης, τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν εκθετική αύξηση της συγκέντρωσής τους στο αίμα και τους ιστούς. Εκτός από τις καρκινογόνες επιδράσεις των ενώσεων αυτών ή την συμμετοχή τους σε χρόνιες αναπνευστικές παθήσεις, πολλά από αυτά έχουν δράσεις ισχυρών νευροτοξινών. Τα μέταλλα βρίσκονται φυσιολογικά στο περιβάλλον, αλλά



μετά τη βιομηχανική επανάσταση, η κατανομή και η διαθεσιμότητά τους στα βιολογικά συστήματα έχουν αυξηθεί σημαντικά (Hopkin, 1989). Υπάρχουν πολλές ανθρωπογενείς πηγές ρύπανσης από μέταλλα, όπως τα μεταλλεία, οι τεχνικές εξαγωγής (π.χ. τήξη) των μετάλλων, τα οχήματα και τα φυσικά καύσιμα και συγκεκριμένες γεωργικές διεργασίες (Soon, 1981, Hopkin, 1989, Gummow et al., 1991).

## **2.Χημικές ιδιότητες ψευδαργύρου**

Ο ψευδάργυρος είναι μέταλλο μετάπτωσης της ομάδας IIB των στοιχείων του περιοδικού πίνακα, το 27<sup>ο</sup> μέταλλο στη σειρά, όσον αφορά την αφθονία, στο φλοιό της γης και το πιο άφθονο ιχνοστοιχείο στο ανθρώπινο σώμα, απαραίτητο για τους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς.

Ο Zn δεν είναι τοξικός (Bertholf R.L. 1988) καθώς η είσοδος, η διανομή και η έκκριση του από τα κύτταρα και τους ιστούς είναι ομοιοστατικά ελεγχόμενες και δεν είναι γνωστές διαταραχές που να συνδέονται με την υπερβολική του συσσώρευση, σε αντίθεση με τον σίδηρο, τον χαλκό και άλλα μέταλλα. Πραγματοποιεί σταθερούς δεσμούς με τα μόρια και ταυτόχρονα η στερεοχημική ευελιξία του τον κάνει ευπροσάρμοστο στις ανάγκες των πρωτεϊνών και των ένζυμων (Vallee B.L. and D.S. Auld. 1989, Vallee B.L. and D.S. Auld. *Biochemistry* 1990, and Vallee B.L. and D.S. Auld *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες δεν υφίσταται αναγωγή ή οξείδωση και αυτό τον καθιστά ιδιαίτερα σταθερό σε βιολογικά περιβάλλοντα. Ο Zn δεν συναντάται ελεύθερος στους οργανισμούς. Η στερεοχημική του προσαρμοστικότητα οδηγεί σε πολλαπλά γεωμετρικά σχήματα, τα οποία αριθμούν από το 2 έως το 8 δηλ. τετράπλευρα, τριγωνικά, οκτάεδρα, πυραμίδες (Cotton F.A. and G. Wilkinson 1988) από αυτά τα 4, 5 και 6, είναι αυτά που πιο συχνά παρατηρούνται στις βιολογικές λειτουργίες του ψευδαργύρου.

### 3.Μεταλλοπρωτεΐνες και Ψευδαργυροπρωτεΐνες

Ο ψευδάργυρος αποτελεί συμπαράγοντα για περισσότερα από 300 ένζυμα και μεταλλοπρωτεΐνες. Αυτές οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον ψευδάργυρο παίζουν σημαντικούς ρόλους στη μιτωτική κυτταρική διαίρεση, στην πρωτεϊνική σύνθεση, στη σύνθεση του DNA και του RNA κ.τ.λ.

Τα μέταλλα συνδέονται με τις πρωτεΐνες με σταθερούς (μεταλλοπρωτεΐνες) ή χαλαρούς δεσμούς (μεταλλοπρωτεϊνικά σύμπλοκα).

(I) Τα ένζυμα που περιέχουν μέταλλα ονομάζονται μεταλλοένζυμα. Ο ψευδάργυρος εμφανίζει τρεις δράσεις στα ψευδαργυρικά ένζυμα (Vallee B.L. and D.S. Auld 1992):

α) καταλυτική δράση. Το μέταλλο δρα απευθείας στην ενζυμική κατάλυση και απόδειξη για αυτό είναι ότι εάν απομακρυνθεί, τα ένζυμα γίνονται αδρανή.

β) δράση συμπαράγοντα. Αυτή η δράση του ψευδαργύρου αλλάζει την καταλυτική δράση του ενζύμου όταν το άτομο ψευδαργύρου συνδεθεί σε κάποια άλλη θέση στο ίδιο το ένζυμο.

γ) δομική δράση. Τα δομικά άτομα ψευδαργύρου είναι απαραίτητα για τη σταθερότητα της δομής των πρωτεϊνών.

(II) Άλλες μεταλλοπρωτεΐνες είναι οι μέταλλοθειονίνες. Είναι πρωτεΐνες συνδεδεμένες με μέταλλα όπως ο ψευδάργυρος, το κάδμιο και σε μερικές περιπτώσεις χαλκός, σίδηρος ή υδράργυρος. Οι μεταλλοθειονίνες θεωρείται ότι παίρνουν μέρος στην αποτοξίνωση των οργανισμών από τα βαρέα μέταλλα, σταθεροποιούν τις μεμβράνες και ρυθμίζουν το μεταβολισμό του ψευδαργύρου και του χαλκού (Geller B.L. and D.R. 1982, Kagi J.H.R. and A Schaffer 1988, Kagi J.H.R. and B.L. Vallee 1960, Kagi J.H.R. and B.L. Vallee 1961, Krezoski S.K. et al 1988, Thomas J.P. et al 1986, Thornally P.J., and H. Vasak 1985, Udom A.O. and F.O. Brady 1980, Vallee B.L. 1978, and Vallee B.L. 1987). Λειτουργούν δηλ. ως ρυθμιστικά συστήματα.

(III) Επίσης πολλές νουκλεοπρωτεΐνες οι οποίες παίρνουν μέρος στην αντιγραφή και μεταγραφή του DNA περιέχουν λειτουργικά άτομα ψευδαργύρου (Hanas J.S. et al 1983, Shang Z. et al 1989, Miller J. et al 1985, Freedman L.P. et al 1988, Hollrnberg, S.M. et al 1987, Schwabe J.W.R. et al 1990, Pan T. and J.E. Coleman 1989, Pan T. and J.E. Coleman 1990, and Gibson T.J. et al 1988). Πολλές πρωτεΐνες ιών, βακτηριών, θηλαστικών που λαμβάνουν μέρος στην αντιγραφή, έχει αποδειχθεί ότι περιέχουν, στις θέσεις σύνδεσης με το DNA, συνήθως τέσσερις ή περισσότερες

κυστεΐνες και/ή ιστιδίνες οι οποίες είναι αμινοξέα δέσμευσης μετάλλων (Berg J.M. 1986, Klug A., and D. Rhodes 1987, and Sunderman F.W. Jr. and A.M. Barber. 1988).

#### **4.Φυσιολογικός ρόλος ψευδαργύρου (Zn)**

Ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητος για την ομαλή ανάπτυξη και την υγεία των οργανισμών. Το 1961, οι Prasad et al. πρώτοι ανέφεραν ότι η ανεπάρκεια του ψευδαργύρου προκαλούσε νανισμό και καθυστέρηση της φυσικής και φυλετικής ανάπτυξης στον άνθρωπο (Prasad et al., 1961).

Το ανθρώπινο σώμα περιέχει περίπου 2 gr ψευδαργύρου ο οποίος είναι κατανομημένος κυρίως στο αίμα, τα νεφρά, το ήπαρ, τα οστά και τον εγκέφαλο

Το 30-40% του ολικού ψευδαργύρου βρίσκεται στους πυρήνες, περίπου 50% στο κυτταρόπλασμα και στα οργανίδια, και το υπόλοιπο στην κυτταρική μεμβράνη(Smeyers-Verbeke J. et al 1977, Thiers R.E. and B.L. Vallee 1957). Στα κύτταρα ο ψευδάργυρος είναι με τη μορφή ψευδαργυρικών πρωτεϊνών και ένζυμων, μεταλλοθειονινών ή νουκλεοτιδίων RNA και DNA.

Απαραίτητη είναι επίσης η ύπαρξη ομοιοστατικών μηχανισμών που ρυθμίζουν την απορρόφηση, την κυτταρική πρόσληψη, την κατανομή στα μεσοκυττάρια διαμερίσματα και την έκκριση του ψευδαργύρου. Έτσι παραμένουν λειτουργικά σταθερές οι ψευδαργυρικές πρωτεΐνες και τα ένζυμα που αναφέρθηκαν πιο πάνω και τα οποία συμμετέχουν στη δομή των μεμβρανών των ερυθροκυττάρων και των αιμοπεταλίων (Bettger W.J. and B.L. O'Dell 1981, Chvapil M. et al 1975., Ludwig J.C. and M. Chvapil 1981), σε πολλά στάδια του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων (Cunnane S.C. 1988), και στη μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας (Vallee B.L. and K.H. Falchuk 1981).

Σήμερα είναι γνωστό ότι η έλλειψη ψευδαργύρου εξασθενεί το ανοσοποιητικό σύστημα, προκαλεί επιβράδυνση ή/και αναστολή της σωματικής ανάπτυξη και της ωρίμανσης του αναπαραγωγικού συστήματος, επιδρά αρνητικά στην παραγωγή του σπέρματος, επηρεάζει αρνητικά την δομή και τις λειτουργίες του δέρματος και των εξαρτημάτων του, οδηγεί σε δυσλειτουργία της οσφρητικής και γευστικής αίσθησης, διαταράσσει την οπτική λειτουργία καθώς και την λειτουργία του νευρικού συστήματος γενικότερα (Hambridge, 2000).

## 5.Νευρικό σύστημα και Zn

Μια σημαντική ποσότητα ψευδαργύρου συγκεντρώνεται στον εγκέφαλο, ιδιαίτερα στον υπόκαμπο, την αμυγδαλή, τον εγκεφαλικό φλοιό, τον οσφρητικό φλοιό και τον οφθαλμό.

Η ποσότητα ψευδαργύρου σε ορισμένους οφθαλμικούς ιστούς είναι υψηλή καθώς συμμετέχει στη δομή πολλών ψευδαργυρικών ένζυμων. Κατά την εκφύλιση της ωχρής κηλίδας που παρατηρείται στους ηλικιωμένους, εμφανίζονται ανωμαλίες στο μελάγχρουν επιθήλιο και την μελανίνη, την πλούσια σε ψευδάργυρο χρωστική ουσία του αμφιβληστροειδούς. Στα ανθρώπινα μάτια παρατηρείται μια εξαρτώμενη με την ηλικία μείωση της δράσης ενός ψευδαργυρικού μεταλλοενζύμου της α-μανοσιδάσης που θεωρείται ότι παίζει ρόλο στην παθογένεια της εκφύλισης της ωχρής κηλίδας και ο ψευδάργυρος χρησιμοποιείται για την προστασία και τη θεραπεία της (Wysynski R.E. et al 1989). Η νυχτερινή τύφλωση, ανθεκτική στη VitA, που συνοδεύει την μεταλλοκοιλιακή κίρρωση, συσχετίζεται με μείωση της περιεκτικότητας του μετάλλου στο πλάσμα (Morrison S.A. et al 1976, Patek A.J. and C. Haig 1939, Vallee B.L. et al 1957, Vallee B.L. 1956).

Τα υψηλότερα ποσοστά Zn βρίσκονται στις βρυώδεις ίνες του υποκάμπου και στον φλοιό του εγκεφάλου και μάλιστα κυρίως στις προσυναπτικές απολήξεις των αμύελων αξόνων οι οποίοι συνάπτονται με τα πυραμιδικά κύτταρα (Blackstad T.W. and A. Kjaerheim 1961, Crawford I.L 1983, Hamlyn L.H. 1962). Η περιεκτικότητα του μετάλλου στον ανθρώπινο εγκέφαλο αυξάνεται από τη γέννηση μέχρι και τα πέντε πρώτα χρόνια της ζωής (Volkl A. et al 1974). Το 25% του ψευδαργύρου που υπάρχει στο κυτόπλασμα των ινών είναι διαλυτός και είναι χαλαρά δεσμευμένος (Hanig R.C. and M.H. Aprison 1967, Donaldson J. et al 1973) και αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η περιεκτικότητα του μετάλλου στις διαφορετικές περιοχές μεταβάλλεται με το χρόνο.

Το συνολικό ποσό του ψευδαργύρου στον υπόκαμπο υπολογίζεται στα 70-90 ppm (ξηρό βάρος) (Frederickson, 1989). Παρόλο που κάποια ποσότητα του μετάλλου στον εγκέφαλο συνδέεται σταθερά με μεταλλοπρωτεΐνες ή ένζυμα, μια σημαντική ποσότητα ψευδαργύρου (περίπου 10% ή περισσότερο) δημιουργεί ελεύθερα ιόντα ψευδαργύρου ( $Zn^{+2}$ ) ή συνδέεται χαλαρά και ανιχνεύεται με ειδική χρώση και την χρήση χηλοποιητικών παραγόντων. Ο ψευδάργυρος που μπορεί να χηλοποιηθεί αποθηκεύεται σε προσυναπτικά κυστίδια συγκεκριμένων διεγερτικών νευρώνων και

εκκρίνεται από τα κυστίδια στις συναπτικές σχισμές μαζί με τον διεγερτικό νευροδιαβιβαστή γλουταμινικό οξύ κατά τη διάρκεια της νευρικής διέγερσης (Frederickson et al., 2000). Η συγκέντρωσή του Zn υπολογίζεται στα 300μM (Frederickson, et al., 1983).

Μια από τις δράσεις του ψευδαργύρου στις νευρικές λειτουργίες είναι η αναστολή της δέσμευσης των πεπτιδίων και άλλων αγωνιστών στους νευροϋποδοχείς. Το μέταλλο μπορεί να δεσμευτεί μη ειδικά σε πολλά αμινοξέα, εκτός από τα ήδη γνωστά που δεσμεύουν ειδικά τον ψευδάργυρο, σε ένζυμα και πρωτεΐνες.

Ο ψευδάργυρος αναστέλλει τη σύνδεση των αγωνιστών σε κάθε μία από τις διάφορες τάξεις των υποδοχέων των οπιοειδών μ, δ, ε, κ και σε διαφορετικό βαθμό για κάθε έναν από αυτούς. Έτσι οι φυσιολογικές συγκεντρώσεις του μετάλλου αναστέλλουν τη δέσμευση ενός αριθμού αγωνιστών των οπιοειδών στους τύπου μ-υποδοχείς αλλά έχει μικρή δράση στους δ. Έχει αποδειχτεί επίσης ότι δρα στους μουσκαρινικούς ακετυλοχολινεργικούς υποδοχείς στον εγκέφαλο ποντικών. Αυτοί οι υποδοχείς βρίσκονται στον εγκεφαλικό φλοιό και τον υπόκαμπο (Nukima I. 1983) περιοχές υψηλής συγκέντρωσης σε ψευδάργυρο (Donaldson J. et al 1973). Ο ψευδάργυρος είναι δραστηριός ρυθμιστής της δέσμευσης αμινοξέων στους υποδοχείς που παίρνουν μέρος στην νευροδιαβίβαση. Αντιθέτως αναστέλλει την σύνδεση ανάμεσα στο γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και στους υποδοχείς μυών (lobster), καταστέλλοντας τον GABA, και προκαλώντας με αυτό τον τρόπο αύξηση της αγωγιμότητας. Το GABA το οποίο προκαλεί ρεύμα χλωρίου στους νευρώνες των γαγγλίων των οπίσθιων ριζών του βατράχου αποκλείεται από τον ψευδάργυρο, αλλά επίσης από το κάδμιο, κοβάλτιο, χαλκό, μαγνήσιο, και νικέλιο. Ο ψευδάργυρος επίσης θεωρείται ουσιώδης για τη σύνθεση πρωτεϊνών απαραίτητων για το σχηματισμό του GABA και άλλων νευροδιαβιβαστών όπως είναι η πυριδοξάλη-5-φωσφατάση (Ebadi M. et al 1990, Ebadi M. et al 1987). Αναστέλλει την N-μεθυλική-D-ασπαρτάση, ένα σημαντικό ρυθμιστή της συναπτικής διαβίβασης στο ΚΝΣ.

Παρά την αφθονία του, ο φυσιολογικός ρόλος του ψευδαργύρου που απελευθερώνεται στις συνάψεις δεν έχει ακόμα καθοριστεί με ακρίβεια. Έχει αναφερθεί ότι ο ψευδάργυρος αλλάζει τη συμπεριφορά διαφόρων υποδοχέων ή ιοντικών καναλιών, συμπεριλαμβανομένων των γλουταμινικών τύπου N-methyl-D-aspartate (NMDA) υποδοχέων, των υποδοχέων γ-αμινοβουτυρικού οξέος A (GABAA), υποδοχέων γλυκίνης, ακετυλοχολίνης, διαύλων ATP και τασσεοελεγχόμενων καναλιών Ca<sup>2+</sup> και διαύλων K<sup>+</sup> (Frederickson et al., 2000). Η πιο

καθιερωμένη επίδραση του ψευδαργύρου είναι η ρύθμιση της μετασυναπτικής διεγερσιμότητας δια μέσου της παρεμπόδισης του NMDA-τύπου του γλουταμινικού υποδοχέα (Westbrook και Mayer, 1987). Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο ψευδάργυρος απελευθερώνεται, ανάλογα με τη δραστηριότητα, από τις βρυώδεις ίνες στον υπόκαμπο, και ρυθμίζει τη δράση των νευρικών κυκλωμάτων ως διαμεσολαβητής των νευρικών σημάτων και της συναπτικής πλαστικότητας (Ueno et al., 2002). Αφαίρεση αυτού του συναπτικού ψευδαργύρου, με την βοήθεια χηλοποιητή , προκαλούσε υπερδιέγερση στους νευρώνες του υπόκαμπου του αρουραίου (Blasco-Ibanez et al., 2004). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητος για τις φυσιολογικές εγκεφαλικές λειτουργίες. Είναι αξιοσημείωτο ότι η έλλειψη του μετάλλου αυτού κατά τη διάρκεια των πρώιμων σταδίων της ανάπτυξης του ανθρώπου και των ζώων προκαλεί βλάβες στον εγκέφαλο και εξασθενίζει τις διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης (Bhatnagar και Taneja, 2001).

Παρόλα αυτά και την υψηλή βιοφυσιολογική του σημασία , πρόσφατες έρευνες αποκάλυψαν ότι ο υπερβολικός ψευδάργυρος που απελευθερώνεται σε παθολογικές καταστάσεις, είναι τοξικός στο κεντρικό νευρικό σύστημα και έχει εξεταστεί η σχέση μεταξύ του ψευδαργύρου και του θανάτου των νευρώνων μετά από μια τραυματική ισχαιμία του εγκεφάλου. Επιπρόσθετα, η αποδιοργάνωση της ομοιόστασης του ψευδαργύρου πιστεύεται ότι ενέχεται σε διάφορες εκφυλιστικές ασθένειες συμπεριλαμβανομένης της νόσου Alzheimer (AD) (Huang, Cuajungco et al., 2000, Kawahara et al., 1997), της ασθένειας των prion (Watt και Hooper, 2003), της αμυοτροφικής πλευρικής σκλήρυνσης (ALS) (Valentine και Hart, 2003), και της ασθένειας Wilson (Brewer, 2000).

## **6.Μηχανισμός νευροτοξικότητας του ψευδαργύρου**

Για να διασαφηνιστούν τα μοριακά μονοπάτια που εμπλέκονται στον επαγόμενο από ψευδάργυρο κυτταρικό θάνατο κυττάρων GT1-7 έγινε προχορήγηση ποικίλων φαρμακευτικών ενώσεων και παρατηρήθηκαν οι αλλαγές στη βιωσιμότητα μετά την έκθεση σε ψευδάργυρο. Μεταξύ των ενώσεων που ελέγχθηκαν συμπεριλαμβανομένων αγωνιστών ή ανταγωνιστών νευροδιαβιβαστών, αναστολέων διαύλων κ.τ.λ., βρέθηκε ότι η χορήγηση πυροσταφυλικού νατρίου παρεμπόδισε

σημαντικά τον επαγόμενο από ψευδάργυρο κυτταρικό θάνατο των GT1- 7 κυττάρων (Kawahara, Kato-Negishi, και Kuroda, 2002). Οι Shelline et al. αναφέρουν ότι ο ψευδάργυρος παρεμπόδιζε την γλυκεραλδεϋδη-3-φωσφορική αφυδρογονάση (gluceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase -GAPD) και ότι το πυροσταφυλικό, ως ενεργειακό υπόστρωμα εξασθένιζε τον επαγόμενο από ψευδάργυρο θάνατο των νευρώνων του φλοιού σε καλλιέργεια (Sheline, Behrens και Choi, 2000). Συνεπώς, είναι πιθανό ότι ο μηχανισμός της τοξικότητας του ψευδαργύρου και στα GT1-7 κύτταρα βασίζεται στην πτώση της παραγόμενης ενέργειας και στην αναστολή της γλυκόλυσης.

Συμπερασματικά, στόχο του ψευδαργύρου αποτελούν διάφορα ένζυμα και ιδιαίτερα τα αναπνευστικά ένζυμα των μιτοχονδρίων, των οποίων παρεμποδίζει τη δράση (Brown et al., 2000). Με τον τρόπο αυτό ο ψευδάργυρος προκαλεί μείωση της παραγόμενης ενέργειας (Sheline et al., 2000).

Ο ψευδάργυρος προκαλεί επίσης αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ασβεστίου του νεύρου στόχου. Τα αυξημένα επίπεδα ασβεστίου αποτελούν έναυσμα διαφόρων αποπτωτικών μονοπατιών, όπως την ενεργοποίηση της καλπαΐνης, την ενεργοποίηση των κασπασών και άλλων ενζυματικών μονοπατιών, που σχετίζονται με την απόπτωση, τα οποία οδηγούν στο νευρωνικό θάνατο (Konoha et al., 2005).

## **IV. Ισχιακό νεύρο βατράχου**

### **1.Στοιχεία βιολογίας του βατράχου**

Οι βάτραχοι είναι ιστορικά δημοφιλή πειραματόζωα στις μελέτες εμβρυολογίας , φυσιολογίας και νευροβιολογίας και πρόσφατα στις μελέτες οικολογίας και εξελικτικής βιολογίας. Ανήκουν στην τάξη των Άνυρων που διαθέτει άνω των 3.400 ειδών βατράχων. Τα περισσότερα γένη ,το πλέον τυπικό των οποίων είναι το γένος *Rana*, έχουν πολύπλοκους κύκλους ζωής , όπου η εξωτερική γονιμοποίηση οδηγεί στην ανάπτυξη υδρόβιων εμβρύων και λαρβών που μεταμορφώνονται σε υδρόβια, ημιυδρόβια ή χερσαία ενήλικα άτομα. Τα περισσότερα είδη είναι νυκτόβια και θηρευτές ασπόνδυλων οργανισμών.Το δέρμα τους είναι ημιδιαπερατό και η παρουσία νερού ή υγρασίας είναι απαραίτητα για την επιβίωση τους. Επειδή είναι

ποικιλόθερμα ζώα και σε συνεχή κίνδυνο αφυδάτωσης βασίζονται σε συμπεριφορικούς μηχανισμούς αντίδρασης προς τις μεταβολές του περιβάλλοντος. Η μετακίνησή τους βασίζεται κυρίως στα οπίσθια άκρα που διαθέτουν ισχυρούς μύες νευρούμενους από μακρά και εξαιρετικά διακριτά ανατομικά ισχιακά νεύρα.



## **2.Zn και ισχιακό νεύρο βατράχου**

Ο Ζn σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι απαραίτητος για την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση (Vallee and Falchuk, 1993; Schmidt and Beyersmann, 1999). Επίσης διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο έναντι της απόπτωσης *in vivo* και *in vitro* (Sundermann, 1995, Kontargyris 2008,2009). Έχει δειχθεί επίσης ότι χαμηλές συγκεντρώσεις Ζn είναι σημαντικές για την νευροδιαβίβαση (Smart et al., 2004). Εντούτοις ο Ζn έχει αποδειχθεί νευροτοξικός για το ΚΝΣ των θηλαστικών. (Araki et al., 1987; Wallwork, 1987; Heano and Gutierrez-Merino, 1989; Koizumi et al., 1995; Choi and Koh, 1998; Kim et al., 2001; Bao et al., 2006; Wang et al., 2006). Παρά τις δραστικές του όμως επιπτώσεις στο ΚΝΣ δεν υπάρχουν ενδείξεις νευροτοξικών επιδράσεων στο περιφερικό νευρικό σύστημα και στην πραγματικότητα ο Ζn απαντάται στην μυελίνη του ισχιακού νεύρου αρουραίου σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από ότι τα άλλα ιχνοστοιχεία. (Bouffe et al., 1987) και φαίνεται πως ενισχύει την πάκτωση της μυελίνης πάνω στο περιφερικό νευρικό σύστημα (Inouye and Kirschner, 1984), μια εξειδικευμένη σύνδεση που έχει περιγραφεί από τους Riccio et al., 1995.

Μορφολογικές μεταβολές που προκλήθηκαν από την έλλειψη Ζn παρατηρήθηκαν σε στο ισχιακό νεύρο πειραματοζώων (αρουραίων) όπου τόσο η επιφάνεια διατομής



του νεύρου όσο και ο αριθμός των εμύελων αξόνων είναι μειωμένος κατά 20% και 29% αντίστοιχα , σε σύγκριση με τους μάρτυρες .Η συσχέτιση δε μεταξύ της επιφάνειας διατομής και του αριθμού των εμύελων αξόνων ήταν σημαντική. Τα μορφολογικά ευρήματα ήταν ιδιαίτερα εμφανή στην πειραματική ομάδα με έλλειψη Zn . Στο μικροσκόπιο φωτός φαινόταν νευρικά δεμάτια κατεστραμμένα με ανώμαλο σχήμα και εκφύλιση του ελύτρου της μυελίνης ενώ στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φαινόταν χαρακτηριστικά εκτεταμένη βλάβη της μυελίνης. (Bunyami etal,2005)

Η Μόσχου Μ, 2006 αναφέρει ότι σε συγκέντρωση ψευδαργύρου 500  $\mu\text{M}$  παρατηρείται μια ισχυρή επίδραση στη βιωσιμότητα των ισχιακών νεύρων αρουραίου χωρίς περινεύριο, με ένα  $\text{IT}_{50\text{Zn}}$  στις  $4.82 \pm 0.57 \text{ h}$  , σε συγκέντρωση των 250  $\mu\text{M}$  η επίδραση στη βιωσιμότητα ήταν ηπιότερη, με ένα  $\text{IT}_{50\text{Zn}}$  στις  $13.04 \pm 0.49 \text{ h}$  Τέλος η συγκέντρωση των 100  $\mu\text{M}$  είχε τη μικρότερη επίδραση στη βιωσιμότητα των νεύρων, με  $\text{IT}_{50\text{Zn}}$  στις  $16.81 \pm 0.79 \text{ h}$  , όμως ο χρόνος αυτός διέφερε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ( $P < 0.05$ ) από το  $\text{IT}_{50\text{Ctr}}$ , όπως και τα  $\text{IT}_{50\text{Zn}}$  των προηγούμενων συγκεντρώσεων ενώ έκθεση σε 50 $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  διατήρησε το  $\text{IT}_{50\text{Zn}}$  στις  $21.2 \pm 0.26 \text{ h}$ , ένα χρόνο παρόμοιο με αυτό του μάρτυρα.(Μόσχου Μ 2006)

Ο Zn έχει πρόσφατα δειχθεί ότι ανακουφίζει από την φλεγμονώδη υπεραλγησία. Σε ποντίκια με βλάβη του ισχιακού νεύρου η χορήγηση χλωριούχου Zn ενδοραχιαία, ενδοπελματιαία ή συστηματικά ανακούφισε από την θερμουπεραλγησία δοσοεξαρτώμενα αλλά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ανάλογα με την οδό χορήγησης ( i.p. injections ( $\text{ED}_{50} = 13.6 \text{ nmol}$ ), intrathecal ( $\text{ED}_{50} = 0.05 \text{ nmol}$ ) , intraplantar injections ( $\text{ED}_{50} = 0.3 \text{ nmol}$ ) Η χορήγηση του Zn ενδοραχιαία ή ενδοπελματιαία δεν επηρέασε την αντίληψη της θερμαλγησίας σε φυσιολογικά ποντίκια χωρίς βλάβη του ισχιακού και τα παραπάνω ευρήματα αποτελούν τις πρώτες ενδείξεις του ότι ο Zn ανακουφίζει από την νευροπαθητική υπεραλγησία.(Liu etal.,1999)

## **B. Υλικά και Μέθοδοι**

### **1.Υλικά**

#### **1.1 Αναλώσιμα**

Διπολικά Ηλεκτρόδια

Ναΐλον κλωστές

Ακρυλικός θάλαμος φόρτωσης νεύρου (chamber)

Χειρουργικά γάντια

Διάλειμμα Ringer's για αμφίβια

Σετ εργαλείων ανατομίας

Οβίδες TEFLON πέψης

Ropivacaine 2mg/ml (Naropin , Astra Zeneca)

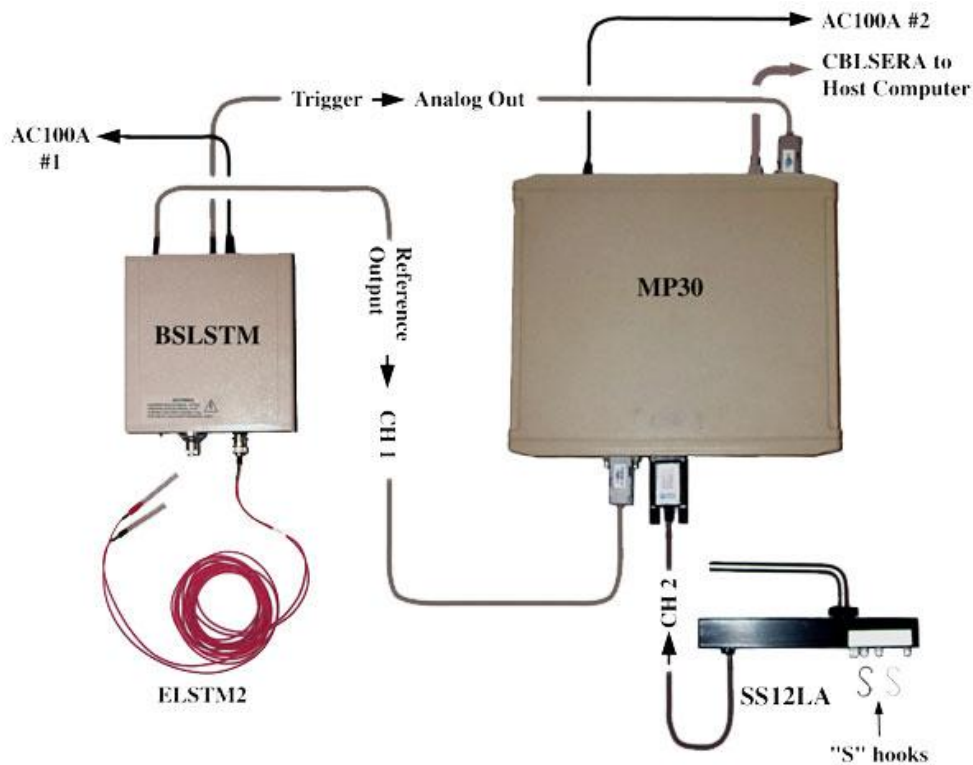
Νιτρικό Οξύ 69% , ελεύθερο μετάλλων (Fluca)

Υπεροξείδιο του υδρογόνου 30% ( Fluca )

Δ/μα αζωτούχου ψευδαργύρου (Spectrosol)

#### **1.2 Συσκευές**

- Φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης Perkin-Elmer , εξοπλισμένο με φούρνους FAAS 560 και HGA 400.
- Παλμογράφος BSLPRO ,BIOPAC Systems και BSLSTM Stimulator συνδεδεμένος με υπολογιστή.



## 2.Μέθοδοι

### 1.Προετοιμασία του ισχιακού νεύρου βατράχου

Καταστροφή του νωτιαίου μυελού του βατράχου με έμπηξη βελόνας στο νωτιαίο σωλήνα. Απομάκρυνση του δέρματος από το σώμα κατόπιν πλήρους κοπής του δέρματος γύρω από το σώμα, στη μέση του κορμού. Έτσι ξεχωρίζει το “παντελόνι” από τη “ζακέτα”. Το “παντελόνι” με ένα κομμάτι διηθητικό χαρτιού απομακρύνεται μαλακά ώστε να βγει το δέρμα από τα άκρα του βατράχου. Δεν πρέπει το δέρμα να έρθει σε επαφή με τα εσωτερικά όργανα.

Ο βάτραχος τοποθετείται στην ανατομική βάση με τη ράχη προς τα πάνω και στερεώνονται τα πόδια. Εντοπίζεται το ουραίο οστό ή ουρόστυλον και ανασηκώνεται και προσεκτικά κόβονται μυες των τοιχωμάτων του σώματος. Αποφεύγεται η χρήση μεταλλικών αντικειμένων και σε καμιά περίπτωση δεν αγγίζεται το νεύρο με μεταλλικούς στυλεούς, λαβίδες, ή χαρτί. Χρησιμοποιούνται καθαρά γυάλινα εργαλεία. Το ισχιακό νεύρο είναι ιδιαίτερα εύκολο να υποστεί βλάβη

τόσο μηχανικά όσο και χημικά. Αποχωρίζονται οι μύες και ο συνδετικός ιστός για να αποκαλυφθεί το ισχιακό νεύρο από τη σπονδυλική στήλη ως το γόνατο. Είναι σημαντικό το μήκος του νευρικού παρασκευάσματος να είναι τουλάχιστον 6 ή 8εκ. αν είναι δυνατόν. Χρησιμοποιείται ένας γυάλινος στυλεός με καμπύλο άκρο και αποχωρίζεται το νεύρο από τον συνδετικό και μυϊκό ιστό. Το νεύρο δεν πρέπει να εκτείνεται, ενώ πρέπει συνεχώς να παραμένει υγρό με διάλυμα Ringer. Μόλις αποκαλυφθεί το νεύρο στο επιθυμητό μήκος απολινώνεται το απώτερο άκρο με μεταξωτό νήμα και διπλή περιίδεση και το νεύρο αποκόπτεται εκτός της περιίδεσης. Με διαφορετικού χρώματος μεταξωτό νήμα περιδέεται το εγγύς άκρο της νευρικής δεσμίδας όσο το δυνατόν πλησιέστερα προς στην σπονδυλική στήλη και κόβεται. Το διαφορετικό χρώμα του νήματος σηματοδοτεί το εγγύς και το απώτερο άκρου του νεύρου ώστε να τοποθετηθεί σωστά στο θαλαμίσκο μέτρησης των χαρακτηριστικών της νευρικής ώσης .

## **2.Ανάρτηση του ισχιακού νεύρου**

Ο πυθμένας του θαλαμίσκου ανάρτησης του νεύρου πληρούται με διάλυμα Ringers έως κάτω ακριβώς από τα ηλεκτρόδια, χωρίς να έρθει σε επαφή με κανένα ηλεκτρόδιο ή με το νεύρο. Το νεύρο τοποθετείται κατά μήκος των ηλεκτροδίων έτσι ώστε να έχει καλή επαφή με καθένα ηλεκτρόδιο και να είναι καλά τεντωμένο και στερεωμένο στα άκρα του θαλαμίσκου. Το εγγύς άκρο πρέπει να έχει καλή επαφή και με τα δύο ηλεκτρόδια διέγερσης και το απώτερο άκρο με τουλάχιστον δύο από τα καταγραφικά ηλεκτρόδια. Το νεύρο υγραίνεται συνεχώς σταγονομετρικά με διάλυμα Ringers ώστε να υπάρχει καλή ηλεκτρική επαφή και να εμποδίζεται η αφυδάτωση.

## **3.Προσδιορισμός των μετάλλων .**

Προσδιορισμός των μετάλλων στους ιστούς έγινε με τη μέθοδο της Φασματοφωτομετρίας Ατομικής Απορρόφησης (Atomic Absorption Spectrophotometry ή AAS), όπου με τη βοήθεια του φασματοφωτόμετρου μία περιοχή συγκεκριμένου μήκους κύματος απομονώνεται από το υπόλοιπο φάσμα και

μετράται η μεταβολή της έντασης αυτής της περιοχής. Η ανάλυση των μετάλλων έγινε στη Μονάδα Περιβαλλοντικής Φυσιολογίας του εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Στην AAS οι βασικές αρχές είναι οι ακόλουθες:

Τα προς ανάλυση μεταλλικά άλατα, που προκύπτουν μετά την όξινη πέψη των δειγμάτων, φέρονται σε ατομική κατάσταση και παρεμβάλλονται στη διαδρομή της εκπεμπόμενης φωτεινής συχνότητας του φωτόμετρου. Για κάθε μέταλλο χαρακτηριστικά φάσματα φωτεινών συχνοτήτων ενεργοποιούνται στην πηγή του φωτόμετρου με τη βοήθεια μιας κοίλης λυχνίας καθόδου (hollow cathode lamp). Τα άτομα του μετάλλου τότε απορροφούν επιλεκτικά την ακτινοβολία που εκπέμπεται.

Ως γνωστόν όταν ακτινοβολία μήκους κύματος  $\lambda$  περνά από νέφος ατόμων, ένα μέρος της απορροφάται λόγω της διέγερσης των ατόμων ( $M0 + h\nu - M^*$ ). Επομένως η ένταση της ακτινοβολίας στο μήκος κύματος που αντιστοιχεί στην ενέργεια του φωτονίου  $h\nu$  θα μειωθεί. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του ατόμου τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η μείωση στην ενέργεια της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Όπως προαναφέρθηκε κάθε είδος ατόμου απαιτεί φωτόνια συγκεκριμένης ενέργειας, σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, για να παράγει διεγερμένα άτομα αυτού του στοιχείου. Τελικά η μείωση της έντασης του σήματος του ανιχνευτή του φωτόμετρου υπακούει στο νόμο των Lambert-Beer, που ορίζει πως όταν μονοχρωματική ακτινοβολία διέρχεται από ομοιογενές υλικό, η ισχύς της ακτινοβολίας μειώνεται ανάλογα με τον αριθμό των απορροφούμενων σωματιδίων στη διαδρομή του φωτός:

$$A = \log P_0/P = a b c$$

Όπου  $A$  η απορρόφηση,  $P_0$  η ισχύς της εξερχόμενης ακτινοβολίας,  $a$  η απορροφητικότητα (σταθερά),  $b$  το μήκος της διαδρομής που διανύθηκε και  $c$  η συγκέντρωση. Άρα η απορρόφηση σχετίζεται με τη συγκέντρωση του μετάλλου.

#### **4.Ατομική απορρόφηση με φλόγα ( FAAS)**

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των επιπέδων Zn στα ισχιακά νεύρα των πειραματοζώων. Για την ατομοποίηση ενδιάμεσης σταθερότητας στοιχείων όπως ο Zn, χρησιμοποιείται η φλόγα αέρα ασετυλίνης, που φτάνει σε θερμοκρασία **2300 0C** . Το δείγμα φέρεται προς μέτρηση σε υγρή κατάσταση και

μετατρέπεται σε αερόλυμα με τη βοήθεια νεφελοποιητή, μεταφέρεται από ρεύμα αερίων στον καυστήρα και μετά τη μίξη του με τα αέρια της φλόγας καίγεται και ατμοποιείται. Ένα σταθερό σήμα, του οποίου η ένταση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του μετάλλου, καταγράφεται κατά το χρονικό διάστημα που το δείγμα εκτίθεται στη φλόγα.

Για τη μέτρηση του Zn με φλόγα χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα **S1=0,5μg/ml και S2=1μg/ml (ppm)** Zn υπό νιτρική μορφή που παρασκευάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις από πυκνό πρότυπο διάλυμα **ZnNO<sub>3</sub>** συγκέντρωσης 1 mg/ml (Spectrosol, BDH Chemicals, Ltd Poole-England). Οι ρυθμίσεις λειτουργίας για τον Zn ήταν:

Μήκος κύματος ( $\lambda$ ): 213,9nm. Εύρος σχισμής (σλιτ): 0.7 νμ NOPM. Ένταση ρεύματος: 15 mA. Πηγή φωτός: κοίλη λυχνία καθόδου Zn. Φλόγα: Μείγμα ασετιλίνης-αέρα, οξειδωτική. Ευαισθησία: 0,018 μg/ml Zn για 1% απορρόφηση (0,5μg/ml έχουν απορρόφηση 0,12).

## 5. Πειραματικές Ομάδες

Τα ισχιακά νεύρα (26) ελήφθησαν από βατράχους του γένους *Rana ridibunda* με την μεθοδολογία που περιγράφεται κατωτέρω και χωρίστηκαν σε 4 ομάδες : μάρτυρες ,9 νεύρα ( ομάδα C), έκθεση σε Zn 15μM ,6 νεύρα ( ομάδα Zn), έκθεση σε ροπιβακαΐνη 2 mM, 6 νεύρα (ομάδα Rop), έκθεση σε Zn 15 μM + Rop 2 mM, 5 νεύρα (ομάδα Zn + Rop).

Τα ισχιακά ν. μετά την απομόνωση τους εμβαπτίζονταν σε διάλυμα Ringer βατράχου οι μάρτυρες και σε Ringer Zn 15μM, Ringer ροπιβακαΐνης 2 mM, και Ringer Zn 15 μM + Rop 2 mM , οι πειραματικές ομάδες νεύρων αντίστοιχα .Στους χρόνους 0, 10, 20, 30 min σε κάθε νεύρο ελεγχόταν η ουδός διέγερσης , το μέγιστο του δυναμικού ενέργειας (V) και ο χρόνος (T) που μεσολαβούσε από την εμφάνιση της ουδού έως την εμφάνιση του μέγιστου δυναμικού . Το πηλίκο του χρόνου T προς την σταθερή απόσταση (35 mm), που μεσολαβεί μεταξύ των καταγραφικών ηλεκτροδίων στον θαλαμίσκο του παλμογράφου παρείχε την ταχύτητα αγωγής του ερεθίσματος σε m/sec. Μετά την τελευταία καταγραφή των 30 min , τα νεύρα υπέστησαν διαδικασία υγρής πέψης σε φούρνο μικροκυμάτων και στα δείγματα μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις του Zn σε φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης.

## **Γ. Αποτελέσματα**

## Γ. Αποτελέσματα

Πιν.1. Μέγιστο δυναμικό ενέργειας (CAP,mV)

Ομάδες	CAP <sub>0</sub>	CAP <sub>10</sub>	% T <sub>10</sub>	CAP <sub>20</sub>	% T <sub>20</sub>	CAP <sub>30</sub>	% T <sub>30</sub>
<b>control</b>	4,94	4,83	0,98	4,36	0,88	3.94	0.80
"	15,03	13,49	0,90	12,68	0,84	11.38	0.76
"	2,96	2,75	0,93	2,56	0,86	2.37	0.80
"	21,71	20,78	0,96	20,41	0,94	20.23	0.93
<b>Zn</b>	26,98	25,35	1	24,12	1,01	20,84	0.77
"	17,12	21,56	1,34	23,04	1,53	21,18	1.24
"	17,23	11,36	0,70	9,47	0,62	7,69	1.06
"	28,1	27,31	1,03	27,17	1,10	27,25	0.97
"	22,36	32,61	1,55	31,72	1,60	35,74	1.60
"	22,18	23,51	1,13	20,05	1,02	22,57	1.02
<b>Rop + Zn</b>	20,12	5,606	0,30	2,91	0,16	2,70	0.13
"	3,85	1,75	0,48	3,60	1,06	2,53	0.66
"	4,57	1,65	0,38	X		X	
"	17,82	3,021	0,18	0,82	0,05	X	
"	19,72	4,759	0,26	0,91	0,05	0,77	0.40
<b>Rop</b>	42,96	6,95	0,17	1,15	0,03	0	
"	30,86	8,14	0,28	2,99	0,11	0	
"	23,69	5,09	0,23	X		0	
"	37,31	13,27	0,38	0,42	0,01	0	
"	19,68	4,83	0,26	X		0	
"	29,08	2,61	0,10	X		0	

Πιν. 1. Μέγιστο δυναμικό ενέργειας (CAP, mV) ισχιακού νεύρου βατράχου μετά από έκθεση σε ψευδάργυρο και ροπιβακαΐνη.

CAP<sub>0</sub>, CAP<sub>10</sub>, CAP<sub>20</sub>, CAP<sub>30</sub> = δυναμικό ενέργειας στους χρόνους 10,20,30 min

% T<sub>10</sub>, % T<sub>20</sub>, % T<sub>30</sub> = % μεταβολή του CAP, στους χρόνους 10,20,30 min

Control = μάρτυρες ισχιακά νεύρα, έκθεση σε διαλ. Ringer

Zn = ισχιακά ν., έκθεση σε διαλ. Ringer Zn 15 μM

Rop + Zn = ισχιακά ν., έκθεση σε διαλ. Ringer Zn 15 μM + Rop 2mM

Rop = ισχιακά ν., έκθεση σε διαλ. Ringer Rop 2mM



**Πιν.2. Ταχύτητα αγωγής (V, m/sec) της νευρικής ώσης**

	V <sub>0</sub>	V <sub>10</sub>	%	V <sub>20</sub>	%	V <sub>30</sub>	%
<b>Contr</b>	56,45						
	64,81						
	60,34						
	54,69						
	47,30						
	76,09	70	0,92	76,09	1	67,30	0,88
	97,22	89,74	0,923	89,74	0,92	79,54	0,82
	44,87	45,45	1,013	43,75	0,97	42,68	0,95
	97,22	85,37	0,88	85,37	0,88	83,33	0,86
<b>Zn</b>	159,09	125	0,79	97,22	0,61	97,22	0,61
	72,91	76,09	1,04	79,54	1,09	102,94	1,41
	70	97,22	1,39	109,38	1,56	159,09	2,27
	194,44	145,83	0,75	134,62	0,70	194,44	1
	56,45	87,50	1,55	92,11	1,63	116,67	2,07
	92,10	87,50	0,95	83,33	0,90	109,38	1,19
<b>Zn+Rop</b>	60,34	62,5	1,04	54,69	0,90	291,6667	4,83
	56,45	58,33	1,03	58,33	1,03	67,30769	1,19
	59,32	60,34	1,02		0	0	
	44,87	70	1,56	159,10	3,55	0	
	79,54		0		0	0	
<b>Rop</b>	83,33	62,50	0,75	60,34	0,72	0	
	76,09	67,30	0,88	60,34	0,79	0	
	62,50	40,70	0,65		0	0	
	83,33	38,04	0,46		0	0	
	54,69	44,87	0,82		0	0	
	87,5	58,33	0,67		0	0	

Πιν. 2. Ταχύτητα αγωγής (V, m/sec) της νευρικής ώσης, ισχιακού νεύρου βατράχου μετά από έκθεση σε ψευδάργυρο και ροπιβακαΐνη.

V<sub>0</sub>, V<sub>10</sub>, V<sub>20</sub>, V<sub>30</sub> = ταχύτητα αγωγής στους αντίστοιχους χρόνους  
 % T<sub>10</sub>, % T<sub>20</sub>, % T<sub>30</sub> = % μεταβολή της V, στους χρόνους 10,20,30 min

Control = μάρτυρες ισχιακά ν., έκθεση σε διαλ. Ringer

Zn = ισχιακά ν., έκθεση σε διαλ. Ringer Zn 15 μM

Rop + Zn = ισχιακά ν., έκθεση σε διαλ. Ringer Zn 15 μM + Rop 2mM

Rop = ισχιακά ν., έκθεση σε διαλ. Ringer Rop 2mM

	CAP		
	M.O.± sd CAP10	M.O. .± sd CAP 20	M.O. .± sd CAP 30
<b>Control</b>	94 ± 3,48	88,2 ± 4,13	82,2 ± 7,6
<b>Zn</b>	128,7 ±28,02	129,2 ± 27,54	135 ± 34,36
<b>Zn+Rop</b>	32 ± 11,71	33 ± 4,8	33,6 ± 4,052
<b>Rop</b>	23,6 ± 9,67	5,1 ± 5,17	

**Πιν. 3. Μέσοι όροι και αποκλίσεις των % μεταβολών του δυναμικού ενέργειας (CAP) στους χρόνους έκθεσης 10,20,30.**

	T tests CAP		
	10 min	20 min	30 min
	Control / Zn	Control / Zn	Control / Zn
p	0,43	0,45	0,14
	Control / Zn-Rop	Control /Zn-Rop	Control / Zn-Rop
p	<b>1,99 E-05</b>	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>
	Control / Rop	Control / Rop	Control / Rop
p	<b>3,80 E-07</b>	<b>8,78 E-07</b>	<b>0,009</b>
	Zn-Rop / Rop	Zn-Rop / Rop	Zn/-Rop / Rop
p	0,11	0,19	<b>0,003</b>

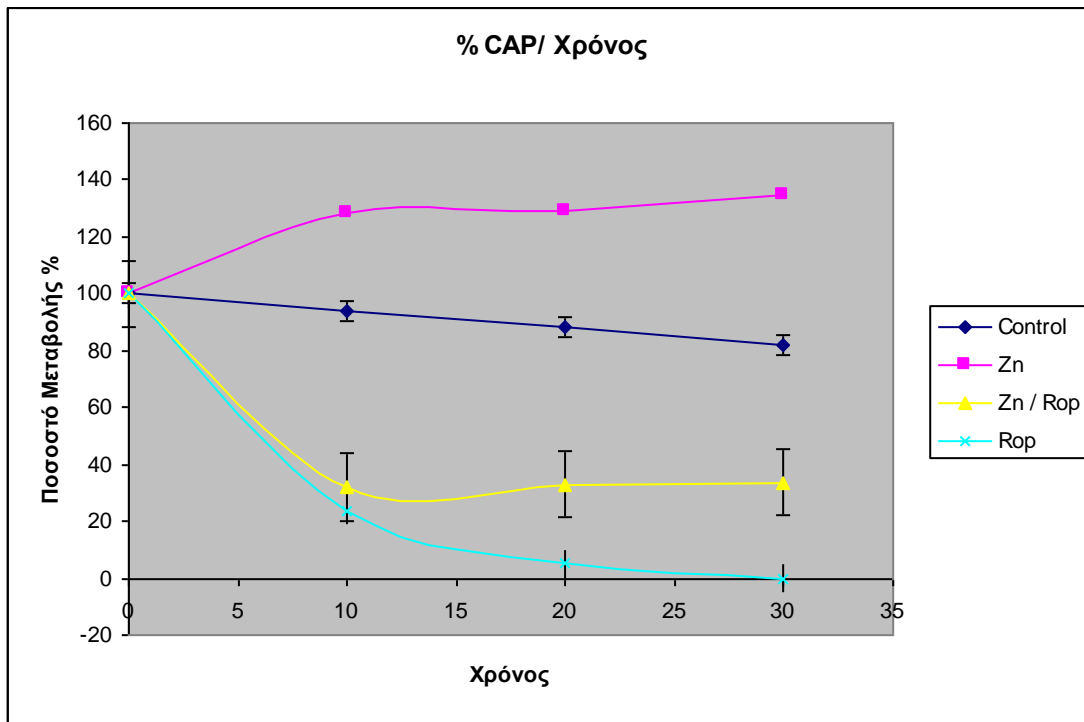
**Πιν.4. Στατιστική σύγκριση (T test) των % μεταβολών του CAP μεταξύ των πειραματικών ομάδων στους διάφορους χρόνους έκθεσης**

min	Μέση τιμή ± sd % μεταβολη ταχύτητας αγωγής (V)				
	Control	Zn	Zn+Rop	Rop	
0		100	100	100	100
10	93,35 ± 5,68	107,8 ± 3,25	116,15 ± 2,35	70,5 ± 14,08	
20	94,4 ± 5,44	108,2 ± 4,33	109,7 ± 0,93	75,86 ± 4,87	
30	87,77 ± 5,6	142,5 ± 6,37		0	0

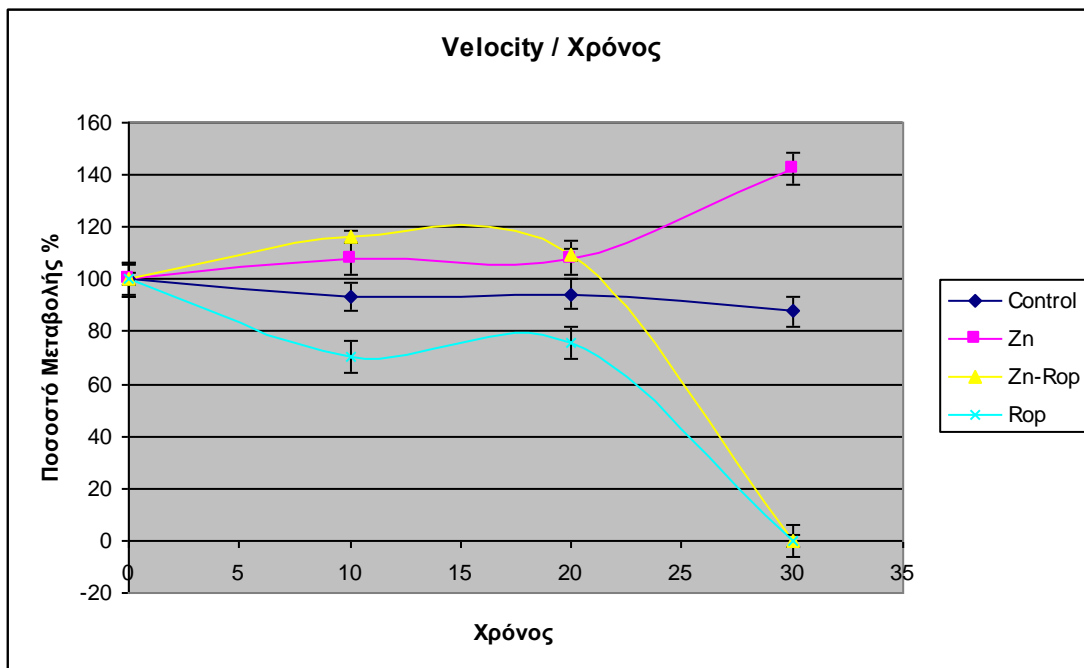
**Πιν. 5. Μέσοι όροι και αποκλίσεις των % μεταβολών της ταχύτητας αγωγής της ώσης (V) στους χρόνους έκθεσης 10,20 και 30 λεπτά.**

	Συντελεστής συσχέτισης ( r )	
	Zn / CAP	Zn / Velocity
<b>30</b>	<b>0,93</b>	<b>Control</b> 0,213
<b>30</b>	<b>0,94</b>	<b>Zn</b> <b>0,82</b>
<b>30</b>	0.49	<b>Rop</b> 0,43
<b>30</b>	-0,96	<b>Rop/ Zn</b> -0,42

**Πιν.6. Συντελεστής συσχέτισης ( r ) μεταξύ Zn ,δυναμικού ενέργειας (CAP) και ταχύτητας αγωγής (V) στις διάφορες πειραματικές συνθήκες**



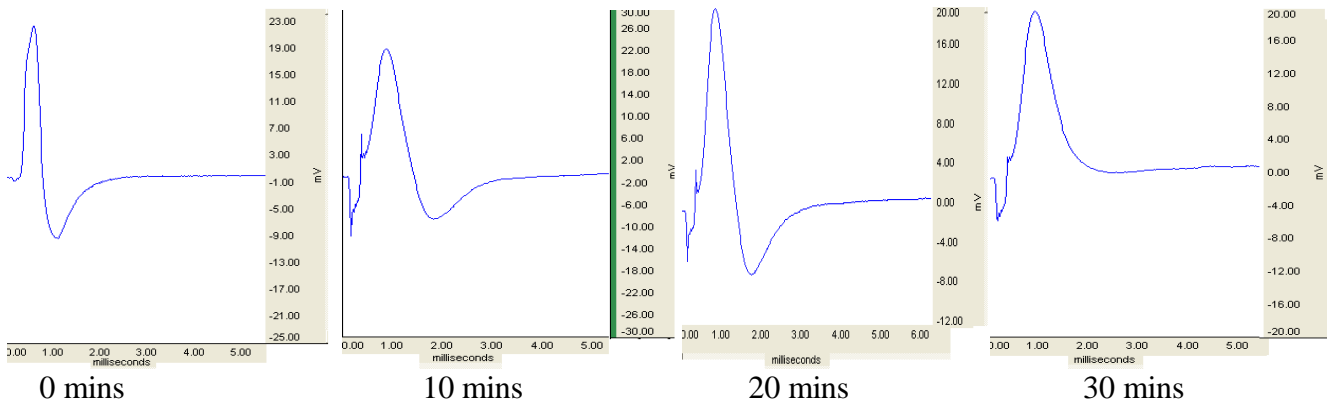
**Διάγραμμα 1.** Εξέλιξη της % μεταβολής του δυναμικού ενέργειας (CAP) συναρτήσει του χρόνου έκθεσης στις διάφορες πειραματικές συνθήκες



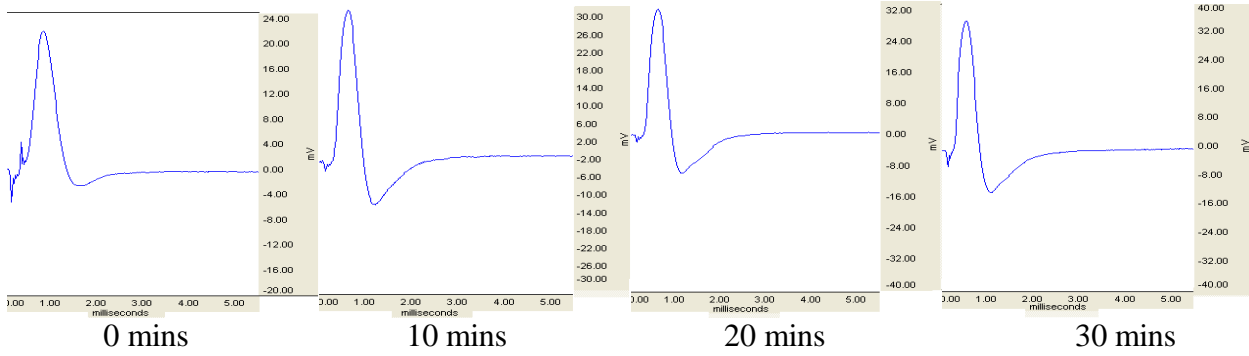
**Διάγραμμα 2.** Εξέλιξη της % μεταβολής της ταχύτητας αγωγής της ώσης ( V ) συναρτήσει του χρόνου έκθεσης στις διάφορες πειραματικές συνθήκες

# Αντιπροσωπευτικές παλμογραφικές καταγραφές CAP .

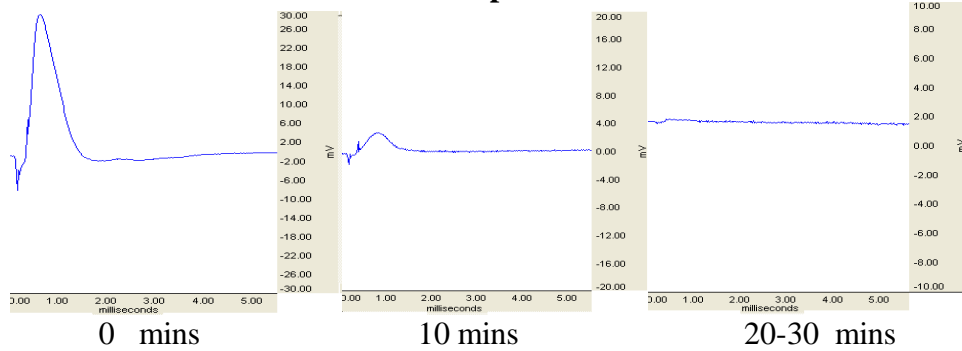
## 1. Control



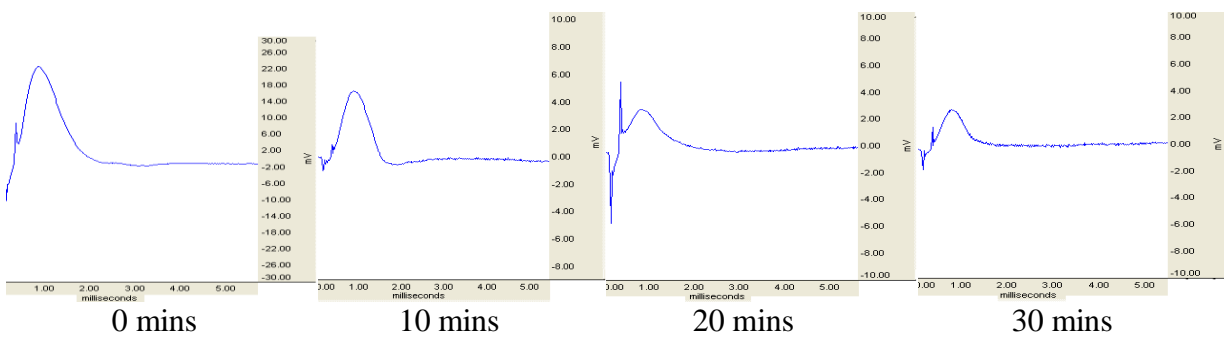
## 2. Zn



## 3. Rop

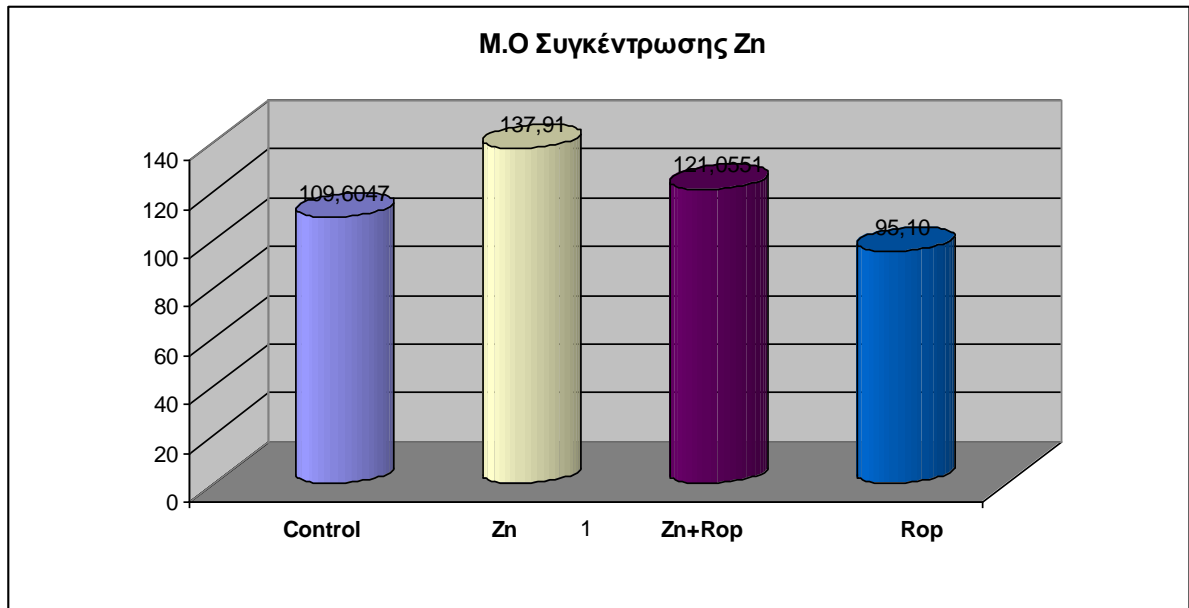


## 4. Rop / Zn



**Πιν. 7 Συγκεντρώσεις και % μεταβολές Zn στα ισχιακά νεύρα βατράχου μετά 30 min έκθεσης στις διάφορες πειραματικές συνθήκες**

	1	2	3	απορρόφηση	Συγκέντρωση (ppm) Zn μετά 30 min έκθεσης	% μεταβολή Zn μετά 30 min έκθεσης
<b>Control</b>	0,59	0,58	0,58	0,58	0,027	106,45
	0,6	0,61	0,61	0,61	0,030	100,11
	0,44	0,45	0,45	0,45	0,018	125,47
	0,59	0,59	0,6	0,59	0,028	105,95
	0,68	0,68	0,7	0,69	0,033	104,99
	0,44	0,45	0,44	0,44	0,019	113,68
	0,46	0,46	0,48	0,47	0,021	110,58
	0,64	0,65	0,65	0,65	0,025	129,33
	0,46	0,47	0,44	0,46	0,015	148,27
<b>Zn</b>	0,78	0,79	0,78	0,7	0,056	104,35
	0,67	0,69	0,69	0,68	0,050	103,33
	0,67	0,68	0,68	0,68	0,039	131,47
	0,53	0,55	0,54	0,54	0,036	113,13
	0,41	0,41	0,42	0,413	0,016	129,98
	0,43	0,43	0,43	0,43	0,018	120,11
<b>Zn+Rop</b>	0,40	0,40	0,40	0,40	0,017	120,48
	0,50	0,50	0,50	0,50	0,022	115,74
	0,44	0,45	0,45	0,45	0,026	127,38
	0,37	0,37	0,37	0,37	0,019	95,85
	0,37	0,37	0,37	0,37	0,022	123,88
	0,47	0,47	0,49	0,48	0,025	143,00
<b>Rop</b>	0,33	0,35	0,34	0,34	0,0169	100,59
	0,38	0,38	0,37	0,38	0,0143	131,70
	0,46	0,46	0,45	0,45	0,0236	96,04
	0,18	0,17	0,18	0,18	0,0116	76,29
	0,17	0,17	0,18	0,17	0,0983	88,50
	0,27	0,27	0,27	0,27	0,0173	77,85



**Διάγραμμα 3. Συγκεντρώσεις Zn (ppm) σε ισχιακά νεύρα βατράχου μετά 30 min έκθεσης στις αντίστοιχες πειραματικές συνθήκες**

**Control** = μάρτυρες ισχιακά ν., έκθεση σε διαλ. Ringer

**Zn** = ισχιακά ν., έκθεση σε διαλ. Ringer Zn 15 μM

**Rop + Zn** = ισχιακά ν., έκθεση σε διαλ. Ringer Zn 15 μM + Rop 2mM

**Rop** = ισχιακά ν., έκθεση σε διαλ. Ringer Rop 2mM

**Συγκέντρωση Zn (ppm)  
x ± sd (30 min έκθεσης)**

**control**  
109,60 ± 8,20

**15μM Zn**  
137,91 ± 12,24

**15μM Zn + 2mM Rop**  
121,05 ± 15,44

**2mM Rop**  
95,10 ± 20,34

**Πιν. 8. Μέση συγκέντρωση Zn στο ισχιακό νεύρο βατράχου μετά από έκθεση 30 λεπτών στις διάφορες πειραματικές ομάδες.**

## Δ. Συζήτηση

Ο πόνος ένα σύνθετο χαρακτηριστικό των ζώντων οργανισμών εκφράζεται μέσω ειδικευμένων υποδοχέων των βλαπτικών ερεθισμάτων. Τα ερεθίσματα πόνου μεταφέρονται από τους υποδοχείς προς τις περιοχές αντίληψης μέσω αισθητικών οδών Αδ και C που αποτελούν τμήματα των αισθητικών νεύρων. Τα αισθητικά νεύρα μεταφέρουν ώσεις, το σύνθετο δυναμικό των οποίων (CAP) και η ταχύτητα αγωγής (V) μπορούν να μεταβληθούν υπό την επίδραση εξωγενών κι ενδογενών παραγόντων. Παράγοντες ενδογενείς όπως τα προϊόντα του ενδογενούς αναλγητικού συστήματος κι εξωγενείς όπως τα αναισθητικά αλλά κι άλλες ουσίες μεταξύ των οποίων και τα μέταλλα, μεταβάλλουν τις ιδιότητες των υποδοχέων, αλλά και των νευρικών μεμβρανών με αποτέλεσμα τροποποίηση, αναστολή ή και κατάργηση των ώσεων του πόνου κεντρικότερα.

Οι Katsuki et al, 2006. έδειξαν ότι 0,2 mM ροπιβακαΐνης μείωσαν με αναστρέψιμο τρόπο το ύψος της κορυφής του «σύνθετου δυναμικού ενέργειας» (compound action potential) και αύξησαν τον χρόνο «διάρκειας της μισής κορυφής» (half-peak duration) στα 20 λεπτά. Επίσης η επίδραση του αναισθητικού στο ύψος του «σύνθετου δυναμικού ενέργειας» είναι εξαρτώμενη από την συγκέντρωση με  $IC_{50} = 0,34 \text{ mM}$ , ενώ σε συγκέντρωση 1 mM το «σύνθετο δυναμικό ενέργειας» αναστέλλεται εντελώς.

Η δράση αυτή φαίνεται ότι ασκείται κυρίως με αποκλεισμό των τασεοεξαρτώμενων διαύλων  $Na^+$ . Τα συνηθισμένα τοπικά αναισθητικά που είναι τριτογενείς ή δευτερογενείς αμίνες, διεισδύουν στο έλυτρο μυελίνης και στη μεμβράνη του νευράξονα στη μη φορτισμένη μορφή, αλλά δρουν από την εσωτερική επιφάνεια της αξονικής μεμβράνης στην κατιονική μορφή (Rang and Dale, 1991).

Από τα αποτελέσματα μας φαίνεται ότι το σύνθετο δυναμικό δράσης (CAP) ισχιακού νεύρου βατράχου μειώνεται σημαντικά μετά από έκθεση σε ροπιβακαΐνη 2 mM x 10, 20, 30 min ( $p \sim 0.1 - 0.3 \times 10^{-7}$ ), επίσης η μείωση της ταχύτητας αγωγής είναι σημαντική μετά την χορήγηση ροπιβακαΐνης σε όλους στους χρόνους καταγραφής ( $p \sim 4,3 - 4,4 \times 10^{-5}$ ). (Πιν.1,2,3,4,5, Διαγρ1,2, Καταγραφή 3)

Ο Zn σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι απαραίτητος για την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση (Vallee and Falchuk, 1993; Schmidt and Beyersmann, 1999). Επίσης διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο έναντι της απόπτωσης in vivo και in vitro (Sundermann, 1995, Kontargyris 2008, 2009). Έχει δειχθεί επίσης ότι χαμηλές συγκεντρώσεις Zn είναι σημαντικές για την νευροδιαβίβαση (Smart et al., 2004)



Έχει αναφερθεί ότι ο ψευδάργυρος αλλάζει τη συμπεριφορά διαφόρων υποδοχέων ή ιοντικών καναλιών, συμπεριλαμβανομένων των γλουταμινικών τύπου N-methyl-D-aspartate (NMDA) υποδοχέων, των υποδοχέων γ-αμινοβουτυρικού οξέος A (GABA<sub>A</sub>), υποδοχέων γλυκίνης, ακετυλοχολίνης, διαύλων ATP και τασεοελεγχόμενων καναλιών Ca<sup>2+</sup> και διαύλων K<sup>+</sup> (Frederickson et al., 2000).

Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο ψευδάργυρος απελευθερώνεται, ανάλογα με τη δραστηριότητα, από τις βρυώδεις ίνες στον ιππόκαμπο, και ρυθμίζει τη δράση των νευρικών κυκλωμάτων ως διαμεσολαβητής των νευρικών σημάτων και της συναπτικής πλαστικότητας (Ueno et al., 2002). Αφαίρεση αυτού του συναπτικού ψευδαργύρου, με την βοήθεια χηλοποιητή, προκαλούσε υπερδιέγερση στους νευρώνες του ιππόκαμπου του αρουραίου (Blasco-Ibanez et al., 2004).

Ο Zn απαντάται στην μυελίνη του ισχυακού νεύρου αρουραίου σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από ότι τα άλλα ιχνοστοιχεία. (Bourre et al., 1987) και φαίνεται πως ενισχύει την πάκτωση της μυελίνης στο περιφερικό νευρικό σύστημα (Inouye and Kirschner, 1984), μια εξειδικευμένη σύνδεση που έχει περιγραφεί από τους Riccio et al., 1995.

Μορφολογικές μεταβολές που προκλήθηκαν από την έλλειψη Zn παρατηρήθηκαν στο ισχυακό νεύρο πειραματοζώων (αρουραίων) όπου τόσο η επιφάνεια διατομής του νεύρου όσο και ο αριθμός των εμμέλων αξόνων είναι μειωμένος κατά 20% και 29% αντίστοιχα, σε σύγκριση με τους μάρτυρες (Bunyami et al., 2005).

Η Μόσχου Μ., 2006 αναφέρει ότι η έρευνα βιωσιμότητας σε ισχιακά νεύρα αρουραίου έδειξε ότι έκθεση τους σε συγκέντρωση 50μM ZnCl<sub>2</sub> διατήρησε το IT<sub>50</sub>Zn στις 21.2±0.26 h, ένα χρόνο παρόμοιο με αυτό του μάρτυρα.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία ο Zn εφαρμόστηκε σε συγκέντρωση 15μM η οποία από εργασίες των Kontargyris et al 2008 φαίνεται να αναστέλλει την αποπτωτική δράση της ροπιβακαΐνης σε κύτταρα HaCaT. Από τα αποτελέσματά μας φαίνεται ότι η συγχορήγηση Zn 15 μM και ροπιβακαΐνης 2 mM ανέστειλε τη δράση της ροπιβακαΐνης σημαντικά στους χρόνους έκθεσης 10 min, (p = 1,99 E-05 έναντι 3,80 E-07) 20 min, (0,03 έναντι 8,78 E-07) και 30 min (p = 0.03 έναντι 0,009). Φαίνεται επίσης ότι ο Zn αναστέλλει την πτώση του CAP που προκαλεί η ροπιβακαΐνη τουλάχιστον επί 30 min (p < 0.003). Η ταχύτητα αγωγής επίσης εμφανίζει αύξηση στα ισχιακά νεύρα που εκτέθηκαν σε Zn και μετά τα 30 λεπτά επώασης (p ~ 0.048). (Πιν 1,2,3,4,5 Διαγ.1,2 Καταγραφή 2,4). Στις καταγραφές του παλμογράφου 3 και 4 φαίνεται χαρακτηριστικά η αναστολή της δράσης της ροπιβακαΐνης παρουσία Zn.

Οι Liu et al, 1999 αναφέρουν ότι ο Zn ανακουφίζει από την φλεγμονώδη υπεραλγησία. Σε ποντίκια με βλάβη του ισχιακού νεύρου η χορήγηση χλωριούχου Zn ενδοραχιαία, ενδοπελματιαία ή συστηματικά ανακούφισε από την θερμουπεραλγησία δοσοεξαρτώμενα

αλλά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ανάλογα με την οδό χορήγησης ( i.p. injections ( $ED_{50} = 13.6 \text{ nmol}$ ), intrathecal ( $ED_{50} = 0.05 \text{ nmol}$ ), intraplantar injections ( $ED_{50} = 0.3 \text{ nmol}$ ) Η χορήγηση του Zn ενδοραχιαία ή ενδοπελματιαία δεν επηρέασε την αντίληψη της θερμαλγησίας σε φυσιολογικά ποντίκια χωρίς βλάβη του ισχιακού και τα παραπάνω ευρήματα αποτελούν τις πρώτες ενδείξεις του ότι ο Zn ανακουφίζει από την νευροπαθητική υπεραλγησία.

Οι συγκεντρώσεις του Zn στα ισχιακά νεύρα, μετά 30 min έκθεσης στις πειραματικές μας συνθήκες, δείχνουν ότι στις ομάδες που εκτέθηκαν σε Zn, είτε παρουσία είτε απουσία ροπιβακαΐνης (Zn και Rop+Zn αντίστοιχα), είναι μεγαλύτερες ενώ στην ομάδα νεύρων που εκτέθηκαν μόνο σε ροπιβακαΐνη (Rop) είναι χαμηλότερες (Πίνακες 6,7,8, και Διαγ.3). Πιθανότατα η παρουσία του Zn βελτιώνει την ενεργότητα του νεύρου, συγκρατείται περισσότερος Zn και αντιρροπούνται οι δράσεις της ροπιβακαΐνης.

Ο Zn φαίνεται να αποτελεί ένα στοιχείο με ιδιαίτερο ρόλο στους μηχανισμούς πόνου-αναλγησίας κεντρικά και περιφερικά και καθώς είναι ένα στοιχείο που προσλαμβάνεται φυσιολογικά από την διατροφή ή το νερό αξίζει η περαιτέρω έρευνα να εστιάσει στην πιθανή χρήση του στην διαχείριση και αντιμετώπιση του πόνου καθώς και στη προστασία των νευρικών δομών που συμμετέχουν σε αυτούς τους μηχανισμούς

## Ε. Συμπεράσματα

- Το σύνθετο δυναμικό δράσης (CAP) ισχιακού νεύρου βατράχου μειώνεται σημαντικά μετά από έκθεση σε ροπιβακαΐνη 2 mM x 10 , 20 , 30 min (  $p \sim 0.1 - 0.3 \times 10^{-7}$  ).
- Η συγχορήγηση Zn 15  $\mu$ M και ροπιβακαΐνης 2 mM ανέστειλε τη δράση της ροπιβακαΐνης σημαντικά στους αντίστοιχους χρόνους (  $p \sim 0.1 \times 10^{-5} - 0.03$  ).
- Φαίνεται επίσης ότι ο Zn αναστέλλει την πτώση του CAP που προκαλεί η ροπιβακαΐνη τουλάχιστον επί 30 min (  $p < 0.003$  ).
- Η ταχύτητα αγωγής εμφανίζει αύξηση στα ισχιακά νεύρα που εκτέθηκαν σε Zn και μετά τα 30 λεπτά επώασης (  $p \sim 0.048$  ).
- Η μείωση της ταχύτητας αγωγής είναι σημαντική μετά την χορήγηση ροπιβακαΐνης σε όλους στους χρόνους καταγραφής (  $p \sim 4,3 - 4,4 \times 10^{-5}$  ).
- Η ομάδα ισχιακών νεύρων που εκτέθηκαν σε συγχορήγηση ροπιβακαΐνης και Zn εμφανίζει διατήρηση της ταχύτητας αγωγής για τα 10 και 20 λεπτά (  $p \sim 0.7 \times 10^{-4}$  και  $p \sim 0.003$  αντίστοιχα).
- Η παρουσία του Zn συσχετίζεται σημαντικά θετικά με το CAP και την V στα 30 min έκθεσης (  $r = 0.94$  και αντίστοιχα  $r = 0.82$  ).  
→ Το CAP και η V παρουσία ροπιβακαΐνης στα 30 min μηδενίζονται, ενώ η σύγχρονη παρουσία Zn αναστέλλει τη δράση της.

## ΣΤ. Περίληψη

Το νευρικό σύστημα είναι ένα δίκτυο επικοινωνίας που επιτρέπει σε έναν οργανισμό να ανιχνεύει, να επεξεργάζεται και να αντιδρά κατάλληλα στα ερεθίσματα του περιβάλλοντος του. Οι πληροφορίες άγονται υπό μορφή νευρικής ώσης κατά μήκος των νευραξόνων, με ταχύτητα που εξαρτάται από την απουσία ή παρουσία μυελίνης και τη διάμετρο του νευράξονα. Η βλάβη που προκαλείται στους ιστούς του σώματος γίνεται αισθητή χάρη στον πόνο, πολυδιάστατη αισθητηριακή εμπειρία, η οποία συνδέεται με κινητικά αντανακλαστικά αποφυγής και με διέγερση του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Οι υποδοχείς πόνου είναι οι ελεύθερες νευρικές απολήξεις που βρίσκονται κατανεμημένες στις επιφανειακές στοιβάδες του δέρματος και στους εσωτερικούς ιστούς. Η επεξεργασία στο κεντρικό νευρικό σύστημα της αρχής, διάρκειας, έντασης, και θέσης του περιφερικού βλαπτικού ερεθίσματος γίνεται μέσω της ταχείας συναπτικής ενεργοποίησης από τους άλγουποδοχείς. Τα τοπικά αναισθητικά εφαρμόζονται για την πρόκληση παροδικής και αναστρέψιμης κατάργησης των αισθήσεων σε μια περιορισμένη περιοχή του σώματος, μέσω παρεμπόδισης της νευρικής αγωγιμότητας. Τα τοπικά αναισθητικά, χωρίς να επηρεάζουν το δυναμικό ηρεμίας ή τον ουδό ερεθισμού των νευρώνων, ασκούν αποκλεισμό σταματώντας την έναρξη και τη διάδοση των δυναμικών ενέργειας, παρεμποδίζοντας την αύξηση της αγωγιμότητας των ιόντων νατρίου (Na<sup>+</sup>). Η ροπιβακαΐνη είναι ένα από τα προσφάτως εισαχθέντα στην αγορά τοπικά αναισθητικά

αμιδικού τύπου, με χαμηλή τοξικότητα, ασκεί πολύ καλή μετεγχειρητική αναλγησία και διαφορικό αισθητικό και κινητικό αποκλεισμό που είναι φανερός σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0,2% ή λιγότερο). Ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητος για την ομαλή ανάπτυξη και την υγεία των οργανισμών, εμφανίζει στα ψευδαργυρικά ένζυμα δομική δράση, δράση συμπαράγοντα και καταλυτική δράση. Είναι γνωστό ότι η έλλειψη ψευδαργύρου οδηγεί σε δυσλειτουργία της οσφρητικής και γευστικής αίσθησης, διαταράσσει την οπτική λειτουργία καθώς και την λειτουργία του νευρικού συστήματος γενικότερα. Ο ψευδάργυρος είναι δραστικός ρυθμιστής της δέσμευσης αμινοξέων στους υποδοχείς που παίρνουν μέρος στην νευροδιαβίβαση, θεωρείται ουσιώδης για τη σύνθεση πρωτεϊνών απαραίτητων για το σχηματισμό του GABA και άλλων νευροδιαβιβαστών. Μορφολογικές μεταβολές που προκλήθηκαν από την έλλειψη Zn παρατηρήθηκαν σε ισχιακά νεύρα πειραματοζώων όπου η επιφάνεια διατομής και ο αριθμός των εμμέλων αξόνων είναι μειωμένος.

Ισχιακά νεύρα απομονώθηκαν από βατράχους *Rana ridibunda*, εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις Zn, ροπιβακαΐνης και συνδυασμό τους για διάρκεια 10, 20 και 30 λεπτών και με τη βοήθεια παλμογράφου υπολογίστηκαν οι τιμές των δυναμικών ενέργειας (CAP) και των ταχυτήτων αγωγής (V) σε κάθε πειραματική συνθήκη. Οι συγκεντρώσεις Zn στα ισχιακά νεύρα τα οποία εκτέθηκαν στις διάφορες πειραματικές συνθήκες μετρήθηκαν με φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης μετά το πέρας των 30 min έκθεσης κατά περίπτωση.

Από τα αποτελέσματά μας συμπεραίνεται ότι:

- Το σύνθετο δυναμικό δράσης CAP ισχιακού νεύρου βατράχου μειώνεται σημαντικά μετά από έκθεση σε ροπιβακαΐνη 2 mM x 10, 20, 30 min ( $p \sim 0.1 - 0.3 \times 10^{-7}$ ).
- Η συγχρόνηση Zn 15  $\mu$ M και ροπιβακαΐνης 2 mM ανέστειλε τη δράση της ροπιβακαΐνης σημαντικά στους αντίστοιχους χρόνους ( $p \sim 0.1 \times 10^{-5} - 0.03$ ).
- Φαίνεται επίσης ότι ο Zn αναστέλλει την πτώση του CAP που προκαλεί η ροπιβακαΐνη τουλάχιστον επί 30 min ( $p < 0.003$ ).
- Η ταχύτητα αγωγής εμφανίζει αύξηση στα ισχιακά νεύρα που εκτέθηκαν σε Zn και μετά τα 30 λεπτά επώασης ( $p \sim 0.048$ ).
- Η μείωση της ταχύτητας αγωγής είναι σημαντική μετά την χορήγηση ροπιβακαΐνης σε όλους τους χρόνους καταγραφής ( $p \sim 4,3 - 4,4 \times 10^{-5}$ ).
- Η ομάδα ισχιακών νεύρων που εκτέθηκαν σε συγχρόνηση ροπιβακαΐνης και Zn εμφανίζει διατήρηση της ταχύτητας αγωγής για τα 10 και 20 λεπτά ( $p \sim 0.7 \times 10^{-4}$  και  $p \sim 0.003$  αντίστοιχα).
- Η παρουσία του Zn συσχετίζεται σημαντικά θετικά με το CAP και την V στα 30 min έκθεσης ( $r = 0.94$  και αντίστοιχα  $r = 0.82$ ).

→Το CAP και η V παρουσία ροπιβακαΐνης στα 30 min μηδενίζονται, ενώ η σύγχρονη παρουσία Zn αναστέλλει τη δράση της.

Ο Zn φαίνεται ότι είναι δυνατόν να περιορίσει την δράση αναλγητικών-αναισθητικών παραγόντων του τύπου της ροπιβακαΐνης και συνεπώς να βελτιώσει τους χρόνους επαναφοράς της λειτουργικότητας των περιφερικών νευρικών ιστών, μετά την εφαρμογή των ως άνω παραγόντων για χειρουργικές επεμβάσεις διαφόρων τύπων.

## **Z . Βιβλιογραφία**

Bariskaner H., M. Ayaz, F.B. Guney, N. Dalkilic and O. Guney Bupivacaine and ropivacaine: comparative effects on nerve conduction block. *Methods Find Exp.Clin.Pharmacol.* 29:337-41, 2007.

Bautista D.M., S.E. Jordt, T. Nikai, P.R. Tsuruda, A.J. Read, J. Poblete, E.N. Yamoah, A.I. Basbaum and D. Julius. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124: 1269-1282, 2006.

Bennet D.L.H., S.Averill, J.V. Priestley and S.B. McMahon. Postnatal changes in the expression of TrKA high affinity NGF receptor in primary sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.* 8: 2204-2208, 1996

Bennet RM. The rational management of fibromyalgia patients. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 2002; 28: 181-99.

Berg J.M. Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. *Science Wash. DC* 232:485-487, 1986.

Bertholf R.L. Zinc. In: *Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds*, edited by H.G. Seiler and H. Sigel. New York: Dekker, 1988, p. 788-800.

Bettger W.J. and B.L. O'Dell. A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life sci.* 28:1425-1438, 1981

Bhatnagar S, S.Taneja Zinc and cognitive development. *Br J Nutr.* 2001 2:S139-45.

Blackstad T.W. and A. Kjaerheim. Special axodendritic synapses in the hippocampal cortex. Electron and light microscopic studies on the mossy fibers. *J. Comp. Neurol.* 117: 133-159, 1961.

Blasco-Ibáñez JM, J Poza-Aznar, C Crespo, AI Marqués-Marí, FJ Gracia-Llanes, FJ Martínez-Guijarro. Chelation of synaptic zinc induces overexcitation in the hilar mossy cells of the rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 355:101-4. 2004

Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med.* 2002; 8: 136-42.

Bourre JM, A Youyou, G Durand, G Pascal. Slow recovery of the fatty acid composition of sciatic nerve in rats fed a diet initially low in n-3 fatty acids. *Lipids.* 22:535-8. 1987.

Brewer GJ, VD Johnson, RD Dick, P Hedera, JK Fink, KJ Kluin. Treatment of Wilson's disease with zinc. XVII: treatment during pregnancy. *Hepatology.* 31:364-70. 2000.

Chen C.L., D.C. Broom, Y. Liu, J.C. de Nooij, Z. Li, C. Cen, O.A. Samad, T.M. Jessell, C.J. Woolf and Q. Ma. Runx1 determines nociceptive sensory neuron phenotype and is required for thermal and neuropathic pain. *Neyron* 49:365-377, 2006.

Choi DW, JY Koh. Zinc and brain injury. *Annu Rev Neurosci.*;21:347-75 1998.

Chvapil M., P.L. Weedy, L. Stankova, D.S. Clark and C.F. Zukofski. Inhibitory effects of zinc ions on platelet aggregation and serotonin release reaction. *Life Sci.* 16: 561-572, 1975.

Cotton F.A. and G. Wilkinson. *Advanced Inorganic Chemistry. A Comprehensive Text.* New York: Wiley-Interscience, 1988, p. 599.

Cox J.J., F. Reimann, A.K. Nicholas, G. Thornton, E. Roberts, K. Springell, G. Karbani, H. Jafri, J. Mannan and Y. Raashid et al. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* 444: 894-898, 2006.

Crawford I.L. Zinc and the hippocampus: histology, neurochemistry, pharmacology, and putative functional relevance. In: *Neurobiology of the Trace Elements*, edited by I.E. Dreosti and R.M. Smith, Clifton NJ: Humana, 1983, vol. 1, p. 163-211.

Cuajungco MP, LE Goldstein, A Nunomura, MA Smith, JT Lim, CS Atwood, X Huang, YW Farrag, G Perry, AI Bush. Evidence that the beta-amyloid plaques of Alzheimer's disease represent the redox-silencing and entombment of abeta by zinc. *J Biol Chem.* 275:19439-42. 2000.

Cunnane S.C. Zinc. In: *Clinical and Biochemical Significance*. Boca Raton FL: CRC, 1988, p.101.

Cuvillon P.,E. Nouvellon, J. Ripart, J.C. Boyer, L. Dehour, A. Mahamat, J. L'hermite, C. Boisson, N. Vialles, J.Y. Lefrant, J.E. de La Coussaye. A comparison of the pharmacodynamics and pharmacokinetics of bupivacaine, ropivacaine (with epinephrine) and their equal volume mixtures with lidocaine used for femoral and sciatic nerve blocks: a double-blind randomized study. *Anesth Analg.* 108:641-9. 2009

Dauri M., E. Fabbi, P. Mariani, S. Faria, R. Carpenedo, T. Sidiropoulou, F. Coniglione, M. B. Silvi and A.F. Sabato. Continuous femoral nerve block provides superior analgesia compared with continuous intra-articular and wound infusion after anterior cruciate ligament reconstruction. *Reg.Anesth. Pain Med.* 34:95-9. 2009

de Leeuw M. A., J. A. Dertinger, L. Hulshoff, M. Hoeksema, R. S. Perez, W. W. Zuurmond, J. J. de Lange. The Efficacy of Levobupivacaine, Ropivacaine, and Bupivacaine for Combined Psoas Compartment–Sciatic Nerve Block in Patients

Dennis A.A., J.B. Dale, A. Francois, K. William. Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. *Ann. Inter. Med.* 140: 441-451. 2004.

Donaldson J., T. ST. Pierre, J. L. Minnich and A. Barbeau. Determination of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> in rat brain regions. *Can. J. Biochem.* 51: 87-92, 1973.

Ebadi M., L.C. Murin and R.F. Pfeiffer. Hippocampal zinc thionein and pyridoxal phosphate modulate synaptic function. *Ann. NY Acad. Sci.*585: 189-201,1990.

Ebadi M., S. Wilt, R. Ramalay, S. Swanson and C. Meby. The role of zinc and zinc binding proteins in regulation of glutamic acid decarboxylase in brain. *Prog. Clin. Biol. Res.* 144: 255-275, 1987.

Eledjam J.J., J. Ripart and E. Viel Clinical application of ropivacaine for the lower extremity. *Curr. Top.Med.Chem.* 1:227-31 2001.

Frederickson CJ MA Klitenick, WI Manton, JB Kirkpatrick. Cytoarchitectonic distribution of zinc in the hippocampus of man and the rat. *Brain Res.* 273:335-9. 1983

Frederickson CJ. Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *Int Rev Neurobiol.* 31:145-238. 1989

Freedman L.P., B.F. Luisi, Z.R. Korszun, R. Basavappa, P.B. Singler and K.R. Yamamoto. The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature Lond.* 334: 543-546, 1988.

Geller B.L. and D.R. Winge. Metal binding sites of rat liver Cu-thionein. *Arch. Biochem. Biophys.* 213: 109-117, 1982.

Gibson T.J., J.P. Postma, R. S. Brown and P. Argos. A model for the tertiary structure of the 28 residue DNA-binding motif "zinc finger" common to many eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Protein Eng.* 2: 209-218, 1988.

Goldberg Y.P., J. MacFarlane, M.L. MacDonald, J. Thompson, M.P. Dube, M. Mattice, R. Fraser, C. Young, S. Hossain and T. Pape et. al. Loss-of-function mutations in the Nav1,7 gene underlie congenital indifference to pain in multiple human population. *Clin. Genet.* 71: 311-319, 2007.

Goth A. (1981). *Medical pharmacology-principles and concepts.* Tenth Edition. The C. V. Mosby Company, 433-435.

Gummow B, CJ Botha, AT Basson, SS Bastianello. Copper toxicity in ruminants: air pollution as a possible cause. *Onderstepoort J Vet Res.* 58:33-9. 1991

Hambridge K Action research. *Prof. Nurse* 15:598-601. 2000

Hamlyn L.H. The fine structure of the mossy fibre ending in the hippocampus of the rabbit. *J. Anat. Lond.* 96: 112-120, 1962.



Hanas J.S., D.Hazuda, D.F. Bogenhagen, F.Y.-H. WU and C.-W. WU. Xenopus transcription factor A requires zinc for binding to the 5S gene. *J. Boil. Chem.* 258: 1120-14125, 1983.

Hanig R.C. and M.H. Aprison. Determination of calcium, copper, iron, manganese, potassium, sodium, zinc and chloride concentrations in several brain areas. *Anal. Biochem.* 21: 169-177, 1967.

Hollrnberg, S.M., V. Gigure, P. Segui and R.M. Evans. Colocalization of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor. *Cell* 49: 39-46, 1987.

Ilfeld B. M., V. J. Loland, J. C. Gerancher, A. N. Wadhwa, E. M. Renehan, D. I. Sessler, J. J. Shuster, D. W. Theriaque, R. C. Maldonado and E. R. Mariano. The Effects of Varying Local Anesthetic Concentration and Volume on Continuous Popliteal Sciatic Nerve Blocks: A Dual-Center, Randomized, Controlled Study. *Regional Anesthesia* 107, 701-707.

Inouye H, DA. Kirschner Effects of ZnCl<sub>2</sub> on membrane interactions in myelin of normal and shiverer mice. *Biochim Biophys Acta.*776:197-208. 1984.

Jarvis M.F., P. Honore, C.C. Shieh, M. Chapman, S. Joshi, X.F. Zhang, M. Kort, W. Carroll, B. Marron, R. Atkinson and J. Thomas et. al. A-803467, a potent and selective Nav1,8 sodium channel blocker, attenuates neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 8520-8525, 2007.

Ji R.R., T.A. Samad, S.X. Jin, R.Schmoll and C.J. Woolf. p38 MAPKactivation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* 36:57-68, 2002.

Julious D and Basbaum AI. Molecular mechanism of nociception. *Nature.* 203-10. 2001;

Kagi J.H.R. and A Schaffer. Biochemistry of metallothionein . *Biochemistry* 27: 8509-8515, 1988.

Kagi J.H.R. and B.L. Vallee. Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.* 235: 3460-3465, 1960.

Kagi J.H.R. and B.L. Vallee. Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. II. Physico-chemical properties. *J. Biol. Chem.* 236: 2435-2442, 1961.

Katsuki R, T Fujita, A Koga<sup>1</sup>, T Liu, T Nakatsuka, M Nakashima and E Kumamoto. Tramadol, but not its major metabolite (mono-Odemethyl tramadol) depresses compound action potentials in frog sciatic nerves. *British Journal of Pharmacology* 149, 319–327 2006

Kawahara M, M. Kato-Negishi and Y. Kuroda Pyruvate blocks zinc-induced neurotoxicity in immortalized hypothalamic neurons. *Cell Mol. Neurobiol* 22:87-93 2002.

Klug A., and D. Rhodes. “Zinc fingers”: a novel protein motif for nucleic acid recognition. *Trends Biochem. Sci.* 12: 464-469, 1987.

Koltzenburg M, Scadding J. Neuropathic pain. *Curr Opin Neurol.* 2001; 14: 641-7.

Kontargiris E., K Evangelos., A. Vadalouca, and V. Kalfakakou (2008). Role of Zn in ropivacaine and neutral endopeptidase: toxic effects on human keratinocyte cells. *Cell Biology and Toxicology.* 24, No 1: S58-S59.

Krezoski S.K., J. Villalobos, C.F. Shaw and D.H. Petering. Kinetic lability of zinc bound to metallothionein in Ehrlich cells. *Biochem. J.* 255: 483-491, 1988.

Lei L., J. Zhou, L Lin and L.F. Parada. Brn3a and Klf7 cooperate to control TrKA expression in sensory neurons. *Dev. Biol.* 300: 758-769, 2006.

Liu, Tao; Walker, Judith S.; Tracey, David J. Zinc alleviates thermal hyperalgesia due to partial nerve injury. *NeuroReport*: 25 February 1999 - Volume 10 - Issue 3 - p 645-649  
Somatosensory Systems, Pain.

Ludwig J.C. and M. Chvapil. Reversible stabilization of liver lysosomes by zinc ions. *J. Nutr.* 110: 945-953, 1981.

Luo W., S.R. Wickramasinghe, J.M. Savitt, J.W. Griffin, T.M. Dawson and D.D. Ginty. A hierarchical NGF signalling cascade controls Ret-dependent and Ret-independent events during development of nonpeptidergic DRG neurons. *Neuron.* 54: 739-754, 2007.

Marmigere F. and P. Ernfors. Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. *Nat. Rev. Neurosci.* 8: 114-127, 2007.

Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, et al. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature.* 1996;383:819-23

McClellan K. J. and Faulds D. (2000) Ropivacaine: an update of its use in regional anaesthesia. *Drugs.* 60 (5), 1065-1093.

McCleskey EW, Gold MS. Ion channels of nociception. *Annu Rev. Physiol.* 1999; 61: 835-56.

McClure JH (1996). Ropivacaine. *Br J Anaesth.* 76, 300-307.

Miller J., A.D. McLachlan and A. Klug. Repetitive zinc binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 4 : 1609-1614, 1985.

Miranda C, Di Virgilio M, Selleri S, Zanotti G, Pagliardini S, Pierotti MA. Novel pathogenic mechanisms of congenital insensitivity to pain with anhidrosis genetic disorder unveiled by functional analysis of neurotrophic tyrosine kinase type 1/nerve growth factor receptor mutations. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 6455-62.

Molliver D.C., D.E. Wright, M.L. Leither, A.S. Parsadanian, K. Doster, D. Wen, Q. Yan and W.D. Snider. IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron* 19: 849-861, 1997.

Morrison S.A., R.M. Russel, E.A. Carney and E.V. Oaks. Failure of antibiotics with hypovitaminosis A to achieve normal dark adaptation performance on vitamin A replacement (Abstract). *Gastroenterology* 71: 922, 1976.

Μόσχου Μ. Επίδραση καδμίου, ψευδαργύρου και της ουσίας Nacetyl-L-cysteine (NAC) στο ισχιακό νεύρο του αρουραίου και του βατράχου *Rana ridibunda*. Thessaloniki 2006.

Nordberg GF. Chelating agents and cadmium toxicity: problems and prospects. *Environ Health Perspect.* 54:213-8. 1984

Nukima I. Characteristics of muscarinic acetylcholine receptors in rat brain. *Acta Med. Okayama* 37: 179-191, 1983.

O’Keeffe NJ, Healy TE. (1999) The role of new anesthetic agents. *Pharmacol Ther.* 84, 233-248.

Owen MD, Dean LS. Ropivacaine. *Expert Opin Pharmacother.* 1, 325-336, 2000.

Palet T.D., A. Jackman, F.L. Rice, J. Kucera and W.D. Snider. Development of sensory neurons in the absence of NGF/TrKA signalling in vivo. *Neuron* 25: 345-357, 2000.

Pan T. and J.E. Coleman. Structure and function of the Zn(II) binding site within the DNA-binding domain of the GAL4 transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3145-3149, 1989.

Pan T. and J.E. Coleman. GAL4 transcription factor is not a “zinc finger” but forms a Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> binuclear cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 2077-2081, 1990.

Patek A.J. and C. Haig. The occurrence of abnormal dark adaptation and its relation to vitamin A metabolism in patients with cirrhosis of the liver. *J. Clin. Invest.* 18: 609-616, 1939.

Prasad AS, Halsted JA, Nadimi M. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. *Am J Med.* 31:532-46. 1961.

Ramsey I.S., M. Delling and D.E. Clapham. An introduction to TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.* 68: 619-647, 2006.

Rang H. P. and Dale M. M. (1991) “Pharmacology” Second Edition. Churchill Livingstone, 751-757..

Revis N. A possible mechanism for cadmium-induced hypertension in rats. *Life Sci.* 22:479-87 1978.

Riccio P, S Giovannelli, A. Bobba, E. Romito, A. Fasano, T. Bleve-Zacheo, R. Favilla, E. Quagliariello, P. Cavatorta. Specificity of zinc binding to myelin basic protein. *Neurochem Res.* 20:1107-13. 1995.

Sarkar S, Aziz Q, Woolf CJ, Hobson AR, Thompson DG. Contribution of central sensitisation to the development of non cardiac chest pain. *Lancet* 2000; 356: 1154-9.

Schwabe J.W.R., D. Neuhaus and D. Rhodes. Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor. *Nature Lond.* 348: 458-461, 1990.

Schmidt C. and Beyersmann D. Transient peaks in zinc and metallothionein levels during differentiation of 3T3L1 cells *Arch. Biochem. Biophys.* 364:91-8. 1999

Shang Z., Y.D. Liao, F.Y.D. WU and C.W. WU. Zinc release from Xenopus transcription factor IIIA induced by chemical modifications. *Biochemistry.* 28: 9790-9795, 1989.

Sheline CT, MM Behrens, DW Choi. Zinc-induced cortical neuronal death: contribution of energy failure attributable to loss of NAD(+) and inhibition of glycolysis. *J Neurosci.* 20:3139-46. 2000.

Siemens J., S.Zhou, R.Piskorowski, T. Nikai, E.A. Lumpkin, A.I. Basbaum, D. King and D. Julius. Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. *Nature* 444: 208-212, 2006.

Smeyers-Verbeke J., C. May, P. Drochmans and D.L. Massart. The determination of Cu, Zn and Mm in subcellular rat liver fractions. *Anal. Biochem.* 83:746-753, 1977.

Sunderman F.W. Jr. and A.M. Barber. Finger, loops, oncogenes and metals. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 18: 267-288, 1988.

Tegeder I., M. Costigan, R.S. Griffin, A.Abele, I. Belfer, H. Schmidt, C. Ehnert, J. Nejm, C. Marian and J.Scholz et al. GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin regulate pain sensitivity and persistence. *Nat. Med.* 12: 1269-1277, 2006.

Thiers R.E. and B.L. Vallee. Distribution of metals in subcellular fractions of rat liver. *J. Boil. Chem.* 226:911-920, 1957.

Thomas J.P., G.J. Backowski and A.W. Girotti. Inhibition of cell membrane lipid peroxidation by cadmium and zinc metallothionein. *Biochim. Biophys. Acta* 884: 448-461, 1986.

Thornally P.J., and H. Vasak. Possible role for metallothionein in protection against radiation induced oxidative stress, kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta* 827: 36-44, 1985.

Θεοχαρίδης Θ. Κ. (1997) Φαρμακολογία- Βασικές έννοιες στην κλινική πράξη. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 355.

Uchida Y, K Takio, K Titani, Y Ichara and M Tomnaga The growth inhibitory factor that is deficient in Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 7: 337-347, 1991.

Udom A.O. and F.O. Brady. Reactivation in vitro of zinc requiring apo-enzymes by rat liver zinc thionein. *Biochem. J.* 187: 329-335, 1980.

Ueno S, M Tsukamoto, T Hirano, K Kikuchi, MK Yamada, N Nishiyama, T Nagano, N Matsuki and Y Ikegaya. Mossy fiber Zn<sup>2+</sup> spillover modulates heterosynaptic N-methyl-D-aspartate receptor activity in hippocampal CA3 circuits. *J Cell Biol.* 158:215-20. 2002.

Vallee B.L. Zinc biochemistry and physiology and their derangements. In: *New Trends in Bio-Inorganic Chemistry*, edited by R.J.P. Williams and r.r.f. daSilva. New York: Academic, 1978, p. 11-57.

Vallee B.L. Implications and inferences of metallothionein structure. *Experientia Suppl. Basel* 52: 5-16, 1987.

Vallee B.L. and D.S. Auld. Sort and long spacer sequences and other structural features of zinc binding sites in zinc enzymes. *FEBS Lett.* 257: 138-140, 1989.

Vallee B.L. and D.S. Auld. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* 29: 5647-5659, 1990.

Vallee B.L. and D.S. Auld. Active-site zinc ligands and activated H<sub>2</sub>O of zinc enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 220-224, 1990.

Vallee B.L. and D.S. Auld. Active zinc binding sites of zinc metalloenzymes. In: Metalloproteinases and inhibitors. Matrix Supplement 1, edited by H. Birkedal-Hansen, Z. Werb, H. Welgus and H. Van Wart. Stuttgart, Germany: Fischer, 1992, p.5.

Vallee B.L. and K.H. Falchuk. Zinc and gene expression. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 294: 185-197, 1981.

Vallee B.L. and K.H. Falchuk The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev.* 73:79-118, 1993.

Vallee B.L., W.E.C. Wacker, A.F. Bartholomey and F.L. Hoch. Zinc metabolism in hepatic dysfunction. II. Correlation of metabolic pattern with biochemical findings. *N. Engl. J. Med.* 257: 1055-1065, 1957.

Vallee B.L., W.E.C. Wacker, A.F. Bartholomey and E.D. Robin. Zinc metabolism in hepatic dysfunction. I. Serum zinc concentrations in laennec's cirrhosis and their validation by sequential analysis. *N. Engl. J. Med.* 255: 403-408, 1956.

Valentine JS and PJ Hart. Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:3617-22. 2003

Van der Stelt M., M. Trevisani, V. Vellani, L. De Petrocellis, M.A. Schiano, B. Campi, P. McNaughton, P. Geppetti and V. Di Marzo. Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying Ca<sup>2+</sup> influx via TRPV1 channels, *EMBO J.* 24: 3026-3037, 2005.

Verpoorten N., K.G. Claeys, L. Deprez, A. Jacobs, G.V. Van, L. Lagae, W.F. Arts, L. De Meirleir, K. Keymolen, C. Ceuterick-de Groote and P. De Jonghe et al. Novel frameshift and splice site mutations in the neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1 gene (NTRK1) associated with hereditary sensory neuropathy type IV. *Neuromuscul. Disord.* 16: 19-25, 2006.

Volkl A., H. Berlet and G. Ule. Trace elements (Cu, Fe, Mg, Zn) of the brain during childhood. *Neuropediatrics* 5: 236-242, 1974.

Watt NT, NM Hooper. The prion protein and neuronal zinc homeostasis. *Trends Biochem Sci.* 28:406-10. 2003

Westbrook GL, ML Mayer. Micromolar concentrations of Zn<sup>2+</sup> antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. *Nature.* 328(6131):640-3. 1987

Woolf CJ, Q Ma. Nociceptors-Noxious Stimulus Detectors. *Neuron* 55: 353-364, 2007.

Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science.* 2000; 288: 1765-9.

Wysynski R.E., W.E. Burner, D.B. Cano, K.M. Moyon, C.B. Davis and P. Sternberg. A donor-age-dependent change in the activity of  $\alpha$ -mannosidase in human cultured RPE cells. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 30: 2341-2347, 1989.

Xiao H.S., Q.H. Huang, F.X. Zhang, L. Bao, Y.J.Lu, C. Guo, L. Yang, W.J. Huang, G. Fu, S.H.Xu and X.P. Cheng et al. Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 8360-8365, 2002.

Xu H., M Delling, J.C.Jun and D.E. Clapham. Oregano, thyme and clove-derived flavours and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat. Neurosci.* 9: 628-635, 2006.

Zimmerman K., A. Leffer, A. Babes, C.M. Cendan, R.W. Carr, J. Kobayashi, C. Nau, J.N. Wood and P.W.Reeh. Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature* 447: 856-859, 2007.