

MIROSŁAW J. MOSSAKOWSKI, ROMAN GADAMSKI

WPLYW BLOKOWANIA BŁONOWYCH KANAŁÓW WEJŚCIA  
WAPNIA  
NA ROZWÓJ NIEDOKRWIENNYCH USZKODZEŃ NEURONÓW  
SEKTORA CA<sub>1</sub> ROGU AMONA U CHOMIKÓW MONGOLSKICH

Zakład Neuropatologii, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,  
Warszawa

Mechanizm selektywnego uszkodzenia neuronów piramidowych sektora CA<sub>1</sub> rogu Amona w krótkotrwałym niedokrwieniu mózgu u chomików mongolskich jest niewyjaśniony. Jego opóźnienie w stosunku do innych wybiórczo wrażliwych na niedotlenienie okolic i struktur mózgowia, odmienność obrazu mikroskopowo-elektronowego w stosunku do typowych niedokrwienych zmian komórek nerwowych, a wreszcie znamienne zachowanie czynności bioelektrycznej w fazie poprzedzającej rozwój nieprawidłowości prowadzących nieodwołalnie do śmierci komórki sugerują, iż mechanizm ten jest inny niż w większości niedokrwienych zespołów patomorfologicznych. Koncepcją szeroko lansowaną w ostatnich latach jest pogląd, iż powolne, nieodwracalne zmiany neuronów sektora CA<sub>1</sub> rogu Amona w krótkotrwałym, przejściowym niedokrwieniu przodomózgowia zarówno u chomików mongolskich, jak i szczurów są następstwem działania ekscytotoksycznych neuromediatorów aminokwasowych, przede wszystkim glutaminianu (Olney 1978; Meldrum 1981; Meldrum i wsp. 1985; Petito, Pulsinelli 1984; Suzuki i wsp. 1985; Kirino i wsp. 1985). Za taką możliwością przemawia między innymi fakt bogatej inervacji glutaminergicznej neuronów CA<sub>1</sub>, pochodzącej z zakończeń odgałęzień kolateralnych Schaffera (Wieraszkowski 1982), zwiększona aktywność bioelektryczna neuronów CA<sub>1</sub> w okresie pierwszej doby po niedokrwieniu (Suzuki i wsp. 1983, 1985) oraz charakter wczesnych zmian ultrastrukturalnych komórek, sugerujący ich czynnościową aktywizację (Kirino i wsp. 1984; Petito, Pulsinelli 1984; Mossakowski i wsp. 1987). Przypuszcza się przy tym, że efektem wzmożonej aktywności komórki jest zwiększony napływ wapnia, prowadzący do rozprzężenia jej funkcji metabolicznych i śmierci (Simon i wsp. 1984). Na rolę wapnia w mechanizmie



uszkodzeń komórkowych w ośrodkowym układzie nerwowym zwraca uwagę szereg autorów (Łazarewicz i wsp. 1978; Wieloch, Siesjö 1981), a hipoteza sformułowana przez Siesjö (1986) o roli dokomórkowego napływu wapnia, jako zasadniczego ogniwa patogenetycznego niedokrwienych zmian neuronalnych, zyskała szeroką akceptację. Uzasadnia to próby ochronnego oddziaływania na niedokrwioną tkankę nerwową przy użyciu farmakologicznych środków blokujących błonowy transport wapnia (Hoffmeister i wsp. 1979; Kazda i wsp. 1979; Steen i wsp. 1983, 1984; Heffez, Passonneau 1985).

Celem niniejszych badań była ocena wpływu blokowania błonowych kanałów wejścia wapnia przy użyciu nimodipiny na rozwój selektywnych uszkodzeń neuronów piramidowych sektora CA<sub>1</sub> rogu Amona, w następstwie krótkotrwałego podwiązania obustronnego tętnic szyjnych wspólnych u chomików mongolskich.

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na dojrzałych chomikach mongolskich, samcach o masie ciała 70g, którym w narkozie wziewnej (2<sup>0</sup>/o narkotan podawany w układzie otwartym w mieszaninie gazowej składającej się z 70<sup>0</sup>/o azotu i 30<sup>0</sup>/o tlenu) zaciskano obustronnie tętnice szyjne wspólne na okres 7,5 min. Po zabiegu zwierzęta doświadczalne, którym w różnym czasie w stosunku do incydentu niedokrwienego podawano nimodipinę (Nimotop, firmy Bayer, Leverkusen, RFN), oraz zwierzęta kontrolne, które nie otrzymywały żadnych preparatów farmakologicznych, poza dootrzewnową iniekcją fizjologicznego roztworu chlorku sodu, pozostawiano w warunkach zwierzętarnianych na okres 5 dni. Po tym czasie uśmiercano je przez przezsercową perfuzję zbuforowanym 10<sup>0</sup>/o roztworem formaliny.

Nimodipinę podawano w dawce 1 mg/kg masy ciała zwierzęcia, zgodnie z danymi doświadczalnymi Heffeza i Passonneau (1985), w postaci komercyjnie przygotowanego roztworu alkoholowego, zawierającego 10 mg substancji czynnej w 50 ml rozpuszczalnika. Lek podawano w iniekcjach dootrzewnowych, w objętości 0,35 ml roztworu na jedno podanie.

W zależności od częstotliwości podawania leku i czasu w stosunku do incydentu niedokrwienego, wydzielono cztery grupy doświadczalne zwierząt.

Grupa 1 obejmowała 6 chomików mongolskich, które otrzymały dwa podania leku: pierwsze na 60 min przed podwiązaniem tętnic szyjnych wspólnych, drugie w 5 godzinie reperfuzy.

Grupa 2 składała się z pięciu zwierząt również z dwukrotnym zastosowaniem nimodipiny, z tym tylko, że pierwszą dawkę podano na 15 min przed niedokrwieniem, a drugą w 3 godzinie po przywróceniu krążenia mózgowego.



Grupę 3 stanowiło 5 chomików mongolskich z trzykrotnym podaniem nimodipiny. Dwie dawki podane według schematu grupy 2 uzupełniono dodatkową iniekcją leku w 24 godz. po niedokrwieniu.

W grupie 4 obejmującej również 5 zwierząt, nimodipinę podano jednorazowo w 24 godzinie reperfuzyj.

Jak wspomniano powyżej, zwierzęta kontrolne w liczbie 6 nie otrzymywały żadnych substancji czynnych poza jednorazową dootrzewnową iniekcją 0,9% chlorku sodu podaną na 15 min przed podwiązaniem tętnic szyjnych wspólnych. Układ odniesienia stanowiły 3 chomiki mongolskie nie poddane żadnym zabiegom doświadczalnym. Uzyskane wyniki oceniono morfometrycznie według metody opisanej uprzednio (Mossakowski, Gadamski 1987), której podstawą było określenie średniej liczby komórek piramidowych w 0,3 mm odcinku segmentu CA<sub>1</sub> rogu Amona. Średnią wartość uzyskiwano z ogólnej liczby neuronów występujących w 3 odcinkach o tej długości w 3—5 kolejnych skrawkach histologicznych od każdego zwierzęcia. Wyniki odnoszono do wartości uzyskanych u zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym. Uzyskaną w ten sposób średnią równą  $44,7 \pm 2,5$  komórek traktowano jako 100%.

Przeprowadzone obliczenia pozwoliły na wyodrębnienie następujących kategorii obrazu morfologicznego:

— brak zmian morfologicznych, gdy liczba komórek piramidowych równa była średniej u zwierząt nie poddanych zabiegom doświadczalnym — całkowity ubytek neuronów piramidowych, charakteryzujący się zastąpieniem warstwy komórek nerwowych proliferującym glejem gwiaździstym,

— częściowy ubytek neuronów piramidowych znamionowało utrzymanie zmiennej proporcji komórek nerwowych, wymagające dalszej kwantyfikacji. Wyodrębniono mianowicie 3 stopnie częściowego ubytku komórek piramidowych: 1° — z utrzymaniem 73,9% populacji neuronów, 2° — z 52,7% oraz 3° — z zachowaniem jedynie 35% średniej, prawidłowej populacji komórkowej.

Statystyczna analiza z użyciem testu t dla niezależnych średnich wykazała znaczną znamienność różnic między poszczególnymi stopniami i między każdym z nich a wartościami prawidłowymi.

#### WYNIKI

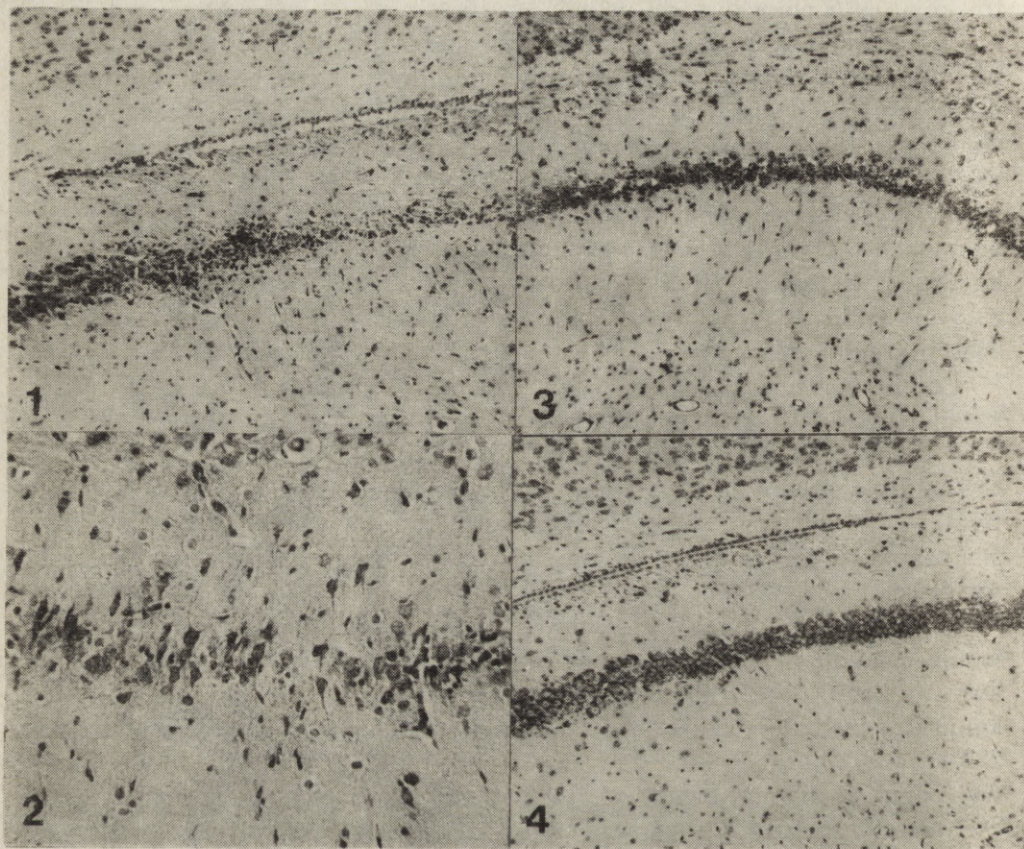
W grupie kontrolnej obejmującej 6 zwierząt całkowity zanik komórek nerwowych obserwowano w 3 przypadkach, a częściowy w 2, w tym po jednym przypadku w stopniu 1 i 3. U jednego ze zwierząt populacja komórek nerwowych była całkowicie niezmienną.

W grupie doświadczalnej 1, na 6 zwierząt badanych u dwóch obserwowano całkowity ubytek neuronów (ryc. 1), a u dwóch częściowy o nasileniu 3° (ryc. 2). Jedynie u dwóch sektor CA<sub>1</sub> rogu Amona nie wykazywał zmian morfologicznych.



W grupie doświadczalnej 2 sytuacja przedstawiała się podobnie. Spośród 5 badanych chomików mongolskich u 3 obserwowano całkowity ubytek neuronów sektora CA<sub>1</sub>, u jednego, z częściowym zanikiem komórek, nasilenie uszkodzeń miało cechy 1° (ryc. 3). Tylko jedno zwierzę charakteryzowało się brakiem zmian sektora CA<sub>1</sub>.

W grupie doświadczalnej 3 wszystkie 5 zwierząt wykazywało niezmienny obraz morfologiczny sektora CA<sub>1</sub> rogu Amona (ryc. 4).



Ryc. 1. Zwierzę z grupy doświadczalnej 1. Pogranicze sektora CA<sub>1</sub> i CA<sub>2</sub>. W CA<sub>1</sub> kompletny brak neuronów. Klüver—Barrera. Pow. 100 ×

Fig. 1. Experimental group 1. Borderline between CA<sub>1</sub> and CA<sub>2</sub> sectors. Sector CA<sub>1</sub> totally devoid of pyramidal neurons. Klüver—Barrera. × 100

Ryc. 2. Zwierzę z grupy doświadczalnej 1. W sektorze CA<sub>1</sub> zachowanych około 30% neuronów. Klüver—Barrera. Pow. 200 ×

Fig. 2. Experimental group 1. In sector CA<sub>1</sub> about 30 percent of pyramidal neurons are preserved. Klüver—Barrera. × 200

Ryc. 3. Zwierzę z grupy doświadczalnej 2. W sektorze CA<sub>1</sub> zachowanych około 70% neuronów. Klüver—Barrera. Pow. 100 ×

Fig. 3. Experimental group 2. In sector CA<sub>1</sub> about 70 percent of pyramidal neurons are preserved. Klüver—Barrera. × 100

Ryc. 4. Zwierzę z grupy doświadczalnej 3. Pogranicze CA<sub>1</sub> i CA<sub>2</sub>. W CA<sub>1</sub> zachowanych 100% neuronów. Klüver—Barrera. Pow. 100 ×

Fig. 4. Experimental group 3. Borderline between CA<sub>1</sub> and CA<sub>2</sub> sectors. In sector CA<sub>1</sub> 100 percent of pyramidal neurons are preserved. Klüver—Barrera. × 100



Tabela 1. Porównanie wyników uzyskanych u zwierząt leczonych i nieleczonych  
 Table 1. Comparison of results obtained in treated and untreated animals

Grupa zwierząt Group of animals	Liczba zwierząt No of animals	Brak zmian patologicznych No pathological changes	Częściowe uszkodzenie neuronów sektora CA <sub>1</sub> Partial damage of sector CA <sub>1</sub> neurons			Całkowity ubytek neuronów CA <sub>1</sub> Total loss of CA <sub>1</sub> neurons
			1°	2°	3°	
			Zwierzęta nieleczone Untreated animals	6	1	
Zwierzęta leczone Treated animals	21	11	2	1	2	5

Tabela 2. Porównanie wyników u zwierząt leczonych w zależności od schematu stosowania Nimotopu  
 Table 2. Comparison of results obtained in treated animals in dependence on the program of Nimotop application

Grupa zwierząt Group of animals	Liczba zwierząt No of animals	Brak zmian patologicznych No pathological changes	Częściowe uszkodzenie neuronów sektora CA <sub>1</sub> Partial damage of sector CA <sub>1</sub> neurons			Całkowity ubytek neuronów sektora CA <sub>1</sub> Total loss of CA <sub>1</sub> neurons
			1°	2°	3°	
			Zwierzęta kontrolne Control animals	6	1	
Zwierzęta doświadczalne Experimental animals	21	11	2	1	2	5
grupa 1 group 1	6	2	—	—	2	2
grupa 2 group 2	5	1	1	—	—	3
grupa 3 group 3	5	5	—	—	—	—
grupa 4 group 4	5	3	1	1	—	—

W grupie doświadczalnej 4 przy późnym, lecz jednorazowym podaniu nimodipiny, wyniki były mniej korzystne, choć lepsze niż w dwóch pierwszych grupach doświadczalnych. Spośród 5 badanych zwierząt nie zmieniony sektor CA<sub>1</sub> rogu Amona stwierdzono u 3, a u 2 pozostałych z częściowym zanikiem neuronów, ich nasilenie odpowiadało stopniowi pierwszemu i drugiemu.

Sumaryczne zestawienie wyników przedstawiono w tabeli 1 i 2.

#### OMÓWIENIE

Uzyskane wyniki wskazują na istnienie osłaniającego działania nimodipiny (Nimotopu) w stosunku do wybiórczych uszkodzeń neuronów piramidowych sektora CA<sub>1</sub> rogu Amona, stanowiących następstwo krótkotrwałego niedokrwienia przodomózgowia u chomików mongolskich. Spostrze-



zenia nasze potwierdzają w tym względzie obserwacje takich autorów, jak Hoffmeister i wsp. (1979), Kazda i wsp. (1979, 1982), Steen i wsp. (1983, 1984), Borgers (1985), Giesvold i Steen (1985), Baethmann i Jansen (1986), Fujisawa i wsp. (1986), Mabe i wsp. (1986), poczynione u różnych zwierząt w odmiennych modelach doświadczalnego niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego. Na osłaniające działanie nimodipiny w naszych badaniach wskazuje porównanie proporcji zwierząt z nie zmienioną, częściowo uszkodzoną i całkowicie zanikłą populacją neuronów sektora CA<sub>1</sub> u zwierząt kontrolnych i doświadczalnych. Wśród zwierząt kontrolnych, które nie otrzymywały leku, w połowie przypadków występował zupełny zanik komórek piramidowych sektora CA<sub>1</sub>, w jednej trzeciej ich częściowe uszkodzenie, a tylko u jednego z sześciu chomików nie stwierdzono w ogóle uszkodzeń komórkowych. W przeciwieństwie do tego u zwierząt doświadczalnych, którym podawano nimodipinę, obraz komórkowy sektora CA<sub>1</sub> w połowie przypadków nie odbiegał od stwierdzanego u zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom. Całkowity zanik neuronów występował w jednej czwartej przypadków. W takiej samej proporcji obecne były uszkodzenia częściowe.

Zestawienie wyników uzyskanych w poszczególnych grupach doświadczalnych wskazuje jednakże na zależność ochraniającego wpływu nimodipiny od schematu jej stosowania, dotyczącego zarówno częstości podawania leku, jak i jego okresu w stosunku do przebytego incydentu niedokrwiennego. W dwóch pierwszych grupach doświadczalnych, w których lek podawano na krótko przed podwiązaniem tętnic szyjnych (odpowiednio 60 i 15 min) oraz we wczesnym okresie restytucji krążenia (odpowiednio 5 i 3 godz.), uzyskano wynik negatywny, a proporcje poszczególnych rodzajów zmian komórkowych nie odbiegały zasadniczo od spostrzeganych u zwierząt bez stosowania leku. Najkorzystniejszy wynik, wyrażający się utrzymaniem niezmienionej populacji neuronów CA<sub>1</sub> u wszystkich zwierząt, obserwowano w grupie doświadczalnej 3, w której schemat grupy 2 uzupełniono dodatkową dawką leku podaną w 24 godz. po niedokrwieniu. Również korzystny, jakkolwiek mniej przekonujący niż w grupie 3, efekt działania leku uzyskano u zwierząt, które otrzymywały jego pojedynczą dawkę w 24 godz. po przywróceniu krążenia mózgowego. W grupie tej nie otrzymano wprawdzie całkowitego zahamowania uszkadzających efektów niedokrwienia, lecz proporcja zwierząt bez zmian strukturalnych sektora CA<sub>1</sub>, była znacznie większa niż w grupie kontrolnej i w dwóch pierwszych grupach doświadczalnych, a stwierdzone uszkodzenia miały nikłe nasilenie, uchwytnie dopiero w ocenie morfometrycznej.

Ta właśnie rozbieżność wyników między grupami z „wczesnym” i „późnym” stosowaniem leku zasługuje na odrębną uwagę, tym bardziej, że różnica schematu doświadczalnego w negatywnej grupie 2 i wysoce pozytywnej grupie 3 sprowadzała się wyłącznie do podania dodatkowej



dawki leku w późnym okresie po restytucji krążenia mózgowego, podczas gdy schemat ten w przypadku obu korzystnych grup 3 i 4 odbiegał od siebie zasadniczo zarówno łączną dawką nimodipiny, jak i całkowitym pominięciem w grupie 4 wczesnego podawania leku.

Wydaje się, że rozbieżności te, podobnie jak i różnice w stosunku do licznych prac wykazujących korzystny osłaniający efekt nimodipiny w warunkach niedokrwienia mózgu (Hoffmeister i wsp. 1979; Kazda i wsp. 1979, 1982; Steen i wsp. 1983, 1984; Borgers 1985; Baethmann, Jansen 1986; Fujisawa i wsp. 1986; Mabe i wsp. 1986), rozpatrywać należy w kontekście właściwości zastosowanego przez nas modelu doświadczalnego, mechanizmów tzw. opóźnionej śmierci neuronów (delayed neuronal death — Petito, Pulsinelli 1984; Suzuki i wsp. 1985; Kirino i wsp. 1985) oraz czasowej sekwencji zmian zachodzących w uszkodzonej komórce (Suzuki i wsp. 1984; Mossakowski i wsp. 1987).

Cechą zmienną reakcji neuronów piramidowych sektora CA<sub>1</sub> rogu Amona w następstwie krótkotrwałego niedokrwienia jest ich bioelektryczna hiperaktywizacja w pierwszej dobie po przywróceniu krążenia mózgowego (Suzuki i wsp. 1983), której w obrazie mikroskopowo-elektronowym towarzyszą ultrastrukturalne wykładniki metabolicznego pobudzenia (Mossakowski i wsp. 1987). Dopiero druga doba po niedokrwieniu przynosi wygasanie aktywności bioelektrycznej i pojawianie się ultrastrukturalnych cech uszkodzenia neuronu. Wśród tych ostatnich zwraca uwagę śródplazmatyczne gromadzenie się elektronowo gęstych, amorficznych struktur, uznanych przez Kirino i wsp. (1985) za odkładające się złogi wapnia. Dokomórkowa penetracja wapnia, przyczynowo związana ze zjawiskiem hiperaktywności bioelektrycznej neuronów, w zastosowanym przez nas modelu doświadczalnym wydaje się zjawiskiem późnym. Na późne gromadzenie się wapnia w neuronach w następstwie niedokrwienia zwracali uwagę również inni autorzy, między innymi Yanagihara i McCall (1982) oraz Hossmann i wsp. (1985). Ci ostatni uważają zresztą śródkomórkowy napływ wapnia za zjawisko nakładające się na szereg wcześniejszych procesów patologicznych prowadzących do uszkodzenia neuronów.

Doświadczenia nasze wskazują na korzystne oddziaływanie blokowania kanałów wejścia wapnia w 24 godz. po niedokrwieniu, a więc w okresie wygasania hiperaktywności bioelektrycznej komórki nerwowej. W zestawieniu ze wspomnianymi powyżej zmianami ultrastrukturalnymi wydaje się, że jest to okres największego dokomórkowego napływu wapnia. Nimodipina podana parenteralnie szybko gromadzi się w ośrodkowym układzie nerwowym osiągając maksymalne stężenie w 15 min po iniekcji. Spadające do połowy w ciągu kolejnej godziny mózgowe stężenie leku jest nadal wystarczające dla jego farmakologicznej aktywności (Heffez i wsp. 1985). Najkorzystniejszy wynik uzyskany w grupie



doświadczalnej 3 wskazuje równocześnie na zasadność jego wcześniejszego podawania.

W świetle uzyskanych przez nas wyników, wydaje się uzasadnione stwierdzenie, że w warunkach stosowanego modelu doświadczalnego krótkotrwałego niedokrwienia mózgu, mieszczącego się w czasowych granicach odwracalności zmian strukturalnych, a prowadzącego wyłącznie do wybiórczego uszkodzenia neuronów sektora CA<sub>1</sub>, rogu Amona, najbardziej skuteczne jest osiągnięcie odpowiedniego tkankowego stężenia leku w końcowym okresie pierwszej doby po przywróceniu krążenia mózgowego. Jego skuteczność wzrasta przy poprzedzającym podawaniu nimodipiny. Wkroczenie ze stosowaniem leku wyłącznie w okresie niedokrwienia i we wczesnych fazach recyrkulacji okazało się nieskuteczne. Wydaje się przy tym, że z różnicami modeli doświadczalnych, głębokości niedokrwienia oraz czasu stosowania substancji blokujących kanały wejścia wapnia w relacji do określonej fazy niedokrwienia i recyrkulacji należy wiązać odmienności efektów uzyskiwanych przez poszczególnych badaczy, w tym również negatywne wyniki opisane przez Barnetta i wsp. (1986) oraz Vibulsrestha i wsp. (1987). W rozważaniach tych uwzględnić należy również opinię Petersa (1987), który uważa, iż w warunkach *in vivo* substancje blokujące wejścia wapniowe opóźniają, a nie zapobiegają penetracji wapnia do komórki. Może to właśnie uzasadnić niezbędność wielokrotnego podawania leku, podtrzymującego opóźnienie wnikania wapnia do czasu funkcjonalnej restytucji błony komórkowej uszkodzonej przez niedokrwienie. Może również stanowić wskazanie do równoczesnego stosowania innych środków farmakologicznych o działaniu membranoprotekcyjnym, np. prostacykliny PGI<sub>2</sub> (Mossakowski, Gadamski 1987).

Mechanizm osłaniającego działania nimodipiny w warunkach niedokrwienia mózgu jest zagadnieniem nie rozstrzygniętym. Znaczna grupa autorów, w tym przede wszystkim Kazda i wsp. (1979), Steen i wsp. (1983, 1984) oraz Giesvold i Steen (1985), stoją na stanowisku, iż u podstaw korzystnego oddziaływania nimodipiny leży jej normalizujący wpływ na mózgowy przepływ krwi. W ostatnich latach ukazały się jednak prace sugerujące metaboliczne działanie, niezależne od czynników krążeniowych (Borgers 1985; Heffez, Passonneau 1985; Mabe i wsp. 1986). Szczególnie przekonywające w tym względzie są spostrzeżenia Heffeza i Passonneau (1985), którzy wykazali zróżnicowany efekt nimodipiny na różne parametry zaburzonego w następstwie niedokrwienia metabolizmu mózgu, odmienny zresztą w poszczególnych jego okolicach, pozwalający jeśli nie na wyłączenie roli czynnika naczyniowego, to przynajmniej na uznanie oddziaływań metabolicznych za niezależne od wpływów krążeniowych. Za bezpośrednim działaniem cytoprotekcyjnym nimodipiny przemawiają również nasze spostrzeżenia. W późnym okresie recyrkulacji, w którym oddziaływanie leku okazało się najskuteczniejsze, w stosowanym modelu doświadczalnym nie występują zaburzenia mikrokrą-



żenia (Mossakowski 1978). Niewielkie zresztą nasilenie nieprawidłowości krążenia mózgowego spotyka się natomiast we wczesnym okresie recyrkulacji, kiedy podawanie leku nie wywierało korzystnego wpływu. Heffez i Passonneau (1985) podkreślają również, iż nimodipina nie działa na zjawisko poniedokrwiennej hiperperfuzji, odgrywającej rolę czynnika uszkodzającego tkankę nerwową. Za cytoprotekcyjnym działaniem nimodipiny przemawiają również wyniki badań prowadzonych na pozaustrojowej hodowli tkanki nerwowej poddanej głębokiemu niedotlenieniu (Renkawek, Łazarewicz 1987). Warto przy tym podkreślić, iż w warunkach anoksji *in vitro* stwierdzono zbliżoną do naszych spostrzeżeń czasową zależność skuteczności cytoprotekcyjnej leku.

#### INFLUENCE OF THE CALCIUM CHANNEL BLOCKER ON THE ISCHEMIC CHANGES IN SECTOR CA<sub>1</sub> PYRAMIDAL NEURONS OF AMMON'S HORN IN MONGOLIAN GERBILS

##### Summary

The protective effect of Nimotop (Bayer) — a calcium channel blocker, being an equivalent of nimodipine, on the development of selective damage of CA<sub>1</sub> neurons of Ammon's horn resulting from short-term ischemia of forebrain in Mongolian gerbils was evaluated. The experimental animals, subjected to 7.5 min bilateral ligation of common carotid arteries were given the drug in a dosis of 1 mg/kg body weight in the form of intraperitoneal injection at various periods in relation to cerebral ischemia. In group 1 — Nimotop was administered twice — 60 min before ischemia and 5 h after arterial release. In group 2 a double dosis of the drug was given 15 min prior to carotid occlusion and in 3rd hour of the recirculation. In group 3 the scheme applied in group 2 was supplemented with a third dosis of Nimotop given 24 h following cerebral ischemia. The latter was the time of a single drug dosis application in group 4. The control animals were subjected to cerebral ischemia with no medication.

Experimental and control animals were sacrificed by transcardiac perfusion with 10% neutral formalin 5 days after ischemia. The state of CA<sub>1</sub> neurons of Ammon's horn was morphometrically evaluated in paraffin sections stained according to the Klüver-Barrera method in comparison with the picture characteristic for animals not subjected to any experimental procedure.

It was found that Nimotop exerts a full protective effect on pyramidal neurons of the CA<sub>1</sub> sector only in the case of its repeated application extended over 24 h following cerebral ischemia. A positive, although less conspicuous, effect was obtained with a single drug dosis applied at a late postischemic period, while a double dosis given in the early periischemic state remained ineffective.

Basing on the obtained results the authors suppose that the late effectiveness of the calcium channel blocker demonstrated in the presented results is connected with particularities of the experimental model applied in which the mechanism of neuronal damage and death is related with an excitotoxic action of the amino acid neurotransmitter (s). Delayed death of CA<sub>1</sub> pyramidal neurons is preceded by their hyperactivity lasting for the period of one day following cerebral ischemia. This period of functional neuronal hyperactivity is with all probability con-



nected with intracellular influx of calcium ions, leading to cellular irreversible damage. The results obtained suggest that this period is to be covered by the blocking action of the drug. Results of experiments with a single dose of the blocker given in late postischemic period may indicate its special importance in the development of postischemic pathology.

### ВЛИЯНИЕ БЛОКИРОВАНИЯ МЕМБРАННЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ НА ИШЕМИЧЕСКИЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕВРОНОВ СЕКТОРА $CA_1$ АММОНИЕВА РОГА МОНГОЛЬСКОГО ХОМЯКА

#### Резюме

Оценилось предохранительное действие Nimотора являющегося эквивалентом Nimodipina на развитие селективных повреждений нейронов сектора  $CA_1$  аммониева рога, появляющихся вследствие кратковременной ишемии переднего мозга у монгольских хомяков. Экспериментальные животные подвергнутые на 7,5 минут закупорке обеих общих сонных артерий, получали лекарство в интрабрюшинной инъекции 1 мг/1 кг массы тела в разном времени от ишемии. В I группе лекарство вводилось 2 раза: 60 минут перед ишемией и 5 часов после рециркуляции. Во II группе двухкратная доза применялась 15 минут перед перевязкой сосудов и 3 часа после их освобождения. В группе III схема группы II была дополнена добавочной дозой лекарства 24 часа после рециркуляции. В это же время подавалась однократная доза лекарства в группе IV. Контрольный материал составляли животные с аналогичной ишемией мозга, но не получившие лекарства. Экспериментальные и контрольные животные были умерщвлены интрасердечной перфузией 10% формалина. Состояние нейронов сектора  $CA_1$  аммониева рога оценивалось морфометрически на парафинных срезах окрашенных методом Klivera-Barrery, сопоставляя полученные результаты с образом у животных не подвергнутых никаким экспериментальным процедурам. Выявлено, что применение Nimотора полностью предохраняет нейроны сектора  $CA_1$  только при многократном его введении в течение 24 часов после ишемии. Полезный, хотя менее убеждающий эффект был получен при разовым поздним введению лекарства. Двухкратное введение в раннем ишемическом периоде было безрезультатно.

На основании полученных результатов авторы предполагают, что эффективность позднего блокирования мембранных кальциевых каналов — это явление, свойственное только в употребленной экспериментальной модели с особым механизмом повреждения и смерти нейронов, связанным с эксцитотоксическим действием аминокислотных невротрансмиттеров. Смерть нейронов предшествует их гиперактивности, выступающая в первый день после ишемии. В этом именно периоде гиперактивности нейронов совершается, по-видимому, приток в клетку кальция, ведущий к ее необратимому повреждению. Полученные результаты внушают, что в этом именно периоде нужно вводить средства блокирующие кальциевые каналы. Результаты полученные при разовом поздним введению лекарства свидетельствуют о особом значении поздней фазы гиперактивности клетки.

#### PIŚMIENICTWO

1. Baethmann A., Jansen M.: Possible role of calcium entry blockers in brain protection. *Europ. Neurol.*, 1986, 25, suppl. 1, 102—114.
2. Barnett B. H., Bose B., Little J. R., Jones S. C., Friel H. T.: Effects of nimodipine on acute focal cerebral ischemia. *Stroke*, 1986, 17, 884—890.
3. Borgers M.: Morphological assessment of tissue protection. W: Calcium entry blockers and tissue protection. Red. T. Godfaind, P. M. Vanhoutte, S. Govoni, R. Paoletti. Raven Press, New York, 1985, str. 173—181.



4. Fujisawa A., Matsumoto M., Matsuyama T., Heda H., Wanaka A., Yoneda S., Kimura K., Komada T.: The effect of the calcium antagonist nimodipine on the gerbil model of experimental cerebral ischemia. *Stroke*, 1986, 17, 748—752.
5. Giesvold S. E., Steen P. A.: Drug therapy in brain ischemia. *Brit. J. Anaesth.*, 1985, 57, 96—109.
6. Heffez D. S., Nowak T. S. Jr., Passonneau J.: Nimodipine levels in gerbil brain following parenteral drug administration. *J. Neurosurg.*, 1985, 63, 589—592.
7. Heffez D. S., Passonneau J. V.: Effect of nimodipine on cerebral metabolism during ischemia and recirculation. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.*, 1985, 5, 523—528.
8. Hoffmeister F., Kazda S., Krause H. P.: Influence of nimodipine (Bay e 9736) on the postischemic changes of brain function. *Acta Neurol. Scand.*, 1979, 60, suppl. 72, 358—359.
9. Hossmann K.-A., Gross-Ophoff B., Schmidt-Kastner R., Oschlies U.: Mitochondrial calcium sequestration in cortical and hippocampal neurons after prolonged ischemia of the cat brain. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1985, 68, 230—238.
10. Kazda S., Hoffmeister F., Garthoff B., Toward R.: Prevention of the post-ischemic impaired perfusion of the brain by nimodipine (Bay e 9736). *Acta Neurol. Scand.*, 1979, 60, suppl. 72, 302—303.
11. Kazda S., Garthoff B., Krause H. P., Schlossmann K.: Cerebrovascular effects of the calcium antagonists dihydropyridine derivative nimodipine in animal experiments. *Arzheim Forsch. Drug Res.*, 1982, 32, 331—338.
12. Kirino T., Tamura A., Sano K.: Delayed neuronal death in the hippocampus following brief ischemia. W: *Cerebral ischemia*. Red.: A. Bes, P. Braquet, R. Paoletti, B. K. Siesjö, Elsevier, Amsterdam, 1984, 25—34.
13. Kirino T., Tamura A., Sano K.: Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia — reversible and irreversible types of ischemic cell damage. W: *Progress in Brain Research.*, Red.: K. Kagure, K. A. Hossmann, B. K. Siesjö, F. A. Welsh. Elsevier, Amsterdam, 1985, 63, 39—58.
14. Łazarewicz J. W., Majewska M. D., Wróblewski J. T.: Possible participation of calcium in the pathomechanism of ischemic brain damage. W: *Pathophysiological, Biochemical and Morphological Aspects of Cerebral Ischemia and Arterial Hypertension*. Red.: M. J. Mossakowski, I. Zelman, H. Kroh. *Pol. Med. Publ.*, Warszawa, 1978, str. 79—86.
15. Mabe H., Nagai H., Takagi T., Amenura S., Ohno M.: Effect of nimodipine on cerebral functional and metabolic recovery following ischemia in the rat brain. *Stroke*, 1986, 17, 501—505.
16. Meldrum B. S.: Metabolic effects of prolonged epileptic seizures and the causation of epileptic brain damage. W: *Metabolic disorders of the nervous system*. Red.: F. C. Rose. Pitman, London, 1981, str. 175—187.
17. Meldrum B., Evans M., Griffiths T., Simon R.: Ischemic brain damage: the role of excitatory activity and calcium entry. *Brit. J. Anaesth.*, 1985, 57, 44—46.
18. Mossakowski M. J.: Cerebral circulatory disturbances in various types of hypoxic conditions. W: *Advances in Neurology*. Red.: J. Cervos-Navarro. Raven Press, New York, 1978, 20, 161—171.
19. Mossakowski M. J., Gadamski R.: Wpływ prostacykliny PGI<sub>2</sub> i indometacyny na niedokrwienne uszkodzenie sektora CA<sub>1</sub> rogu Amona u chomików mongolskich. *Neuropat. Pol.*, 1987, 25, 21—34.
20. Mossakowski M. J., Gajkowska B., Cicishvili A.: Ultrastructure of CA<sub>1</sub> sector of Ammon's horn in short-term cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *Neuropat. Pol.*, 1987 (in press).



21. Olney J. W.: Neurotoxicity of excitatory amino acids. W: Kainic Acid as a Toll in Neurobiology. Red.: E. G. McGeer, J. W. Olney, P. L. McGeer. Raven Press, New York, 1978, str. 37—70.
22. Peters T.: Calcium in physiological and pathological cell function. *Eur. Neurol.*, 1986, 25, suppl. 1, 27—44.
23. Petito C. K., Pulsinelli W. A.: Delayed neuronal recovery and neuronal death in rat hippocampus following severe cerebral ischemia: possible relationship to abnormalities in neuronal processes. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1984, 4, 194—205.
24. Renkawek K., Łazarewicz J. W.: Protective effect of the calcium entry blocker, nimodipine on cns organotypic cultures submitted to anoxia. *Neuropat. Pol.*, 1987 w druku.
25. Siesjö B. K.: Calcium and ischemic brain damage. *Eur. Neurol.*, 1986, 25, suppl. 1, 45—50.
26. Simon R. P., Griffiths T., Evans M. C., Swan J. H., Meldrum B. S.: Calcium overload in selectively vulnerable neurons of the hippocampus during and after ischemia: an electron microscopy study in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1984, 4, 350—361.
27. Steen P. A., Newberg L. A., Milde J. H., Michenfelder J. P.: Nimodipine improves cerebral blood flow and neurologic recovery after complete cerebral ischemia in the dog. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1983, 3, 38—48.
28. Steen P. A., Newberg L. A., Milde J. H., Michenfelder J. D.: Cerebral blood flow and neurologic outcome when nimodipine is given after complete cerebral ischemia in the dog. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1984, 4, 82—87.
29. Suzuki R., Yamaguchi T., Inaba Y., Wagner H. G.: Microphysiology of selectively vulnerable neurons. W: Progress in Brain Research. Red.: K. Kogure, K. A., Hossmann, B. K. Siesjö, F. A. Welsh. Elsevier, Amsterdam, 1985, 63, str. 59—68.
30. Suzuki R., Yamaguchi T., Li C. L., Klatzo I.: The effects 5-minute ischemia in Mongolian gerbils. II. Changes of the spontaneous neuronal activity in cerebral cortex and CA<sub>1</sub> sector of hippocampus. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1983, 60, 217—222.
31. Vibulsresth S., Dietrich W. D., Busta R., Ginsberg M. O.: Failure of nimodipine to prevent ischemic neuronal damage in rats. *Stroke*, 1987, 8, 210—216.
32. Yanagihara T., McCall J. T.: Ionic shift in cerebral ischemia. *Life Sci.*, 1982, 30, 1921—1925.
33. Wieloch T., Siesjö B. K.: Ischemic brain injury: the importance of calcium, lipolytic activities and free fatty acids. *Pathol. Biol.*, 1981, 30, 269—277.
34. Wieraszkó A.: Biochemiczne przejawy plastyczności synaps w hipokampie ze szczególnym uwzględnieniem roli kwasu glutaminowego jako domnianego neurotransmitera w niektórych szlakach hipokampalnych. Rozprawa habilitacyjna. Autoreferat. Biblioteka Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN, Warszawa, 1982.

Adres autorów: Zakład Neuropatologii, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa